

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16<sup>INK4A</sup>**  
**EM AMOSTRAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE**  
**DA CAVIDADE BUCAL**

*Francisco Bernardo Arreguy de Oliveira*

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Annamaria Ravara Vago**

**Belo Horizonte**

**2010**

*Francisco Bernardo Arreguy de Oliveira*

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16<sup>INK4A</sup>  
EM AMOSTRAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE  
DA CAVIDADE BUCAL**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

---

**Orientadora**

**Prof<sup>a</sup> Annamaria Ravara Vago**

---

**Aluno**

**Francisco Bernardo Arreguy de Oliveira**

**Belo Horizonte**

**2010**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16<sup>INK4A</sup>  
EM AMOSTRAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE  
DA CAVIDADE BUCAL**

*Francisco Bernardo Arreguy de Oliveira*

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Annamaria Ravara Vago**

**Agências Financiadoras: CNPq, Capes e Fapemig**

**Belo Horizonte**

**2010**

## AGRADECIMENTOS

Expresso aqui os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho:

- À minha orientadora Annamaria, pela oportunidade de trabalho, pela amizade, carinho e apoio;

-Ao amigos Alan, Soraya, Daniele, Keila e Amanda pelo companheirismo, dedicação, disposição, prestatividade, paciência e grandes ensinamentos;

-Aos Professores Tarcília, Luiz César e Wágner Castro do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais e os colegas Vitor, Bruno, André, Luana, Roberta, Pollyana, Gabriela e Grazy pelo auxílio fundamental na obtenção das amostras utilizadas nesse trabalho;

- Ao Professor Marcelo Vidigal Caliari, Coordenador do Laboratório de Protozooses do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, pela fundamental orientação na realização da Análise Morfométrica realizada no presente estudo, e ainda pelos grandes ensinamentos oferecidos;

- Ao Professor Marcos Xavier Silva do Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais pela realização da análise estatística dos dados obtidos no presente estudo, além da grande disponibilidade e apoio;

- Aos amigos e companheiros do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, em especial Samyra Nassif, Guilherme Costa, André Oliveira, Bárbara Hissa, Felipe Dias, Amanda Albuquerque, Ana Luiza Drummond, Débora Santos, Luiz Henrique, Hermann Rodrigues, Héder Ribeiro, Fernando Mauad, Michelle Mello, Luiza Pinheiro e Rodolfo Nascimento;

-A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, em especial à Sibele por ser essa pessoa maravilhosa e sempre tão solícita;

-Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial Professora Doutora Tânia Mara Segatelli, Professor Doutor Luiz Renato França e Professor Doutor José Carlos Nogueira;

-Aos amigos Marcos Vinícius Zuim Lara, Rodolfo Assis Lisboa, Renan Lana Devita, Marcelo Vaz de Melo Cerqueira, Fernanda Rodrigues e Guilherme Teixeira de Melo Franco pela amizade, companheirismo e paciência durante todas as etapas desse trabalho;

-Ao meu padrinho por me apresentar, desde criança, esse mundo maravilhoso que é a Biologia;

-E aos mais importantes de todo o processo, meus pais e minha irmã pela presença, carinho, apoio e, acima de tudo, a confiança durante toda a vida;

A todos, MUITO OBRIGADO!!!

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

°C - Graus Celsius

µm - micrômetro

AIDS - “Acquired Immunodeficiency Syndrome” ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BSA - “Bovine Serum Albumine” traduzido como Albumina de Soro Bovino

CCECB - Carcinoma de Células Escamosas de Cavidade Bucal

CCECP - Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço

CDK - “Cyclin-Dependent Kinase” traduzido como Quinase Dependente de Ciclina

CDK2 - Quinase Dependente da Ciclina 2

CDK4 - Quinase Dependente da Ciclina4

CDK6 - Quinase Dependente da Ciclina 6

CDKI - “Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors”, traduzido como Inibidores de Quinase Dependente de Ciclina

CDKN2A - Gene supressor de tumor que codifica a proteína P16<sup>INK4A</sup>

cDNA - “Complementary Desoxiribonucleic Acid” traduzido como Ácido Desóxi-ribonucléico (ver DNA) Complementar

CECB - Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal

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

D1 - Ciclina D1

D2 - Ciclina D2

D3 - Ciclina D3

DNA - “Desoxiribonucleic Acid” traduzido como Ácido Desóxi-ribonucléico

E2F - Fator de transcrição E2F

E6 - Oncoproteína precocemente transcrita do Vírus do Papiloma Humano

E7 - Oncoproteína precocemente transcrita do Vírus do Papiloma Humano

EGFR - “Epidermal Growth Factor Receptor“ ou Receptor do Fator de Crescimento Epitelial

G1 - Fase G1 (Gap 1) do Ciclo Celular

GST - Gene Supressor de Tumor

HNSCC - “Head and Neck Squamous Cell Carcinoma“ traduzido como Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço

HPV - “Human Papillomavirus“ traduzido como Vírus do Papiloma Humano

IARC - “International Agency for Research on Cancer“ ou Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

INCA - Instituto Nacional do Câncer

INK4 - “Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinase” ou Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina

kDa - Kilodaltons

KIP - “Kinasis Inhibitor Protein” ou Proteína Inibidora de Quinase

L1 - Proteína principal do capsídeo do Vírus do Papiloma Humano

LEI - Lesões Escamosas Intra epiteliais

myc - refere-se à proteína ou ao gene myc

µg - Micrograma

µL - Microlitro

mL - Mililitro

µM - Micromolar

mM - Milimolar

NIC III - Neoplasia Intraepitelial Cervical de Grau III

Nested-PCR - Técnica Nested da Reação em Cadeia da Polimerase

OSCC - “Oral Squamous Cell Carcinoma” ou Carcinoma de Células Escamosas Oral

P12<sup>DOC-1</sup> - Refere-se à proteína P12<sup>DOC-1</sup>

P14 – Refere-se à proteína P14

P15<sup>INK4B</sup> - Refere-se à proteína Inibidora de Quinase Dependente de Ciclina P15<sup>INK4B</sup>

P16<sup>INK4A</sup> - Refere-se à proteína Inibidora de Quinase Dependente de Ciclina P16<sup>INK4A</sup>

P18<sup>INK4C</sup> - Refere-se à proteína Inibidora de Quinase Dependente de Ciclina P18<sup>INK4C</sup>

P19<sup>INK4D</sup> - Refere-se à proteína Inibidora de Quinase Dependente de Ciclina P19<sup>INK4D</sup>

P21<sup>Cip1</sup> - Refere-se à proteína Inibidora de Quinase Dependente de Ciclina P21<sup>Cip1</sup>

P27<sup>KIP1</sup> - Refere-se à proteína Inibidora de Quinase Dependente de Ciclina P27<sup>KIP1</sup>

P53 - Proteína codificada pelo gene TP53

P57<sup>Kip2</sup> - Refere-se à proteína Inibidora de Quinase Dependente de Ciclina P57<sup>Kip2</sup>

P107 - Refere-se à proteína P107

P130 - Refere-se à proteína P130

pb - Pares de base

PBS - “Phosphate-Buffered Saline” ou solução salina tamponada por fosfato

PCR - “Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase

pH - Potencial Hidrogeniônico

PRb - Proteína do retinoblastoma

ras - Refere-se à proteína ou ao gene ras

RNA - “Ribonucleic Acid” ou Ácido Ribonucléico

RNA<sup>m</sup> - “Messenger Ribonucleic Acid” ou Ácido Ribonucléico (ver RNA) mensageiro

RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase baseado no uso da enzima Transcriptase Reversa

S - Fase S do Ciclo celular

Stat 3 - Proteína envolvida em uma via de sinalização mitógena

UV - Radiação ultra violeta

WT - “Wild type”ou tipo selvagem

## **LISTA DE FIGURAS**

---

FIGURA 1:.....	18
FIGURA 2: .....	20
FIGURA 3:.....	37
FIGURA 4:.....	38
FIGURA 5:.....	39
FIGURA 6:.....	45
FIGURA 7:.....	46
FIGURA 8:.....	47
FIGURA 9:.....	49
FIGURA 10:.....	50
FIGURA 11:.....	51
FIGURA 12:.....	53
FIGURA 13:.....	54
FIGURA 14:.....	55
FIGURA 15:.....	86

## **LISTA DE TABELAS**

---

TABELA 1: RELAÇÃO DA ÁREA TOTAL DE MARCAÇÃO DA PROTEÍNA P16 <sup>INK4A</sup> (40 CAMPOS) POR AMOSTRA E MÉDIA DA ÁREA DE MARCAÇÃO POR CAMPO.....	<b>57</b>
TABELA 2: EXPRESSÃO DE P16 <sup>INK4A</sup> EM AMOSTRAS CONTROLES E EM AMOSTRAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE BUCAL.....	<b>58</b>
TABELA 3: RELAÇÃO ENTRE OS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES E A EXPRESSÃO DE P16 <sup>INK4A</sup> .....	<b>65</b>
TABELA 4: RELAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS DAS LESÕES E SINTOMATOLOGIA DOS PACIENTES E A EXPRESSÃO DE P16 <sup>INK4A</sup> .....	<b>66</b>
TABELA 5: EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16 <sup>INK4A</sup> EM LESÕES PRÉ-MALIGNAS DA CAVIDADE ORAL.....	<b>79</b>
TABELA 6: EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16 <sup>INK4A</sup> NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE BUCAL.....	<b>81</b>

## **LISTA DE GRÁFICOS**

---

GRÁFICO 1:.....	56
GRÁFICO 2:.....	59
GRÁFICO 3:.....	59
GRÁFICO 4:.....	60
GRÁFICO 5:.....	60
GRÁFICO 6:.....	61
GRÁFICO 7:.....	61
GRÁFICO 8:.....	62
GRÁFICO 9:.....	62
GRÁFICO 10:.....	63
GRÁFICO 11:.....	63
GRÁFICO 12:.....	63
GRÁFICO 13:.....	64

## SUMÁRIO

---

RESUMO.....	14
INTRODUÇÃO.....	15
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1.1 O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS.....	17
1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS.....	18
1.3 A PATOGÊNESE DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE BUCAL.....	22
1.3.1 A ASSOCIAÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS E FÍSICOS.....	22
1.3.2 A INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	23
1.3.3 MUTAÇÕES EM GENES ASSOCIADOS À PATOGÊNESE DO CECB.....	27
1.4 A EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE BUCAL.....	31
2. OBJETIVOS.....	34
2.1 OBJETIVO GERAL.....	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3. METODOLOGIA .....	35
3.1 PACIENTES.....	35
3.1.1 PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE.....	35
3.1.2 AMOSTRAS CONTROLE NEGATIVO.....	36

3.2 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	40
3.3 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA ANÁLISE DA PROTEÍNA P16 <sup>INK4A</sup> .....	42
3.4 CAPTURA DE IMAGENS E ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	42
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4. RESULTADOS .....	44
4.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	44
4.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16 <sup>INK4A</sup> EM AMOSTRAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE BUCAL.....	52
4.2.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA EXPRESSÃO DE P16 <sup>INK4A</sup> .....	57
4.3 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS PACIENTES E DADOS CLÍNICOS DAS LESÕES.....	58
4.4 CORRELAÇÃO DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES COM CECB E A EXPRESSÃO DE P16 <sup>INK4A</sup> .....	64
5. DISCUSSÃO.....	69
5.1 A CORRELAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS E A PATOGÊNESE DO CECB.....	69
5.2 A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16 <sup>INK4A</sup> NA MUCOSA NORMAL.....	75
5.3 EXPRESSÃO DE P16 <sup>INK4A</sup> EM LESÕES DA CAVIDADE ORAL.....	78
5.4 A INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO E A PATOGÊNESE DO CARCINOMA BUCAL.....	88
5.5 UTILIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE P16 <sup>INK4A</sup> COMO BIOMARCADOR DO CARCINOMA BUCAL.....	89
6. CONCLUSÕES.....	93

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
8. ANEXOS.....	107
8.1 ANEXO 1.....	107
8.2 ANEXO 2.....	108

## RESUMO

---

Dentre os tipos de neoplasia de cabeça e pescoço, o Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal (CECB) apresenta maior importância clínica e epidemiológica e corresponde ao tipo mais comum de tumor, representando cerca de 90% dos casos. Com o objetivo de se identificar moléculas biomarcadoras associadas à progressão dessa neoplasia, potencialmente úteis ao diagnóstico, prognóstico e manejo dos pacientes afetados, diversas proteínas tem sido analisadas quanto à sua expressão em amostras de CECB. Destaca-se a análise de P16<sup>INK4A</sup> produto do gene CDKN2A, proteína envolvida na regulação do ciclo celular. Nesse estudo foram analisadas 25 amostras de Carcinoma Epidermóide incluídas em parafina provenientes de biópsias obtidas de pacientes atendidos (i) na Clínica de Patologia e Semiologia Odontológicas II da Faculdade de Odontologia da UFMG e na (ii) Clínica de Cirurgia Buco Maxilo-Facial do Hospital Odilon Behrens, Belo Horizonte, MG. Também foram avaliadas nove amostras de mucosa oral sadias, obtidas de pacientes que não apresentavam nenhuma patologia oral visível, sendo, portanto, considerados indivíduos saudáveis. Realizou-se, nessas amostras, a análise da expressão da proteína P16<sup>INK4A</sup> por meio da técnica de Imunohistoquímica e a avaliação morfométrica da área de expressão da proteína por meio do programa de computador KS 300 (Carl Zeiss Oberkochen, Germany). Os dados obtidos referentes às áreas de marcação da proteína P16<sup>INK4A</sup> tanto nas amostras de carcinoma oral, quanto de tecidos sadios foram analisadas estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney. Os dados clínicos (tempo de evolução da lesão, presença de sintomatologia dolorosa e comprometimento dos linfonodos) e epidemiológicos (etnia, idade, gênero, hábito do tabagismo e etilismo, consumo diário de cigarros) dos pacientes portadores de CECB, assim como as características da lesão (sítio, morfologia e coloração da lesão) foram comparados à expressão da proteína P16<sup>INK4A</sup> por meio do Teste Exato de Fisher. Observou-se diferença estatisticamente significativa da expressão de P16<sup>INK4A</sup> entre pacientes portadores de CECB e indivíduos controles, sendo observada maior a expressão da proteína em portadores de Carcinoma bucal. Da mesma forma, a expressão da proteína P16<sup>INK4A</sup> foi significativamente mais elevada em pacientes portadores de CECB que apresentavam o hábito do tabagismo.

## INTRODUÇÃO

---

O Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal (CECB) compreende uma neoplasia maligna de origem epitelial, que acomete, dentre outros sítios, a região bucal e é a sexta neoplasia mundialmente mais comum representando 5% dos tumores malignos em países desenvolvidos. Apresentam-se, clinicamente, como lesões assintomáticas proliferativas ou ulceradas e pode desenvolver-se a partir de lesões pré-malignas, clinicamente chamadas de Leucoplasia (displasias), sendo mais freqüente em indivíduos do sexo masculino com acima de 55 anos. A causa do Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal é multifatorial, sendo possivelmente relacionada a alguns fatores de risco como o uso de tabaco, o etilismo, a exposição freqüente à radiação ultra - violeta, os estados de Imunossupressão, a presença de mutações genéticas e a infecção pelo Vírus do Papiloma Humano. Embora um grande avanço dos métodos terapêuticos empregados no tratamento dessa neoplasia tenha sido observado nos últimos anos, a taxa de sobrevivência dos pacientes com câncer bucal permaneceu praticamente inalterada nas últimas três décadas, justificando-se, dessa forma, a procura por marcadores biológicos que possam ser incorporados ao sistema prognóstico. Por refletirem a diversidade biológica do carcinoma bucal, tais biomarcadores poderiam prever o possível desenvolvimento clínico e a resposta terapêutica de um dado tumor em particular.

Estudos moleculares realizados nos últimos quinze anos sugerem que vias específicas sejam relevantes no processo de desenvolvimento e progressão da doença. Essas vias incluem (i) fatores de crescimento e seus receptores; (ii) moléculas relacionadas à transdução de sinal; (iii) fatores de transcrição; (iv) proteínas relacionadas à proliferação e à apoptose; (v) proteínas relacionadas à hipóxia e à angiogênese e (vi) proteínas associadas à regulação do ciclo celular, como a proteína P16<sup>INK4A</sup>. A proteína P16<sup>INK4A</sup>, um produto do gene CDKN2A é uma proteína supressora de tumor que inibe quinases dependentes de ciclina (CDK) impedindo a fosforilação de PRb (proteína do Retinoblastoma), e apresentando, conseqüentemente, um importante papel na regulação do ciclo celular em mamíferos. Diversos estudos já foram conduzidos, visando analisar a correlação entre a expressão de P16<sup>INK4A</sup> e o processo da carcinogênese oral. Os resultados provenientes desses trabalhos foram conflitantes, pois em alguns desses estudos observou-se um aumento da expressão de P16<sup>INK4A</sup> e em outros foi verificada uma redução dessa expressão. Portanto, justifica-se

a realização de estudos que tenham por objetivo avaliar a expressão da proteína P16<sup>INK4A</sup>, uma das principais proteínas envolvidas no controle do ciclo celular em amostras de CECB, e comparar o padrão de expressão exibido nessas amostras com aquele obtido pela análise de tecidos normais. Da mesma forma, a comparação da expressão dessa proteína com dados clínicos e epidemiológicos de pacientes portadores de CBCE constitui importante aspecto relacionado à patogênese e epidemiologia molecular dessa modalidade mais representativa de Carcinoma bucal.

## **1. REVISÃO DA LITERATURA**

---

### **1.1 O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

O termo Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço ou CCECP (“Head and Neck Squamous Cell Carcinoma” ou HNSCC) inclui as lesões que acometem alguns sítios anatômicos como a cavidade oral, os lábios, o nariz e os seios paranasais, a região da nasofaringe e da orofaringe, a laringe, o esôfago, as glândulas salivares assim como os tecidos moles do pescoço e do pavilhão auditivo. Anualmente, cerca de 620.000 pacientes são diagnosticados com câncer da cavidade oral, da nasofaringe, da orofaringe e da laringe. A proporção de homens e mulheres atingidos é de aproximadamente 4:1 (revisão em Parkin *et al.*, 2005; em Syrjänen, 2005).

Dentre os tipos de neoplasia de cabeça e pescoço, o Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal (CECB) apresenta maior importância clínica e epidemiológica e corresponde ao tipo mais comum desses tumores, representando cerca de 90% dos casos. Também é conhecido como Carcinoma Espino-Celular ou Carcinoma Bucal de Células Escamosas (“Oral Squamous Cell Carcinoma” ou OSCC) e compreende uma neoplasia maligna de origem epitelial, que acomete, dentre outros sítios, a região bucal (Jefferies *et al.*, 2001; Neville *et al.*, 2009).

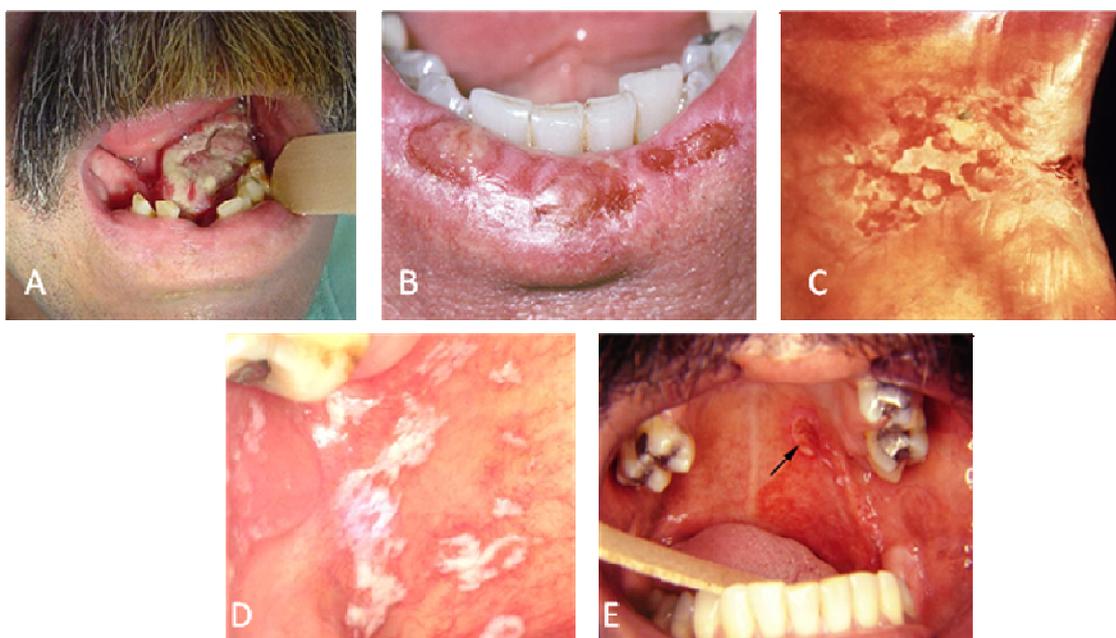
O carcinoma bucal é a sexta neoplasia mundialmente mais comum representando 5% dos tumores malignos em países desenvolvidos e apresentando uma taxa maior de incidência em países como a Índia, China, Filipinas, França e Brasil (revisão em Sugerman & Shillitoe, 1997). Merece destaque o fato de que em algumas regiões da Índia e no Sudeste Asiático, essa neoplasia consiste no tipo mais comum de tumor maligno, apresentando uma taxa de prevalência superior a 50% (revisão em Syrjänen, 2005; Gil & Fliss, 2009).

Dados epidemiológicos provenientes da Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer ou IARC (“International Agency for Research on Câncer” e da GLOBOCAN 2008 (Ferlay *et al.*, 2010), indicaram que a incidência do CECB em 2002 foi de 274.289 casos no mundo, sendo 175.916 diagnosticados em homens e 98.373 em mulheres. De acordo com a mesma fonte, a taxa de mortalidade estimada foi de 127.459 casos (80.736 homens e 46.723 mulheres). Dados provenientes do Instituto Nacional do

Câncer (INCA) indicam para o ano de 2010 uma estimativa de surgimento na população brasileira de cerca de 14.120 novos casos de carcinoma oral, sendo que deverá haver maior incidência em homens - 10.330 casos - em comparação àquela que será apresentada por mulheres - 3.790 casos - (INCA, 2010).

## 1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS

O Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal caracteriza-se, clinicamente, pela presença de lesões com apresentações variadas, incluindo as formas: (i) exofítica, caracterizada por formação de massa tumoral com volume aumentado e com aspecto papilar ou verruciforme (**FIGURA 1-A**); (ii) endofítica, com a presença de ulceração; apresenta aspecto infiltrativo (**FIGURA 1-B**); (iii) leucoplásica (**FIGURA 1-D**) e eritroplásica (**FIGURA 1-E**), caracterizadas pela presença de manchas brancas e vermelhas, respectivamente, e erito-leucoplásica (**FIGURA 1-C**), com presença de ambas áreas vermelhas e brancas (Neville *et al.*, 2009).



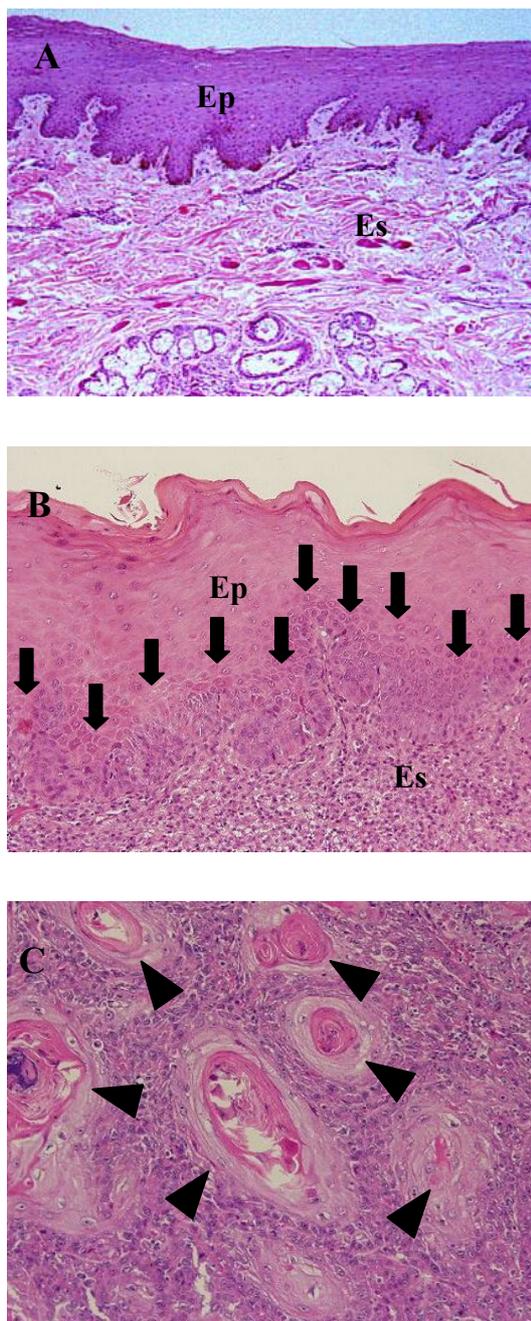
**FIGURA 1: Aspectos Clínicos de Lesões de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal: A - Verruciforme; B - Infiltrativo e Ulcerado; C - Eritro-Leucoplásico; D - Leucoplásico; E - Eritroplásico.**

O aspecto clínico das lesões do carcinoma bucal pode, muitas vezes, levar à confusão com outras patologias que acometem a cavidade bucal como, por exemplo, as lesões granulomatosas observadas nas infecções fúngicas profundas, na tuberculose, na sífilis terciária ou úlceras traumáticas crônicas (Neville *et al.*, 2009).

As lesões pré-malignas da mucosa oral constituem áreas epiteliais mais prováveis de sofrerem transformações malignas do que o tecido normal e outros sítios da mucosa. Na mucosa oral, dois tipos de lesões pré-cancerosas existem, a leucoplasia e a eritoplasia (Axell *et al.*, 1996). A transformação maligna da leucoplasia oral ao carcinoma oral já foi avaliada em diversos estudos. Em um estudo envolvendo o acompanhamento durante 5 anos de 166 pacientes holandeses portadores de leucoplasia, observou-se que 2,9% desses indivíduos desenvolveram carcinoma de cavidade bucal (Schepman *et al.*, 1998). Além disso, observou-se que o aumento de risco de transformação maligna estava associado à presença de displasia de grau mais severo (Schepman *et al.*, 1998; Cowan *et al.*, 2001).

Sob exame clínico, o CECB pode ser precedido por alterações mucosas e lesões displásicas detectadas histologicamente. Inicialmente, o CECB surge como placas firmes e elevadas, ou como áreas irregulares, ásperas ou verrucosas de espessamento da mucosa, possivelmente precedidas por leucoplasia, com presença de dor mínima na fase inicial do crescimento. A lesão geralmente se mantém assintomática ou apresenta dor não condizente com o aspecto clínico (Silverman, Gorsky & Lozada, 1984; Robinson & Mickelson, 2006; Neville *et al.*, 2009).

Histopatologicamente o CECB surge no epitélio superficial, e é caracterizado pela formação de ilhas e cordões invasivos constituídos por células epiteliais malignas, que mostram diferenciação em direção a uma morfologia escamosa. A invasão é representada pela extensão irregular das células do epitélio lesado através da membrana basal para o interior do tecido conjuntivo que o sustenta. As células, cordões e ilhas são observados formando estruturas independentes no interior do tecido conjuntivo e não mostram ligação com o epitélio da superfície. Essas células podem se infiltrar até as camadas de tecido conjuntivo, muscular e ósseo subjacentes destruindo o tecido original à medida que progridem. Como as demais outras neoplasias, o CECB também pode induzir mudanças no estroma circundante e tipicamente induz à angiogênese e ao acúmulo de infiltrado inflamatório crônico (Neville *et al.*, 2009).



**FIGURA 2: Aspecto Histológico de Lesões Precursoras do Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal: A-Mucosa Bucal Normal (menor aumento); B-Displasia Bucal (médio aumento); epitélio apresenta alteração na camada basal (SETAS) e estroma apresenta grande quantidade de infiltrado de células inflamatórias. C-Carcinoma de Células Escamosas Bucal invasivo bem diferenciado (médio aumento), onde notam-se as ilhas de queratina (cabeças de seta). Ep-Tecido epitelial de revestimento, estratificado, pavimentoso, não queratinizado. Es-Estroma.**

Independente do grau de profundidade da lesão (superficial ou profundo), algumas características comuns podem ser observadas nas células do CECB, como a presença de citoplasma eosinofílico abundante, de núcleos grandes e geralmente hipercromáticos, de uma relação núcleo-citoplasma aumentada, de graus variados de pleomorfismo celular e nuclear. Observa-se processo de queratinização de células individuais ou mesmo de um grupo de células formando as “pérolas de queratina”, focos arredondados de camadas concêntricas de células queratinizadas (Neville *et al.*, 2009).

Quando presente, a destruição óssea subjacente, aparece nas radiografias com aspecto de rádio-lucidez no formato de “roído de traça” com margens mal definidas ou bordas irregulares, característica essa similar àquela observada na osteomielite. O carcinoma pode estender-se por vários centímetros ao longo de um nervo (invasão perineural) sem rompê-lo para formar uma metástase verdadeira (Neville *et al.*, 2009).

A disseminação metastática do Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal ocorre principalmente através dos capilares linfáticos para os linfonodos ipsilaterais cervicais, que geralmente passam a apresentar consistência firme a pétreo. São freqüentemente indolores à palpação e mostram-se aumentados de tamanho. Caso haja rompimento da cápsula do linfonodo e invasão do tecido circundante, esse apresentar-se-á como fixo ou com pouca mobilidade durante a palpação. Há grande freqüência de expansão metastática do CECB para os linfonodos cervicais. Os órgãos distantes mais comuns de sofrerem metástase são os pulmões, fígado e ossos, embora qualquer região anatômica do organismo possa ser acometida (Neville *et al.*, 2009).

Todos os tipos de Carcinoma Escamoso de Cabeça e Pescoço, incluindo o CECB, tendem a ser diagnosticados tardiamente devido à ausência de sintomatologia dolorosa nos estágios iniciais das lesões. Com isso, a taxa de sobrevivência é de apenas 40-50% (Berrino *et al.*, 1999; Franceschi *et al.*, 2000; Syrjänen, 2005).

O tratamento do carcinoma bucal leva em consideração as características clínicas e histopatológicas da lesão e geralmente envolve procedimentos cirúrgicos ressectivos com margens de prevenção, com ou sem remoção da rede de linfonodos. Tais procedimentos podem ainda ser associados à radioterapia e/ou à quimioterapia e são avaliados por uma equipe multidisciplinar, antes que qualquer decisão de tratamento

seja tomada (Gil & Fliss, 2009).

O prognóstico e a sobrevida do paciente com CECB dependem principalmente da presença de metástases e do número de linfonodos regionais acometidos, sendo que em muitos casos o óbito é decorrente da doença não controlada, relacionada à recorrência local do tumor primário. Na ausência de metástase, 75% dos pacientes sobrevivem pelo menos por 5 anos após o diagnóstico, enquanto que na presença de metástase e do acometimento de 3 ou mais linfonodos, a sobrevida é de apenas 13% (Brasileiro-Filho, 2000).

### **1.3. A PATOGÊNESE DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE BUCAL**

A causa do Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal é multifatorial. Nenhum agente etiológico único é bem definido ou aceito, porém alguns fatores extrínsecos e intrínsecos podem estar relacionados com o desenvolvimento dessa patologia. Como fatores *extrínsecos* podem ser citados agentes externos como o uso de tabaco com ou sem fumaça, do álcool, a presença de sífilis e para o caso dos “carcinomas do vermelhão do lábio”, a luz ultra - violeta emitida pelo Sol. Os fatores intrínsecos envolvem estados sistêmicos como anemia por deficiência de ferro, desnutrição e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Neville *et al.*, 2009).

#### **1.3.1 A ASSOCIAÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS E FÍSICOS**

Várias evidências clínicas relacionam o uso de tabaco com o desenvolvimento do câncer bucal, considerado o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do Carcinoma de cabeça e pescoço. Alguns estudos têm demonstrado que o consumo de tabaco seria dose-dependente, estando relacionado ao tempo de duração do vício. Como forma de consumo de tabaco, o seu uso sem fumaça também pode ser citado (Syrjänen, 2005; Tsantoulis *et al.*, 2007; Neville *et al.*, 2009; Scully & Bagan, 2009; Baykul *et al.*, 2010).

O consumo excessivo de álcool também tem sido relacionado ao

desenvolvimento do Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal e é citado como um dos principais fatores de risco relacionado a essa neoplasia (Franceschi *et al.*, 1990; revisão em Syrjänen, 2005). O uso simultâneo do álcool com o tabaco parece aumentar em muitas vezes o risco de desenvolvimento do CECB, sendo relacionado ao aparecimento de 75 a 85% dos casos (Syrjänen, 2005; Tsantoulis *et al.*, 2007, Ferlay *et al.*, 2010). O aumento de incidência dessa neoplasia em um número de países tem sido atribuído, pelo menos parcialmente, ao aumento contemporâneo do consumo de álcool (Ferlay *et al.*, 2010).

É bem documentado o efeito da radiação ultra-violeta sobre os lábios causando a queilose actínica e o desenvolvimento do Carcinoma do vermelhão do lábio (Neville *et al.*, 2009).

Embora alguns fatores de risco como o consumo de álcool, o tabagismo, a exposição à radiação UV possam estar envolvidos no desenvolvimento dessa lesão, outros fatores como a infecção por alguns subtipos do Vírus do Papiloma Humano (HPV) e a susceptibilidade genética também podem estar relacionados ao processo de carcinogênese (Neville *et al.*, 2009; Scully & Bagan, 2009). Assim, considera-se que a transição de uma mucosa normal para o CECB constitua um processo lento, complexo e que envolva múltiplos passos (Küffer *et al.*, 2002; Neville *et al.*, 2009). Muitos estudos apontam que possivelmente não exista um único fator isolado associado à patogênese do CECB, de forma que efeitos genéticos e ambientais poderiam estar sinergicamente implicados no desenvolvimento dessa neoplasia.

### **1.3.2 A INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Como mencionado, existe substancial evidência de que o CECB esteja freqüentemente associado ao uso do tabaco e do álcool, e aproximadamente 75% dos casos de CECB podem ser atribuídos a esses hábitos (revisão em Sugerman & Shillitoe, 1997; Scully & Bagan, 2009). Porém existem pacientes que claramente desenvolvem o carcinoma bucal na ausência de exposição a esses fatores ou mesmo na presença de alguma predisposição genética (revisão em Scully *et al.*, 2000; Mannarini *et al.*, 2009). Esses aspectos sugerem a possível participação de agentes microbianos na patogênese do carcinoma bucal.

Os HPVs são pequenos vírus tipos DNA epiteliotrópicos que podem induzir lesões hiperplásicas, papilomatosas e verrucosas no epitélio escamoso da pele e das mucosas, incluindo a mucosa oral (revisão em Tyring, 2000 e em Scully *et al.*, 2000). Os Papilomavírus humanos não são classificados por sorotipos, mas sim por genótipos, e acima de 100 tipos (aproximadamente 130) já foram identificados por seqüenciamento do gene que codifica a proteína L1 do capsídeo viral (Bernard, 2005; Doorbar, 2005; Villiers *et al.* 2004; Stanley *et al.*, 2007).

Os diversos tipos de HPV podem ser classificados pelo seu potencial em causar lesões malignas e são assim divididos em três grupos: (i) os HPVs de baixo risco (HPVs 6, 11, 26, 40, 42, 53-55, 57, 59, 66 e 68), relacionados com lesões benignas como verrugas, papilomas e condilomas; (ii) os HPVs de risco intermediário, representados pelos HPVs 33, 35, 39, 51, 52, 58 e 59; (iii) os HPVs de alto risco para o desenvolvimento de neoplasias malignas, representados pelos HPVs 5 e 8 (câncer de pele), pelos HPVs 16, 18, 31 e 45 (câncer de mucosa) (Cartwright *et al.*, 1996; Doorbar, 2005; Villiers *et al.*, 2004).

Estudos desenvolvidos por diversos grupos demonstraram a presença do DNA de HPV em amostras de Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço (revisão em Scully *et al.*, 2000; Scully 2002, Syrjänen 2005; Mannarini *et al.*, 2009). Muitos estudos desenvolvidos acerca da patogênese do CECB relacionaram o envolvimento do vírus do Papiloma Humano (HPV) no desenvolvimento tanto do câncer bucal quanto das suas lesões precursoras, a leucoplasia e a eritoplasia.

Como revisado por Syrjänen (2005), até 2003 um total de 964 biópsias de leucoplasia haviam sido analisadas em cerca de 8 trabalhos, sendo detectada a presença do DNA de HPV em 31,1% dessas lesões. Os tipos de HPV não oncogênicos 6 e 11 foram os mais prevalentes (55,8%) nessas lesões, seguidos pelos HPVs de alto-risco 16 e 18 (28,2%) (Syrjänen & Syrjänen, 1999; Syrjänen 2005). A eritoplasia consiste em lesão freqüentemente caracterizada com algum grau de displasia. Um outro estudo da literatura mostrou a presença de DNA do HPV 16 em 9 de 32 casos de eritoplasia que foram analisados (Syrjänen & Syrjänen, 1999).

Em um estudo relativamente recente de meta-análise, no qual a prevalência da infecção pelo HPV e pelos principais tipos oncogênicos foi avaliada exclusivamente

pela técnica de PCR em 5.046 casos de CCECP, a partir dos dados provenientes de 60 estudos publicados até o ano de 2004, verificou-se que a prevalência geral do DNA do HPV foi de 25,9% (intervalo de confiança de 95%). A prevalência do DNA observada de HPV foi maior em Carcinomas de Células Escamosas da Orofaringe, de cujo grupo faz parte o Carcinoma tonsilar, (35,6% de 969 casos), do que nos CECB orais (23,5% de 2.642 casos) ou nos Carcinomas de Células Escamosas da Laringe (24% de 1.435 casos). O HPV 16 correspondeu ao tipo mais comum encontrado entre os casos de Carcinomas de Células Escamosas da Orofaringe (87%), de CECB orais (68,2%) e de Carcinomas de Células Escamosas da Laringe (69,2%). De maneira oposta, o HPV 18 foi raramente detectado em tumores da Orofaringe (2,8%) em comparação aos outros sítios de CCECP (34,1%) e de CECB orais (17%). Outros tipos oncogênicos de HPV foram raramente detectados em espécimes de Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço (Kreimer *et al.*, 2005)

Embora ainda não tenha sido comprovado o papel etiológico do HPV no desenvolvimento de todos os tipos de CCECP, alguns importantes estudos já realizados comprovaram a correlação entre a presença do papilomavírus humano e a patogênese de um subgrupo de CCECP, o Carcinoma tonsilar. Esses tumores compreendem um subgrupo de tumores pobremente diferenciados com aspecto histológico basalóide, surgindo da área do anel tonsilar de Waldeyer na porção posterior da língua.

Em um estudo desenvolvido por Gillison e colaboradores (2000), a presença do DNA de HPV foi detectada em 25% das amostras de CCECP, sendo que 90% desses tumores foram HPV 16 positivos. Nesse estudo, 57% das amostras de carcinoma tonsilar apresentaram o DNA do HPV em comparação a 12% das amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal (CECB) que foram HPV positivas. Além disso, o DNA do HPV foi observado por Hibridização *in-situ* só em amostras de tumor e tecido pré-maligno, mas não no tecido normal circundante, sugerindo uma relação causal entre a presença do vírus e a patogênese dessas lesões (Gillison *et al.*, 2000). Em outro estudo desenvolvido na população italiana, confirmou-se uma maior prevalência da presença do DNA do HPV em amostras de carcinoma tonsilar (50%) em comparação à presença do DNA viral em tumores da língua (38%) e da mucosa bucal (12%) – (Badaracco *et al.*, 2000).

Em relação à detecção do HPV em amostras de CECB, as primeiras evidências

sobre o envolvimento do vírus na patogênese do câncer bucal vieram da demonstração da presença de antígenos (Syrjänen *et al.*, 1983) e DNA do HPV (Chang *et al.*, 1990) em 40 amostras de carcinoma oral.

Porém, nos últimos 20 anos, numerosos estudos foram desenvolvidos sobre a pesquisa da prevalência do DNA de HPV em amostras de CECB, nos quais verificou-se uma enorme variação na taxa de detecção do DNA viral em amostras clínicas, de 0 a 95% (revisão em Sugerman *et al.*, 1997; em Scully *et al.*, 2000; Mannarini *et al.*, 2009). Considera-se que a variação observada nos resultados encontrados em diferentes trabalhos seja decorrente de diferenças inerentes à sensibilidade dos métodos empregados e à representatividade das amostras clínicas coletadas.

Destaca-se um estudo de meta-análise que avaliou a análise global de 4680 amostras de CECB em 94 estudos, no qual verificou-se um risco de 2,5 e 4,7 vezes de encontrar o DNA de HPV em lesões pré-cancerosas da mucosa bucal e no CECB, respectivamente, em comparação à possibilidade de detecção do DNA viral na mucosa normal (Miller *et al.*, 1997). A probabilidade de detecção dos HPVs de alto risco em amostras de CECB foi 2,8 vezes maior do que a de detecção dos genótipos de baixo risco. Esses resultados fornecem evidências quantitativas de que a infecção oral por HPV, particularmente com os genótipos oncogênicos, constitui um fator de risco independente para o desenvolvimento do CECB (Miller *et al.*, 1997).

Em uma revisão publicada por Syrjänen & Syrjänen (1999), os autores avaliaram os trabalhos desenvolvidos até 1997, que foram dedicados à pesquisa do DNA do HPV por diversas técnicas em 2380 casos de carcinoma oral, sendo o DNA viral detectado em 31% dos casos. Entre 1998 e 2002, 19 estudos adicionais reportaram a presença do DNA do HPV em 12.4% de novos 2388 casos de carcinoma bucal que foram analisados (revisão em Syrjänen, 2005). Dentre os tipos de HPV pesquisados, os HPVs de alto-risco 16 e 18 foram os mais prevalentes no carcinoma oral (Snijders *et al.*, 1996; Badaracco *et al.*, 2000, Syrjänen & Syrjänen, 1999). A taxa de detecção do HPV 16 em carcinomas da orofaringe variou de 20 a 90 %; sendo essa variação considerada decorrente das diferenças do método de coleta e tipo das amostras clínicas avaliadas e das técnicas de detecção do DNA do HPV que foram utilizadas (revisão em Syrjänen, 2005).

Entretanto uma correlação definitiva entre a infecção pelo HPV na cavidade oral e a patogênese dos CCECP ainda não pôde ser completamente estabelecida, principalmente por causa da natureza transitória dessa infecção na cavidade oral, cuja origem ainda é considerada incerta. Além disso, a presença do DNA do HPV já foi demonstrada pelas técnicas de “Southern blot” e PCR em áreas de mucosa normal circundantes às lesões orais, e em 15 a 40% de amostras de mucosas clinicamente normais que foram obtidas de adultos (Jalal *et al.*, 1992; O’Regan *et al.*, 2008). Assim, como anteriormente mencionado, o único tipo de Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço cuja patogênese parece estar diretamente relacionada à infecção pelo HPV consiste no Carcinoma de Células Escamosas tonsilar.

### **1.3.3 MUTAÇÕES EM GENES ASSOCIADOS À PATOGÊNESE DO CECB**

O câncer surge como o resultado de um acúmulo de alterações genéticas que promovem uma situação de desequilíbrio dos processos de controle do crescimento celular e de diferenciação terminal. Essas alterações ocorrem principalmente em duas classes de genes que sofrem respectivamente, inativação e ativação, os genes supressores de tumor (GST) e os proto-oncogenes.

Os proto-oncogenes são genes normais que são transformados em oncogenes ativos em algumas malignidades por ação de agentes como vírus, radiação ou carcinógenos químicos. Uma vez ativados, esses genes podem contribuir para o desenvolvimento do CECB. Dentre os oncogenes freqüentemente relacionados ao desenvolvimento do carcinoma de células escamosas estão ras, myc e EGFR (revisão em Scully *et al.*, 2000; em Todd *et al.*, 2002; em Scully & Bagan, 2009).

Os genes supressores de tumor podem inibir indiretamente o desenvolvimento de tumores e geralmente são alterados ou inativados nos casos de CECB. Dentre os GST envolvidos na carcinogênese, destaca-se o gene de P53, que consiste no alvo mais freqüente de mutações em todos os tipos de tumores humanos (Hollstein *et al.*, 1991; Kozomara *et al.*, 2005). De fato, as aberrações no gene de P53 correspondem às alterações genéticas mais comumente encontradas nos carcinomas orais (Wong *et al.*,

1996; Scully & Bagan, 2009).

A P53 consiste em uma fosfoproteína nuclear que apresenta importante papel na regulação do ciclo celular, atuando especificamente no ponto de checagem (ou “check-point”) que controla a transição da fase G1 à fase S: as células apresentando danos ao DNA são impedidas de progredir nesse ponto do ciclo, sendo conduzidas ao reparo do DNA ou à apoptose. A proteína P53 tipo-selvagem (“wild - type” ou WT) apresenta um tempo curto de “meia-vida” e é expressa em baixos níveis na maioria das células e tecidos (Popovic *et al.*, 2010).

Devido a esse duplo papel na regulação dos processos celulares, P53 parece interferir nas terapias do tratamento ao câncer, como a radioterapia ou a quimioterapia, uma vez que essa proteína pode tanto aumentar os níveis de apoptose quanto regular a taxa de crescimento celular (Levine *et al.*, 1991).

A geração de mutações no gene de P53 consiste no mecanismo preferencial de transformação oncogênica de P53 (Hollstein *et al.*, 1991; Popovic *et al.*, 2010). Diversos trabalhos já foram desenvolvidos, nos quais uma ampla variedade de alterações no gene de P53 foi descrita em carcinomas de cabeça e pescoço (Wilson *et al.*, 1995; Unal *et al.*, 1999; Otswald *et al.*, 2000; Gonzáles-Moles *et al.*, 2002, Popovic *et al.*, 2010).

Outro mecanismo de inativação da proteína P53 WT consiste na interação dessa proteína com outras proteínas celulares ou com proteínas virais, como, por exemplo, a oncoproteína E6 dos HPVs de alto risco (Popovic *et al.*, 2010). Por meio dessas interações a função normal de P53 é abolida, mesmo na ausência de mutações no gene dessa proteína (Munger *et al.*, 2002; Popovic *et al.*, 2010).

Alguns autores consideram que alterações na proteína P53 poderiam conferir vantagem seletiva para a proliferação de células geneticamente instáveis (Warnakulasuriya *et al.*, 1998). Entretanto cerca de 50% dos carcinomas orais parecem apresentar o gene de P53 tipo selvagem, sugerindo que eventos de mutação em outros genes poderiam contribuir para o desenvolvimento de lesões orais malignas.

A proteína do retinoblastoma (PRb) constituiu uma das primeiras proteínas da família “pocket” a serem caracterizadas (Goodrich & Lee, 1993). Outras proteínas

membros dessa família incluem as proteínas P130 e P107 (Mayol *et al.*, 1993; Sartor *et al.*, 1999).

A proteína PRb é capaz de se ligar às quinases dependentes de ciclina ou CDKs (“cyclin-dependent kinases”) e ao fator de transcrição E2F, e assim como P53, a proteína PRb apresenta um importante papel no controle do crescimento celular (Bagchi *et al.*, 1991). A atividade de PRb é regulada por mecanismos de fosforilação e desfosforilação da proteína, que ocorrem na célula de maneira ciclo-celular dependente. A forma ativa de PRb é a desfosforilada, capaz de manter a célula na fase G1 do ciclo, enquanto que a fosforilação e a inativação de PRb (induzidas pela produção das ciclinas D1, D2 e D3 e das CDKs 4 e 6) promoveriam a progressão do ciclo da fase G1 para a fase S (Chen *et al.*, 1987). Assim, quando fosforilada pelo complexo CDK4/6-ciclina D1, a PRb liberaria o fator de transcrição E2F, promovendo a transcrição de vários genes relacionados à entrada da célula na fase S do ciclo celular.

Os níveis de ciclinas e CDKs estão freqüentemente alterados no câncer. A função dos complexos ciclinas-CDKs é controlada pela atividade de membros de duas famílias inibidoras de CDKs ou CDKIs (“Cyclin-Dependent Kinases Inhibitors”).

Os componentes da família de proteínas inibidoras de quinases (“Kinase Inhibitor Proteins” ou KIPs) incluem P21<sup>Cip1</sup>, P27<sup>Kip1</sup> e P57<sup>Kip2</sup> que são considerados inibidores universais de CDKs, capazes de se ligar e inibir a atividade de seus alvos específicos (Sherr, 1996). Os membros da família KIP são capazes de inibir a atividade de ambos complexos, ciclina D-CDK4/6 e ciclina E-CDK2 (Xiong *et al.*, 1993).

P12<sup>DOC-1</sup> consiste em um GST isolado e identificado de um modelo de carcinoma oral desenvolvido em hamster (Todd *et al.*, 1995). O gene de P12<sup>DOC-1</sup> humano é mapeado no cromossomo 12q24, que é capaz de codificar um cDNA de 1634 pb e uma proteína de 115 aminoácidos de 12,4 kDa (Shintani *et al.*, 2000). A P12<sup>DOC-1</sup> corresponde a um inibidor específico de CDK2 que possui a propriedade de se ligar e exercer regulação negativa sobre a atividade desta quinase.

Os membros da família INK4 (“Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases”) incluem P15<sup>INK4B</sup>, P16<sup>INK4A</sup>, P18<sup>INK4C</sup> e P19<sup>INK4D</sup>, que são capazes de se ligar às CDKs, CDK4 e CDK6 (Sherr & Roberts, 1995; Serrano *et al.*, 1996; Sartor *et al.*, 1999).

Como membro dessa família, a proteína P16<sup>INK4A</sup> é capaz de se associar às CDKs 4 e 6 (complexo CDK4/6), evitando assim a formação do complexo protéico (CDK4/6-ciclina D1) com as ciclinas D1, D2 ou D3, normalmente responsável pela fosforilação de PRb e impedindo, dessa forma, que a célula entre na fase S do ciclo celular (Serrano *et al.*, 1996). A expressão de P16<sup>INK4A</sup> é constantemente baixa durante a maior parte do ciclo celular, apresentando um aumento marcante na fase G1 do ciclo; a super-expressão de P16<sup>INK4A</sup> que resulta na parada do ciclo na fase G1 é dependente da presença de PRb tipo selvagem (Tam *et al.*, 1994).

A despeito da grande importância da proteína PRb no controle do “check-point” G1 do ciclo celular, mutações no gene de PRb são raras no CCECB (Yoo *et al.*, 2002). Esse fato sugere que alternativamente ao gene de PRb, a inativação de genes que codificam proteínas envolvidas na regulação de PRb, poderia estar envolvida na carcinogênese do epitélio de cabeça e pescoço.

O gene supressor de tumor CDKN2A que codifica a proteína P16<sup>INK4A</sup> está localizado na região 9p21, e é composto por 3 éxons que codificam uma proteína de 15,5 kDa e 158 aminoácidos. Essa região se encontra comumente deletada em muitos tipos de tumores humanos (Fountain *et al.*, 1992; Kamb *et al.*, 1994).

Alterações na expressão da proteína P16<sup>INK4A</sup> têm sido descritas em muitos tipos de câncer devido à presença de mutações, de deleções homozigóticas, ou de eventos de hipermetilação do gene P16<sup>INK4A</sup>. Estudos recentes têm avaliado o papel de P16<sup>INK4A</sup> como um marcador diagnóstico das lesões precursoras e do próprio câncer cervical, e muitos desses trabalhos mostraram que alterações da expressão da proteína P16<sup>INK4A</sup> estão intimamente associadas com a progressão da doença (Andersson *et al.*, 2006; Queiroz *et al.*, 2006; Masumoto *et al.*, 2006; Samama *et al.*, 2006; Ruesga *et al.*, 2006; Koscielny *et al.*, 2006; Ohta *et al.*, 2009).

## 1.4 A EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE BUCAL

Como mencionado na Introdução do presente estudo, o CECB, o tipo mais comum de câncer de cabeça e pescoço, é caracterizado por um padrão agressivo de crescimento, apresentando elevado potencial de invasão e comprometimento dos linfonodos cervicais.

Embora tenha sido observado nos últimos anos um grande avanço dos métodos terapêuticos empregados no tratamento dessa neoplasia, a taxa de sobrevivência dos pacientes com câncer bucal permaneceu praticamente inalterada nas últimas três décadas (Neville & Day, 2002; Shah *et al.*, 2009). Uma das possíveis razões para essa constatação, consiste no fato de que a prática clínica ainda é principalmente baseada na utilização de fatores prognósticos clássicos para o acompanhamento dos pacientes portadores de carcinoma bucal. Em muitos casos, esses fatores permanecem inadequados ou são incapazes em discriminar tumores do mesmo estágio clínico, mas que podem apresentar distintos desenvolvimentos clínicos, ou responder de forma diferenciada ao mesmo tratamento (Scully *et al.*, 2000; Nagpal & Das, 2002).

Dessa forma, justifica-se a procura por marcadores prognósticos biológicos que possam ser incorporados ao sistema prognóstico atualmente vigente e que, por refletirem de maneira mais adequada a diversidade biológica do carcinoma, poderiam prever de forma mais precisa o possível desenvolvimento clínico e a resposta terapêutica de um dado tumor em particular (Scully *et al.*, 2000; Nagpal & Das, 2002; Hardisson, 2003; Shah *et al.*, 2009).

Estudos moleculares realizados nos últimos quinze anos, e que foram dedicados a elucidar os aspectos moleculares envolvidos na patogênese do CCECB sugerem que vias específicas sejam relevantes no processo de desenvolvimento e progressão da doença. Esses trabalhos foram principalmente baseados na investigação de parâmetros relacionados a essas vias incluindo os parâmetros biológicos, diagnósticos e prognósticos. Esses incluem (i) fatores de crescimento e seus receptores; (ii) moléculas relacionadas à transdução de sinal; (iii) fatores de transcrição; (iv) proteínas relacionadas à proliferação e à apoptose; (v) proteínas relacionadas à hipóxia e à angiogênese e (vi) proteínas associadas à regulação do ciclo celular, como a proteína

P16<sup>INK4A</sup>.

Alterações genéticas relacionadas a inúmeros genes alvo, como o amplo espectro de mutações no gene de P53, o freqüente evento de amplificação do gene da ciclina D1 e a perda de heterozigozidade observada em diversos GST como P16<sup>INK4A</sup> têm sido avaliadas tanto em lesões displásicas pré-malignas quanto no carcinoma de cavidade bucal, buscando-se identificar uma associação relevante entre a expressão da proteína alvo em questão e o processo da carcinogênese oral (Scully *et al.*, 2000; Greer *et al.*, 2008).

Como mencionado, a proteína P16<sup>INK4A</sup>, um produto do gene CDKN2A é uma proteína supressora de tumor que inibe quinases dependentes de ciclina (CDK) impedindo a fosforilação de PRb, e apresentando, conseqüentemente, um importante papel na regulação do ciclo celular em mamíferos (Cairns *et al.*, 1995). Diversos estudos já foram conduzidos, visando analisar a correlação entre a expressão de P16<sup>INK4A</sup> e o processo da carcinogênese oral. Assim, alguns estudos analisaram a expressão dessa proteína em alguns tipos de lesões consideradas pré-malignas.

Porém os resultados provenientes desses trabalhos foram conflitantes, pois em alguns desses estudos observou-se um aumento da expressão de P16<sup>INK4A</sup> em espécimes de displasia oral (Paradiso *et al.*, 2004; Gologan *et al.*, 2005; Cunningham *et al.*, 2006; Greer *et al.*, 2008), sendo a proteína considerada um bom marcador de progressão das lesões orais (Paradiso *et al.*, 2004; Gologan *et al.*, 2005). Entretanto em outros trabalhos verificou-se uma redução da expressão de P16<sup>INK4A</sup> em amostras de lesões pré-malignas como as displasias (Pande *et al.*, 1998; Sartor *et al.*, 1999) e a leucoplasias (Buajeeb *et al.*, 2008) orais.

Da mesma forma, a análise da expressão de P16<sup>INK4A</sup> em amostras de carcinoma da cavidade bucal já foi realizada em muitos estudos, que mostraram tanto o aumento da expressão dessa proteína (Andl *et al.*, 1998; Lai *et al.* 1999; Nakahara *et al.*, 2000; Geisler *et al.*, 2002; Fregonesi *et al.*, 2003, Nemes *et al.*, 2006; Greer *et al.*, 2008) assim como uma diminuição, ou até mesmo uma perda total de P16<sup>INK4A</sup> (Pande *et al.*, 1998; Sartor *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2001; Shintani *et al.*, 2002; Muirhead *et al.*, 2006; Buajeeb *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2009) em amostras de carcinoma epidermóide bucal.

Ressalta-se que, de acordo com o nosso conhecimento, apenas um estudo foi

conduzido na literatura visando analisar a expressão de P16<sup>INK4A</sup> em amostras de CECB provenientes de indivíduos brasileiros, especialmente da população de Belo Horizonte (De Paula *et al.*, 2000).

Como destacado, vários trabalhos demonstraram que, (i) pelo fato de estar relacionada à via de inibição de desenvolvimento de tumores juntamente com a PRb e (ii) por ter a sua expressão alterada na presença de neoplasias e, conseqüentemente, com o processo de formação das lesões de CECB, a proteína P16<sup>INK4A</sup> apresenta um grande potencial para ser utilizado como um biomarcador celular capaz de predizer informações úteis relacionadas ao estadiamento, ao prognóstico e ao manejo durante o tratamento dessas lesões (Muirhead *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2006; Vairaktaris *et al.*, 2007; Greer Jr *et al.*, 2008; Supic *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2009).

Entretanto, embora diversos trabalhos já tenham sido conduzidos visando avaliar a expressão de P16<sup>INK4A</sup> tanto em lesões pré-malignas como em amostras de carcinoma bucal, os dados resultantes desses estudos, que são de grande importância clínica e epidemiológica, são conflitantes, e o verdadeiro papel dessa proteína na patogênese do carcinoma oral permanece por ser investigado.

Portanto, justifica-se o desenvolvimento de estudos que visem avaliar a expressão da proteína P16<sup>INK4A</sup>, uma das principais proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, em amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal e comparar o padrão de expressão exibido por essa proteína em amostras de carcinoma bucal com aquele obtido pela análise de tecidos normais. Da mesma forma, a comparação da expressão dessa proteína com dados clínicos e epidemiológicos de pacientes portadores de CBCE constitui importante aspecto relacionado à patogênese e epidemiologia molecular dessa modalidade mais representativa de Carcinoma bucal.

## **2. OBJETIVOS**

---

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Realizar a comparação da expressão da proteína reguladora do ciclo celular P16<sup>INK4A</sup>, entre amostras de Carcinoma Epidermóide da Cavidade Bucal (CECB) e amostras controles, assim como verificar se há variação da expressão de P16<sup>INK4A</sup>, de acordo com características clínicas e epidemiológicas dos pacientes portadores de CECB analisados.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Traçar o perfil clínico e epidemiológico dos pacientes portadores de CBCE estudados, por meio da análise dos dados clínicos (características da lesão, tempo de evolução da lesão, presença de sintomatologia dolorosa e comprometimento dos linfonodos) e epidemiológicos (etnia, idade, gênero, hábito do tabagismo e etilismo, consumo diário de cigarros) desses pacientes.
2. Avaliar em amostras de CECB e em amostras controles obtidas de indivíduos saudáveis, provenientes de pacientes originados da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, a área de expressão da proteína reguladora do ciclo celular, P16<sup>INK4A</sup>, por meio da técnica de Imunohistoquímica e da análise morfométrica para a quantificação das áreas P16 positivas.
3. Realizar a comparação da expressão da proteína P16<sup>INK4A</sup> com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide da Cavidade Bucal.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 PACIENTES**

##### **3.1.1 Pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide**

Nesse trabalho foram avaliadas 25 amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal provenientes de biópsias realizadas em pacientes atendidos (i) na Clínica de Patologia e Semiologia Odontológicas II do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e (ii) na Clínica de Cirurgia Buco Maxilo-Facial do Hospital Odilon Behrens, pertencente à Secretaria Municipal de Saúde, PBH, Belo Horizonte, MG.

Como critérios de elegibilidade para inclusão de casos no estudo foram analisados os blocos provenientes de pacientes com diagnóstico clínico ou histopatológico de Carcinoma Bucal de Células Escamosas, de ambos os sexos, de qualquer idade, sem distinção do grupo social, que tiveram ou ainda tenham hábito(s) tabagistas e ou etilistas. Destaca-se que o presente trabalho trata-se de um estudo retrospectivo.

Para levantamento dos dados anátomo-patológicos da lesão (sítio, tamanho, sintomatologia, coloração), o Laudo patológico de cada amostra foi consultado na Ficha do Exame de cada paciente no Arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da UFMG (FO-UFMG). Para levantamento dos dados clínicos (tempo da doença, comprometimento linfonodal, sintomatologia) e epidemiológicos (idade, sexo, hábito do tabagismo e do etilismo) dos pacientes analisados no presente estudo, foram consultados os Prontuários (Ficha Clínica) de cada paciente arquivados na FO-UFMG e no SAME – Serviço de Arquivo Médico do Hospital Odilon Behrens.

### 3.1.2 Amostras controle negativo

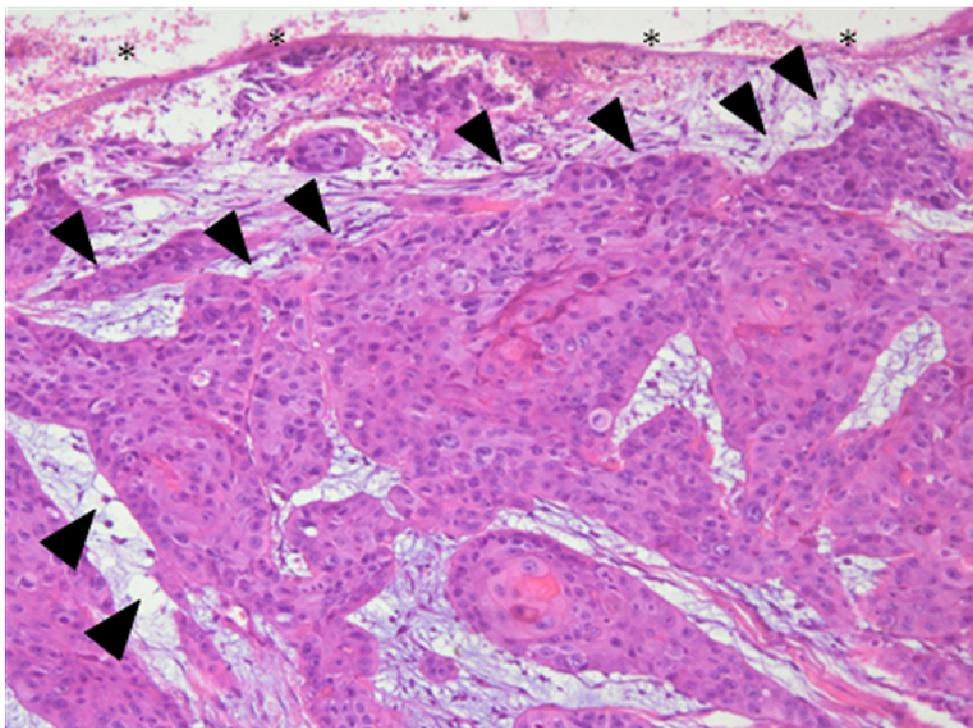
Também foram avaliadas no presente estudo 9 amostras de mucosa oral sadias, obtidas de pacientes que não apresentavam nenhuma patologia oral visível, sendo portanto considerados indivíduos saudáveis. Tais amostras foram utilizadas como controles negativos do presente estudo, e foram coletadas durante procedimentos de exodontias de terceiros molares inclusos, onde havia necessidade de acerto de tecido gengival. Tais cirurgias foram realizadas no bloco cirúrgico da Faculdade de Odontologia da UFMG durante atividades do Projeto de Extensão coordenado pelos professores Wagner Henrique de Castro e Luiz César Alves Fonseca.

As amostras utilizadas como controle negativo foram coletadas da região de trígono retromolar de pacientes que possuíam terceiro molar totalmente incluso. Com esse procedimento, evitou-se coletar tecido gengival que poderia apresentar qualquer infecção ou inflamação, nem mesmo a própria e característica inflamação basal presente no sulco gengival. Ressaltamos que as amostras foram coletadas apenas em casos onde havia necessidade de correção de tecido.

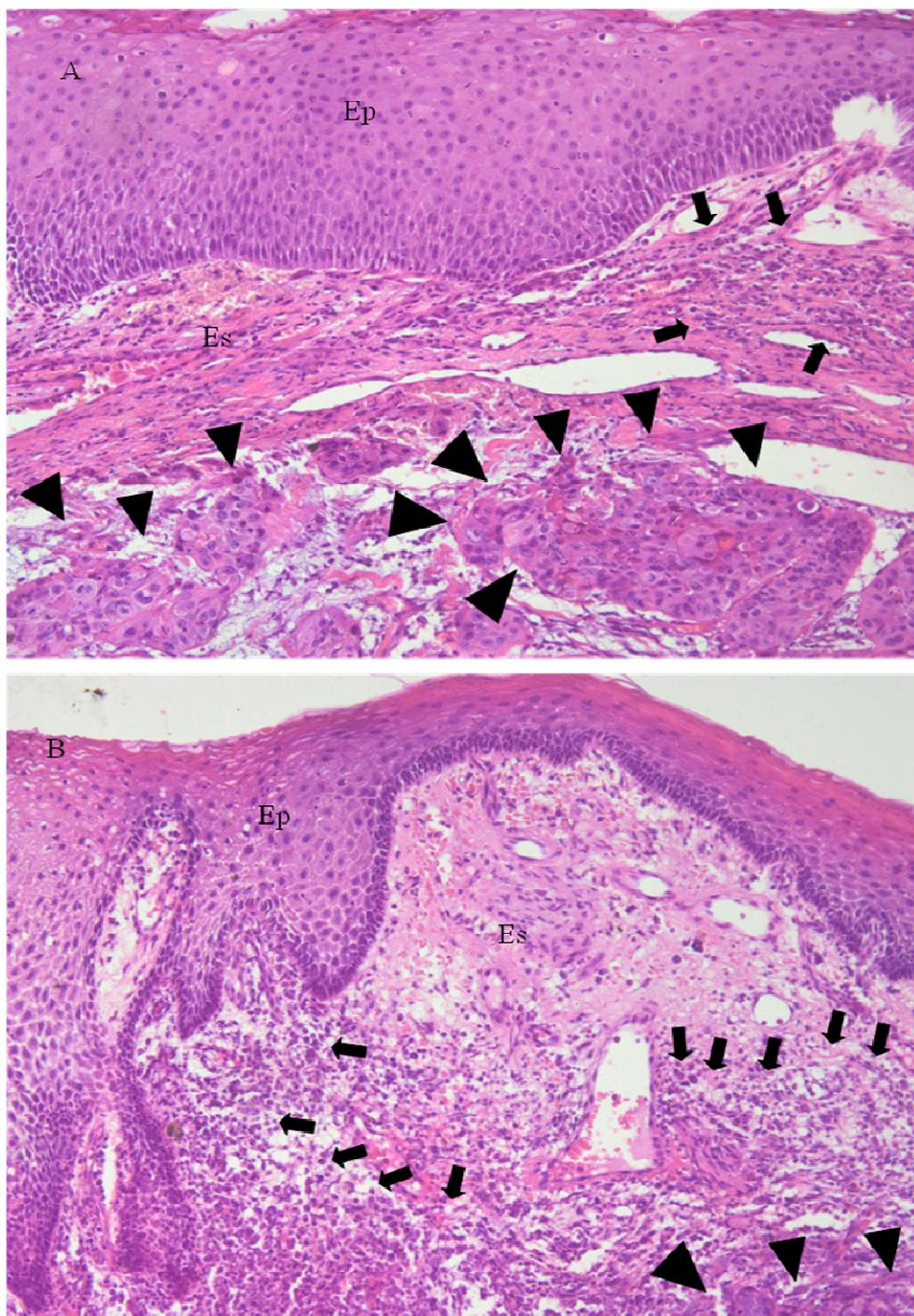
Durante o presente estudo, levantou-se a possibilidade de utilizarmos o próprio tecido epitelial de cada paciente, adjacente à área da lesão como controle negativo para a reação de Imunohistoquímica. Porém alguns aspectos nos levaram a descartar tal possibilidade, discutidos a seguir.

Em relação à forma de coleta das amostras, destaca-se que existem duas formas básicas de realizá-las, a biópsia excisional e a biópsia incisional. A primeira é utilizada em casos de lesões muito pequenas, em que, ao invés de se retirar apenas um pequeno fragmento, extirpa-se a lesão como um todo, garantindo assim, inclusive, que se tenha material suficiente para a análise histopatológica. No segundo caso, realiza-se uma incisão que retira apenas um fragmento de lesões maiores, geralmente com no máximo 1,5 centímetro e sem margem de extensão, de forma a preservar as estruturas adjacentes à lesão e garantir certo conforto ao paciente. Ressalta-se, ainda, que o Cirurgião-Dentista não realiza tratamento de lesões cancerosas, não sendo, portanto, de sua competência, realizar qualquer procedimento cirúrgico para remoção de qualquer lesão com suspeita de carcinoma.

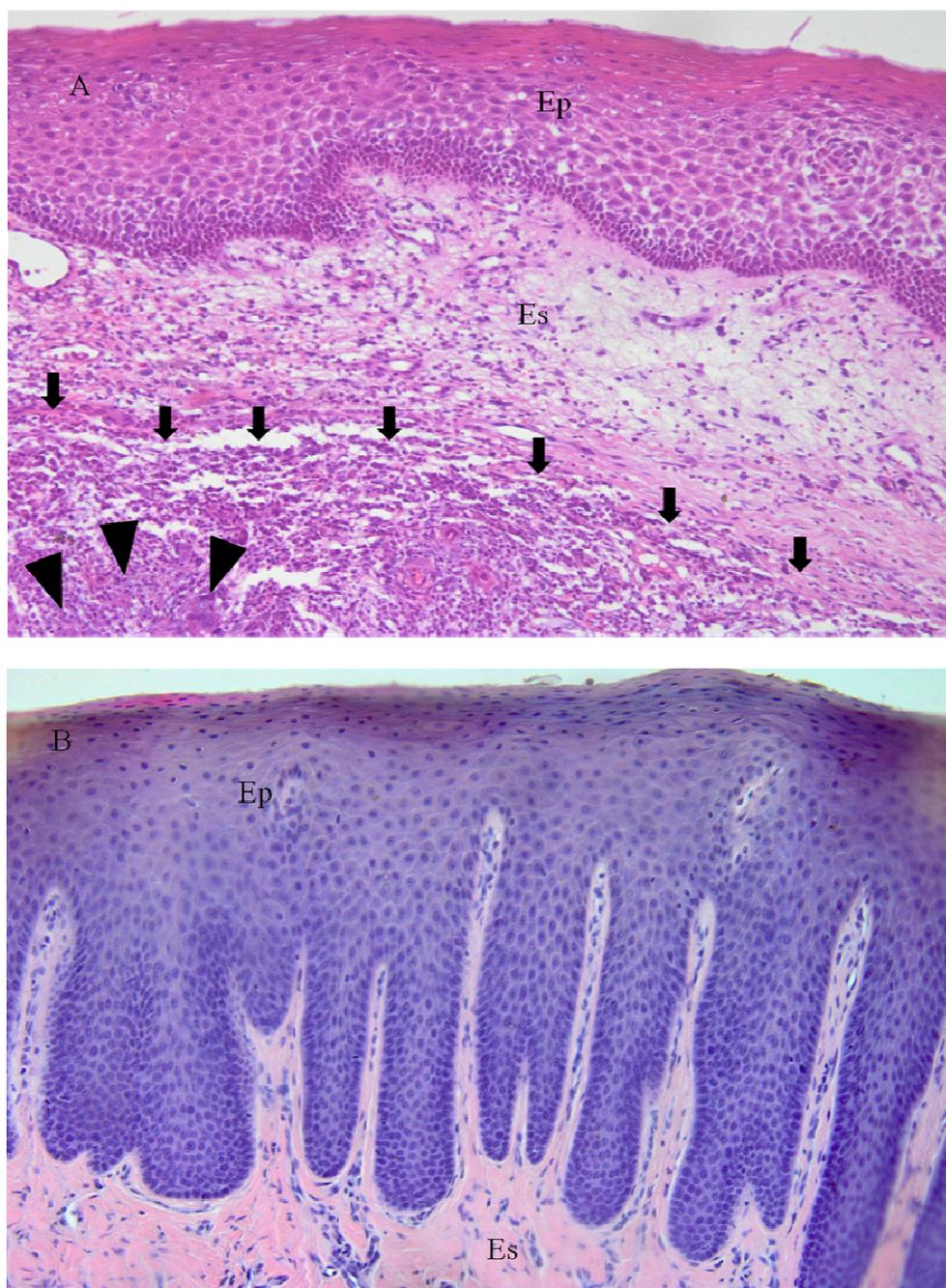
Pela análise das fichas dos pacientes, e posterior análise histológica das amostras de CECB utilizadas nesse estudo, observou-se que a grande maioria dessas eram correspondentes à biópsias incisionais e que, como próprio dessa técnica, além de serem fragmentos pequenos, não possuíam, em sua maioria, tecido epitelial que pudesse servir como controle negativo para a reação de imunohistoquímica (FIGURA 3). Nos poucos casos onde encontrou-se uma porção de tecido epitelial adjacente, foi observada presença marcante de células inflamatórias na região subjacente devido à proximidade com a lesão cancerosa infiltrada (FIGURA 4-A e B e FIGURA 5-A). Essa característica nos levou a acreditar que mesmo que essas regiões de epitélio se apresentassem com a sua morfologia preservada, poderia haver a presença de alguma alteração em nível molecular que tornaria esse tecido um controle negativo não confiável.



**FIGURA 3: Região sem epitélio de revestimento e presença de lesão cancerosa infiltrativa. \* - Região que deveria conter tecido epitelial de revestimento, pavimentoso, estratificado, não queratinizado. As cabeças de seta indicam lesão cancerosa infiltrativa. Coloração de Hematoxilina e Eosina aumento de 100x.**



**FIGURA 4: A e B - Regiões com presença de epitélio com morfologia preservada, porém com estroma subjacente apresentando quantidade acentuada de células inflamatórias e lesão cancerosa infiltrativa. As CABEÇAS DE SETA indicam lesão cancerosa infiltrativa. As SETAS indicam regiões com presença acentuada de células inflamatórias. Ep - Tecido epitelial de revestimento, pavimentoso, estratificado, não queratinizado. Es - Estroma. Coloração de Hematoxilina e Eosina aumento de 100x.**



**FIGURA 5: A - Região com presença de epitélio com morfologia preservada, porém com estroma subjacente apresentando quantidade acentuada de células inflamatórias e lesão cancerosa infiltrativa. B - Tecido epitelial de revestimento, pavimentoso, estratificado, não queratinizado, saudável, de região de trígono retromolar. As CABEÇAS DE SETA indicam lesão cancerosa infiltrativa. As SETAS indicam regiões com presença acentuada de células inflamatórias. Ep - Tecido epitelial de revestimento, pavimentoso, estratificado, não queratinizado. Es - Estroma. Coloração de Hematoxilina e Eosina aumento de 100x.**

Devido a essas razões, apesar das diferenças observadas (como região, número de camadas e função) entre o tecido epitelial de revestimento estratificado pavimentoso não queratinizado da região de trígono retromolar (**FIGURA 5-B**) e os demais tipos de epitélios encontrados na cavidade bucal, consideramos que o primeiro seria, nesse caso, a melhor escolha para ser utilizado no presente estudo, como amostra de controle negativo, e por possuir ainda, características histológicas semelhantes aos demais epitélios.

Para que ocorresse a coleta das amostras de controle negativo, houve consentimento por parte dos pacientes e estes, no momento em que assinaram um termo de consentimento, foram claramente informados dos propósitos do trabalho que seria realizado, bem como da finalidade das amostras coletadas (**ANEXO 1**).

O presente estudo foi submetido ao COEP - UFMG (Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais) e foi aprovado sob o número de protocolo Parecer **ETIC 394/04** (**ANEXO 2**).

### **3.2 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA**

A análise da expressão da proteína reguladora do ciclo celular P16<sup>INK4A</sup> foi analisada por meio da técnica de imunohistoquímica indireta, utilizando o anticorpo primário Anti-P16<sup>INK4A</sup> humana; anticorpo monoclonal de camundongo, Clone AB6 (Neomarkers, Fremont CA, EUA). O protocolo utilizado para a realização da técnica de Imunohistoquímica é descrito a seguir.

Os cortes de tecidos medindo 7µm de espessura foram desparafinizados em 3 banhos com xilol por 20 minutos e reidratados através de uma série graduada de etanol (100-70%) por 10 minutos cada. Os cortes posteriormente passam por uma etapa em solução de PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline) por 30 minutos, e após essa etapa realizou-se a reativação antigênica das amostras onde as lâminas contendo os cortes histológicos foram mergulhadas em solução de tampão citrato pH 6,0 e fervidas em Banho Maria por 30 minutos. Após o processo de reativação as lâminas foram deixadas resfriando à temperatura ambiente sobre a bancada por 30 minutos, mergulhadas na própria solução de tampão citrato pH 6,0. Após resfriamento, os cortes histológicos

passaram por uma etapa de bloqueio de ligações inespecíficas, no qual foram mergulhados em solução contendo 2% de PBS-BSA (“Bovine Serum Albumine) preparada com 4 gramas de BSA em 200ml de 1X PBS, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida os cortes foram então incubados “overnight” a 4°C com o anticorpo primário. No dia seguinte, após a lavagem em 1X PBS, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena onde foram mergulhados em solução contendo 8ml de Peróxido de Hidrogênio e 192ml de 1X PBS por 30 minutos. Em seguida procedeu-se com o protocolo do Kit de revelação Dako LSAB2 System-HRP (Dako North America, Inc. CA, EUA) onde as amostras foram incubadas por 60 minutos à temperatura ambiente com uma solução “pronta para o uso” contendo o anticorpo secundário anti-camundongo conjugados com Biotina, seguida de lavagem com 1X PBS e incubados por mais 60 minutos em solução, também “pronta para o uso“, contendo Estreptoavidina. Realizou-se novamente a lavagem das lâminas em 1X PBS e procedeu-se à revelação da reação, utilizando-se 199ml de solução de 1X PBS contendo 0,06 gramas de DAB (3, 3'-Diaminobenzidina) e 1ml de peróxido de hidrogênio por 10 minutos. Seguindo o protocolo, procedeu-se lavagem das lâminas novamente em 1X PBS e para a contra-coloração mergulhou-se as lâminas em solução de Hematoxilina de Harris por 5 segundos, seguida de lavagem em água corrente por 10 minutos. Após a contra-coloração foi feita desidratação dos cortes em etanol variando a gradação de 70 a 100% por 10 minutos em cada solução e a diafanização em 3 banhos de xilol 10 minutos cada, procedendo em seguida a montagem das lâminas com Entellan e lamínula de vidro.

### **3.3 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA ANÁLISE DA PROTEÍNA P16<sup>INK4A</sup>**

Com o objetivo de padronizar-se a técnica de Imunohistoquímica para análise da expressão de P16<sup>INK4A</sup> em amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal, alguns experimentos foram realizados, dentre esses: (i) uma curva de diluição para otimização do uso do anticorpo primário anti- P16<sup>INK4A</sup>, e (ii) verificação de possível reação inespecífica dos anticorpos secundários. Para a otimização do uso do anticorpo primário anti-P16<sup>INK4A</sup> foram testadas as diluições de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800, com o tempo de incubação “overnight” à temperatura de 4°C. Em todos os experimentos utilizamos o período de incubação de 1 hora à temperatura ambiente para o anticorpo secundário e de 1 hora também à temperatura ambiente para a solução contendo Estreptoavidina, seguindo a recomendação do fabricante.

Da mesma forma, utilizando-se um protocolo similar ao descrito acima, realizou-se um experimento de padronização do anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup> com uma amostra contendo lesão cervical (NIC III ou Neoplasia Intra - epitelial Cervical grau III) que era sabidamente positiva para a proteína P16<sup>INK4A</sup>, sendo mantidas todas as condições do experimento anterior, inclusive os pontos de diluição. Destaca-se que o nosso Laboratório dispunha de um grande número de lâminas contendo cortes da referida amostra de NIC III que poderiam ser utilizadas no presente projeto. Assim, visando garantir a reprodutibilidade dos nossos resultados, utilizou-se como controle positivo de cada experimento de Imunohistoquímica realizado nesse estudo, uma lâmina da amostra de lesão cervical NIC III.

### **3.4 CAPTURA DE IMAGENS E ANÁLISE MORFOMÉTRICA**

Todos os cortes histológicos submetidos às reações imunohistoquímicas foram visualizados pela objetiva de 40X para digitalização das imagens de 40 campos por meio da micro - câmera JVC TK-1270/RGB (Tokyo, Japan), perfazendo uma área total de 2,13x106  $\mu\text{m}^2$  de tecido analisado em cada caso. A área positiva para P16<sup>INK4A</sup> foi obtida através da seleção dos pixels da marcação imunohistoquímica, criação de uma imagem binária e obtenção da área em  $\mu\text{m}^2$ . Todas as medidas foram obtidas pelo

software KS300 do analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Germany). A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e a definição das condições de morfometria é a descrita por Caliari, 1997.

### **3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Após a captura das imagens por microscopia de luz e posterior análise dessas imagens por meio do Software KS300, os dados foram avaliados pela técnica de correlação de Mann-Whitney (teste de duas amostras não paramétricas), por se tratar de uma disposição de dados que não se enquadrava em uma curva normal em forma de sino quando se cria um gráfico com a distribuição dos mesmos.

Avaliou-se ainda no presente estudo, a correlação existente entre a expressão de P16<sup>INK4A</sup> e os dados clínicos (tempo de evolução da lesão, presença de sintomatologia dolorosa e comprometimento dos linfonodos) e epidemiológicos (etnia, idade, gênero, hábito do tabagismo e etilismo, consumo diário de cigarros) dos pacientes portadores de CECB, assim como as características da lesão (sítio, morfologia e coloração da lesão). Por se tratar da análise de variáveis dicotômicas, utilizou-se o Teste Exato de Fisher na última avaliação.

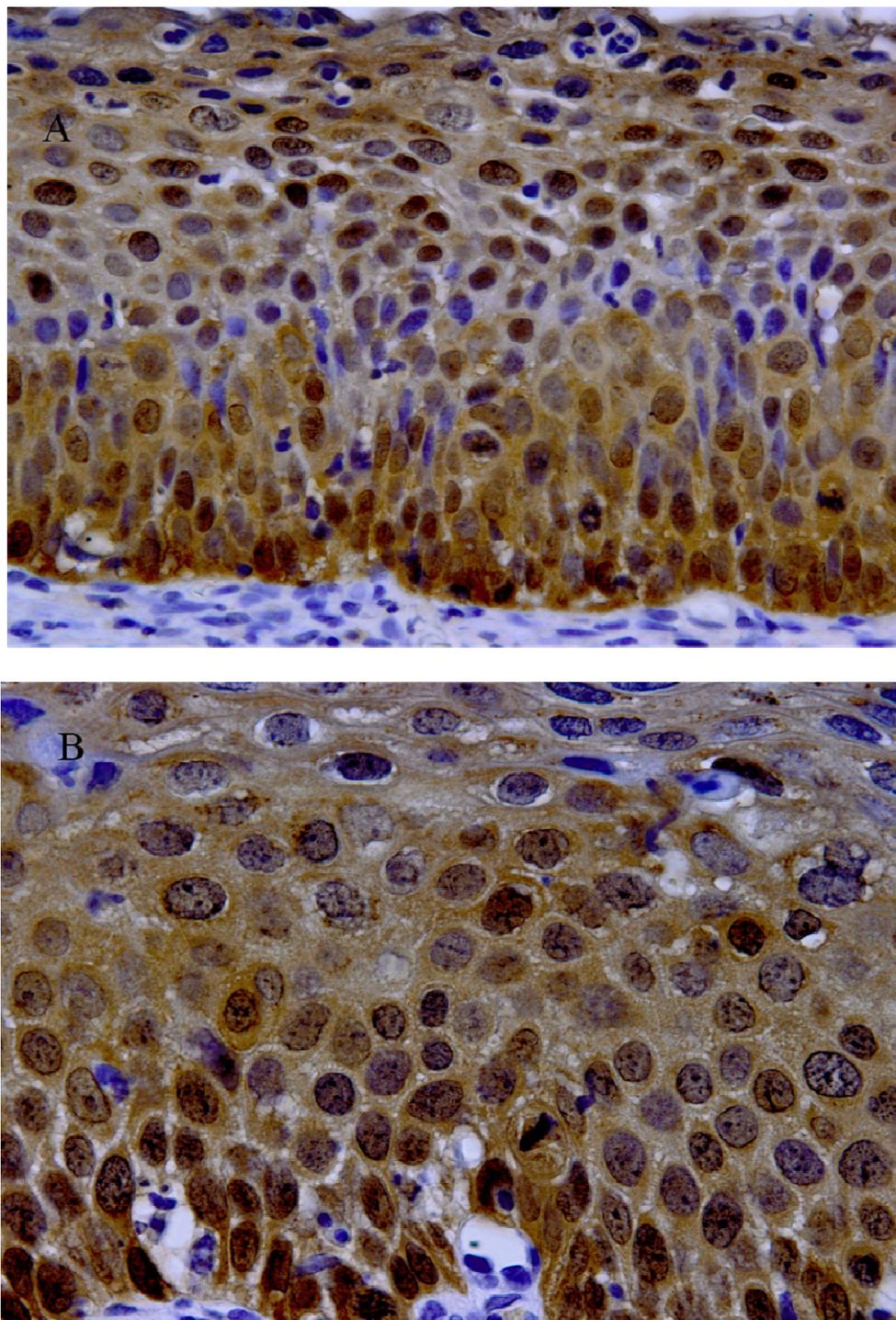
## 4. RESULTADOS

---

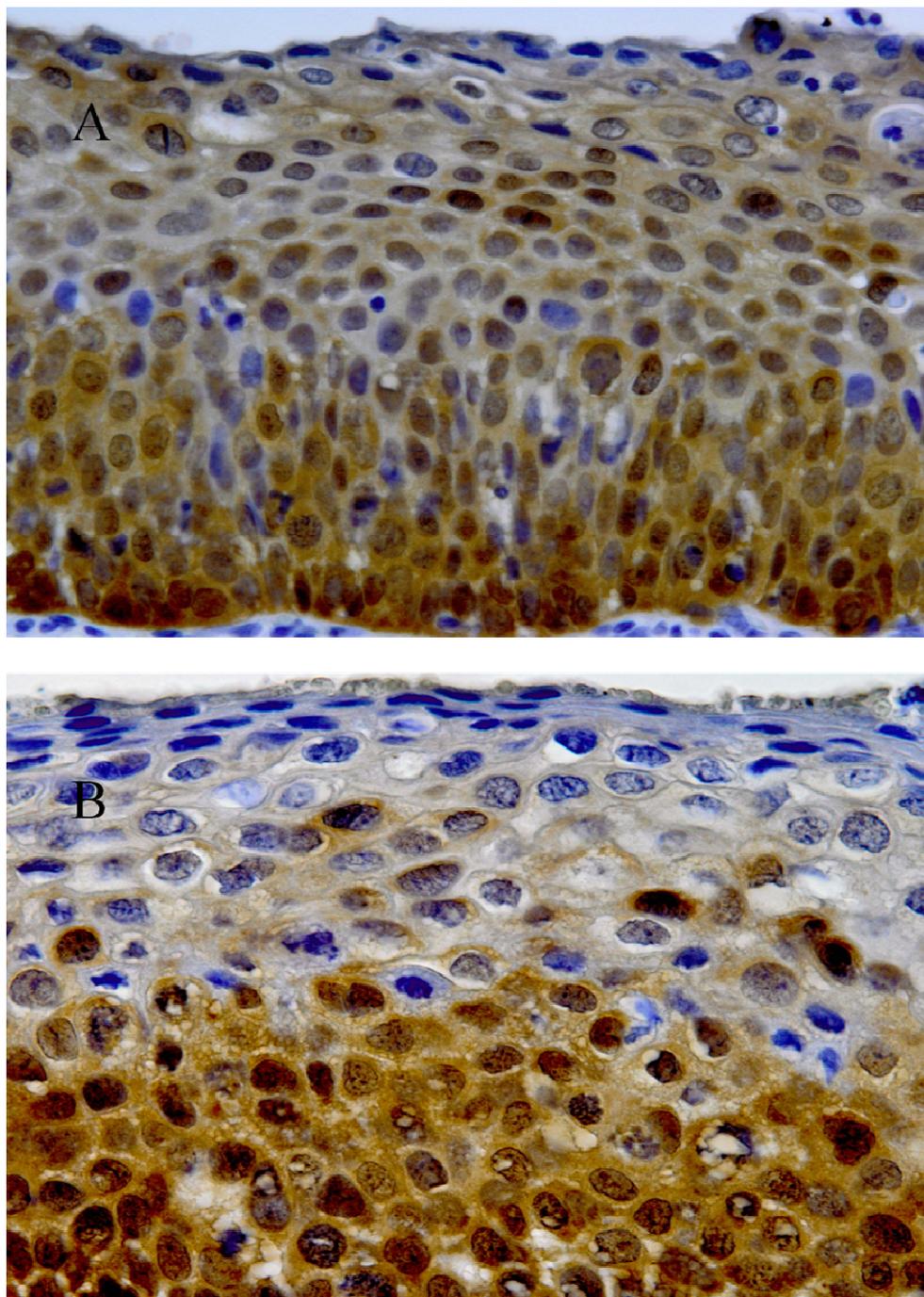
### 4.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Com o objetivo de padronização da técnica de Imunohistoquímica para a avaliação da expressão de P16<sup>INK4A</sup> nas amostras controle e de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal analisadas nesse estudo, alguns experimentos foram realizados, sendo esses: (i) uma curva de diluição para a otimização do uso do anticorpo primário (anti-P16<sup>INK4A</sup>) e (ii) verificação de possível reação inespecífica do anticorpo secundário.

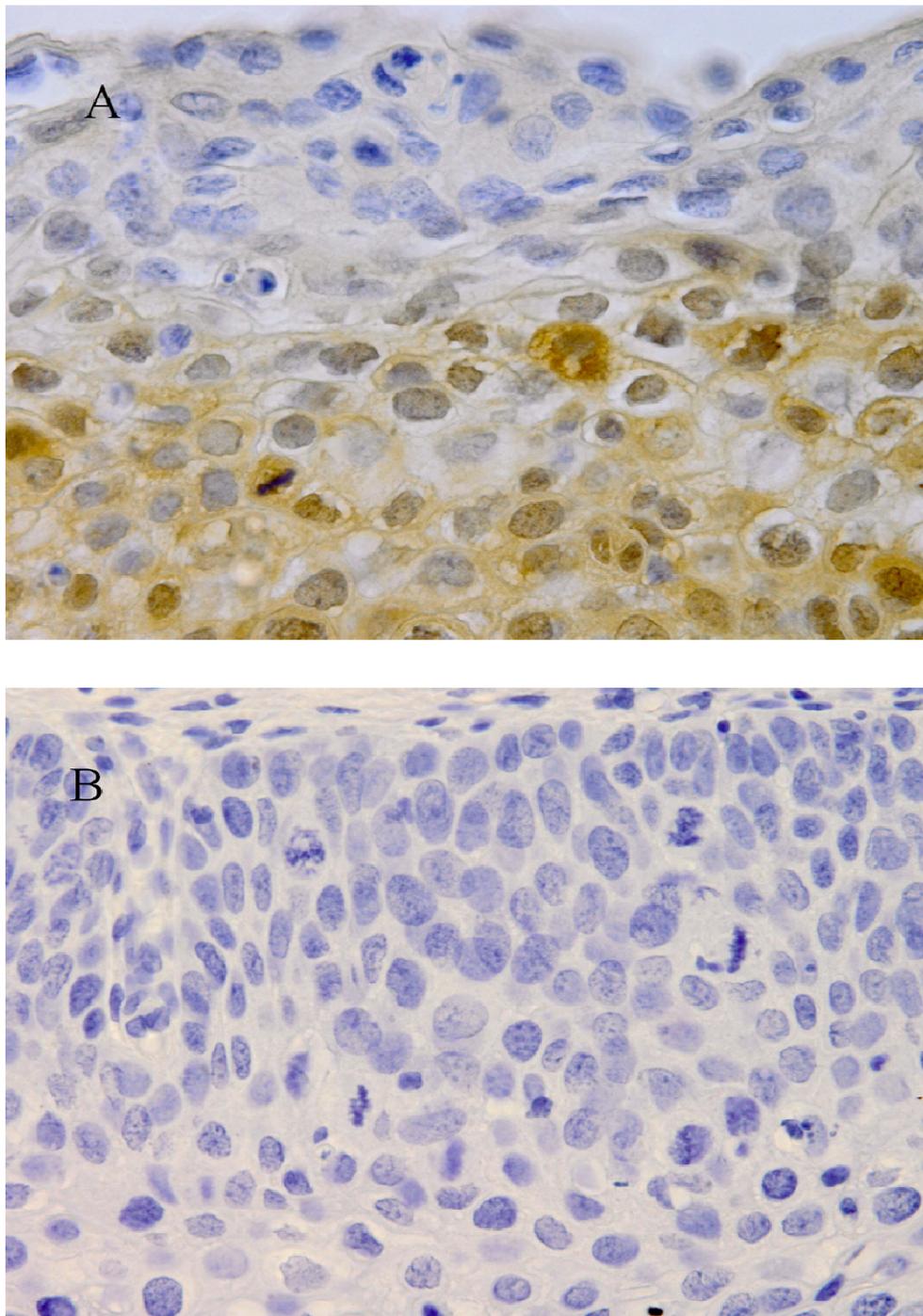
Para a otimização do uso do anticorpo primário foram testadas as diluições de 1:50, 1:100 (**FIGURA 6 – A e B**), 1:200, 1:400 (**FIGURA 7 – A e B**) e 1:800 (**FIGURA 8 – A**) com o tempo de incubação “overnight” a 4°C, conforme recomendações do fabricante. Tomando-se como base os critérios acima mencionados e a intensidade de marcação entre as diluições testadas considerou-se que as diluições de 1:50 a 1:400 (**FIGURA 6 – A e B e FIGURA 7 – A e B**) mostraram os melhores resultados. Considerando que pouca diferença na intensidade de marcação foi observada entre essas 4 distintas diluições, e que havia preservação das características morfológicas das células pelo uso de uma maior diluição do anticorpo primário, optou-se pela utilização do anticorpo primário anti-P16<sup>INK4A</sup> na diluição de 1:400 (**FIGURA 7-B**). Além disso, por meio do uso do anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup> na diluição de 1:400 (**FIGURA 7-B**), verificou-se uma redução do “background” observado na diluição do anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup> a 1:200 (**FIGURA 7-A**) e um aumento da intensidade da marcação em comparação aquela obtida pelo uso do anticorpo na diluição de 1:800 (**FIGURA 8-A**).



**FIGURA 6:** Curva de diluição do anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup>, em secções histológicas de uma amostra cervical de NIC III (Neoplasia Intraepitelial Cervical grau III), utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica. A-1:50; B-1:100. Aumento de 400X.



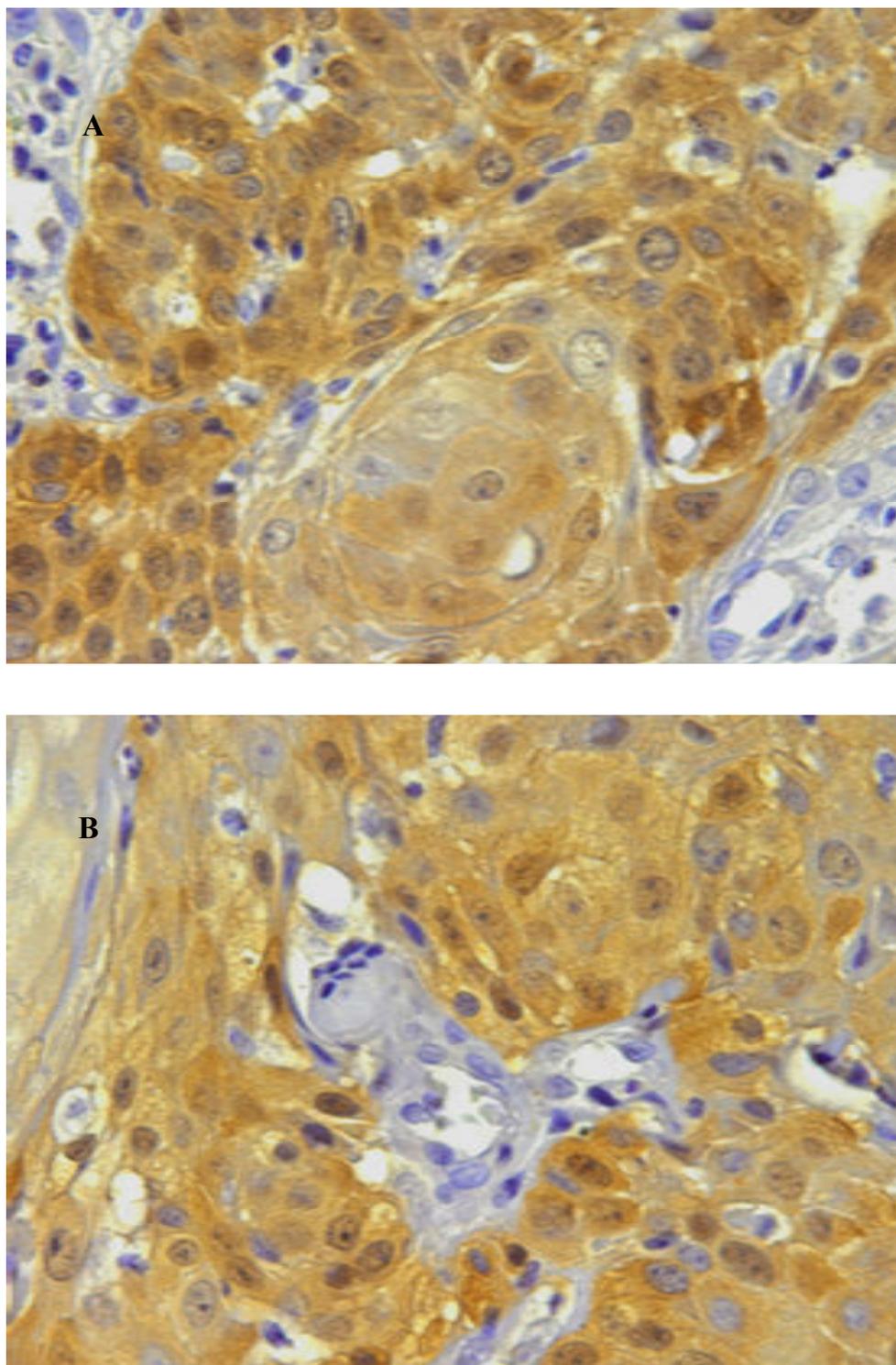
**FIGURA 7:** Curva de diluição do anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup>, em secções histológicas de uma amostra cervical de NIC III (Neoplasia Intraepitelial Cervical grau III), utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica. A-1:200; B-1:400. Aumento de 400X.



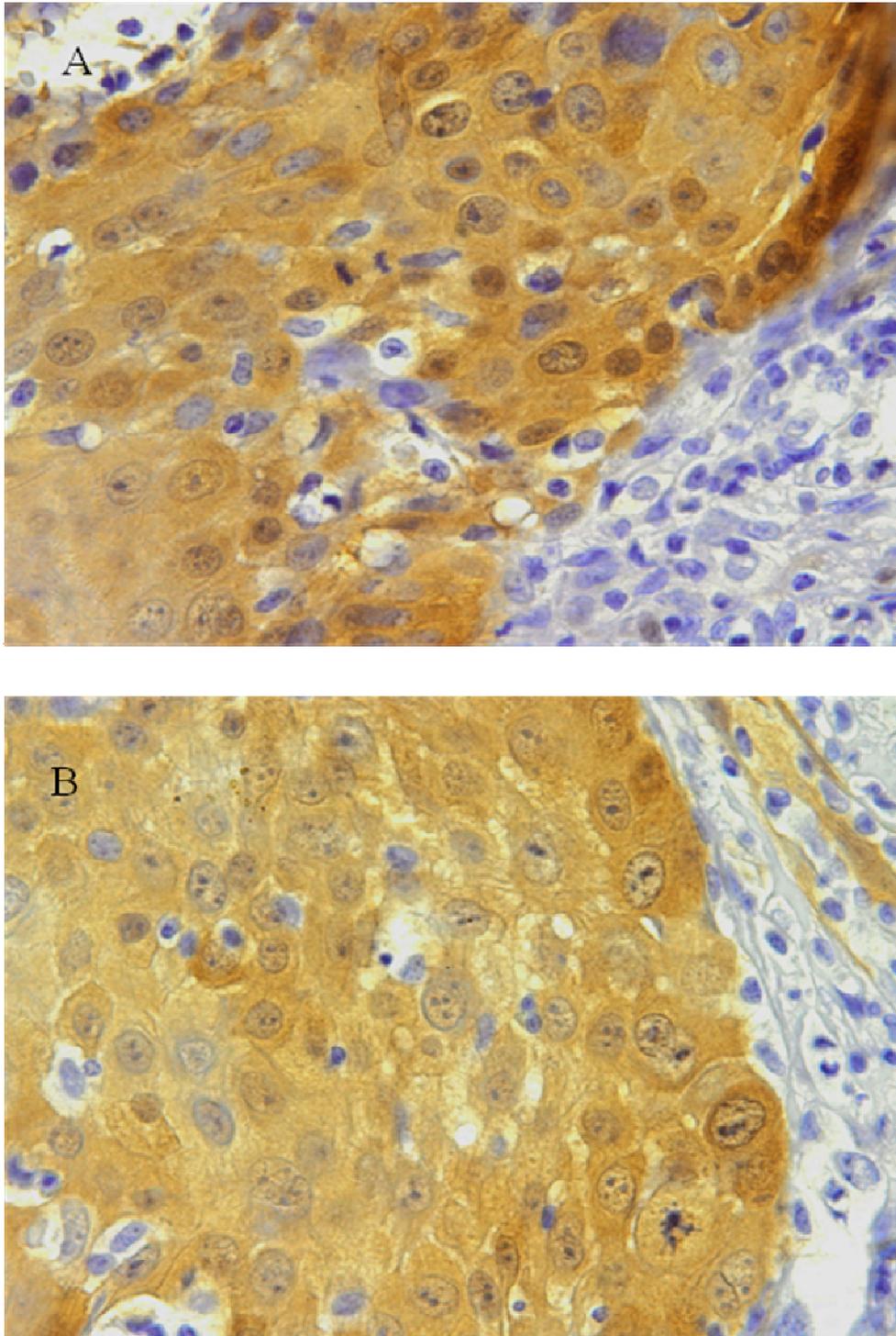
**FIGURA 8: Curva de diluição do anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup>, em secções histológicas de uma amostra cervical de NIC III (Neoplasia Intraepitelial Cervical grau III), utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica. A-1:800; B-Omissão do Anticorpo Primário. Aumento de 400X.**

Para verificar-se a existência de uma possível reação inespecífica desenvolvida pelos anticorpos secundários, realizou-se um experimento no qual o anticorpo primário anti-P16<sup>INK4A</sup> foi substituído pela solução de bloqueio (PBS/BSA 2%). Destaca-se que nenhuma marcação inespecífica foi observada (**FIGURA 8-B**). Assim, adotou-se esse procedimento como o controle negativo da reação, de forma que em cada experimento realizado, um corte de NIC III (Neoplasia Intraepitelial Cervical de Grau III) foi introduzido como controle negativo da reação na qual o anticorpo primário era substituído como descrito acima. Da mesma forma, como controle positivo da reação a cada experimento também era utilizada uma lâmina de lesão tipo NIC III processada normalmente utilizando-se o anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup> na diluição de 1:400 (**FIGURA 7-B**).

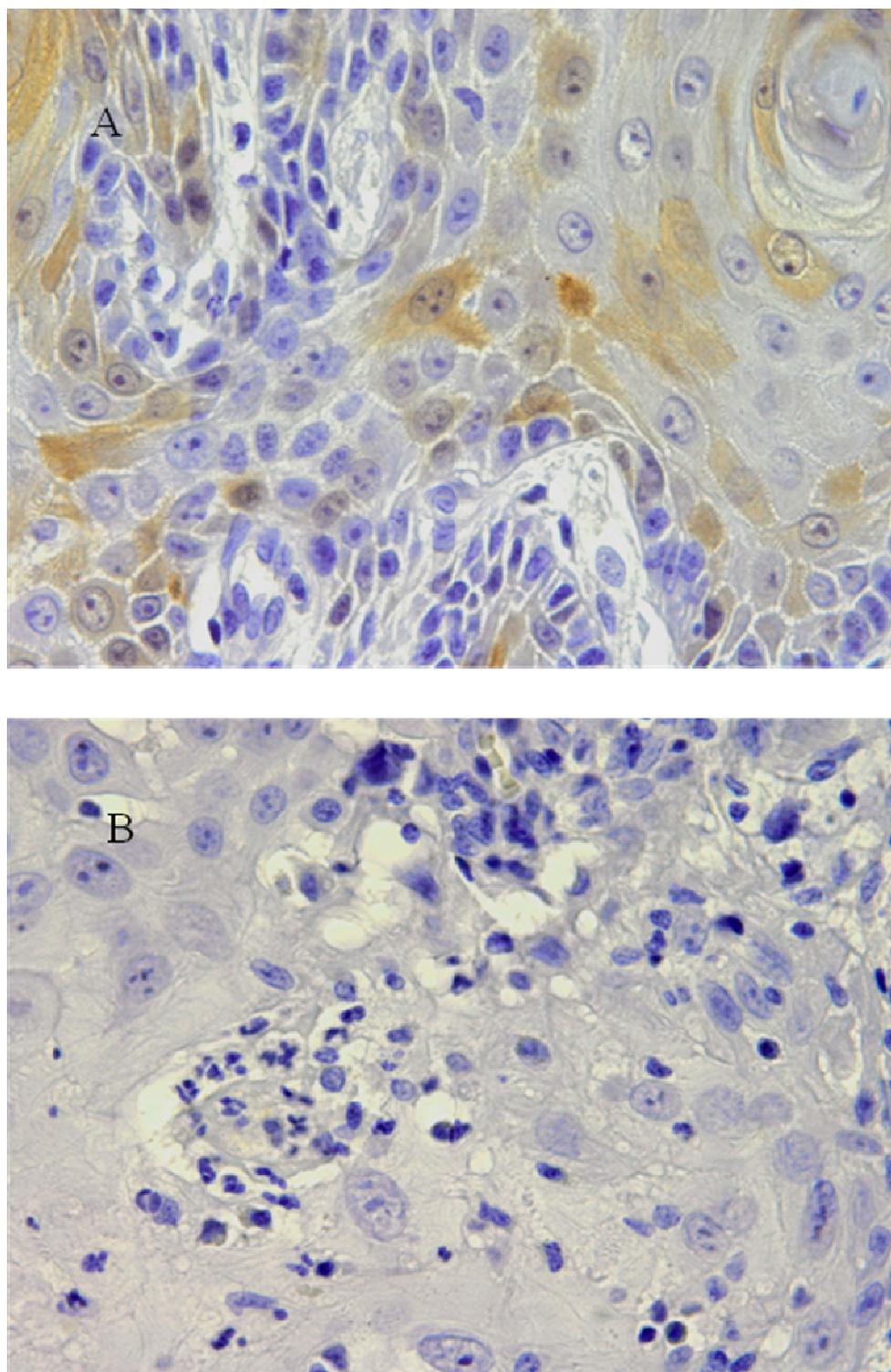
Para garantirmos ainda a eficácia da reação de Imunohistoquímica para a análise das amostras de Carcinoma Epidermóide, realizou-se o mesmo experimento de padronização anterior com uma amostra de CECB, mantendo-se as diluições de 1:50, 1:100 (**FIGURA 9-A e B**), 1:200, 1:400 (**FIGURA 10-A e B**), 1:800 e a omissão de anticorpo primário (**FIGURA 11-A e B**). Verificou-se marcação satisfatória nas diluições de 1:50 a 1:400 (**FIGURA 9-A e B e FIGURA 10-A e B**). Na diluição de 1:800 encontrou-se uma diminuição da marcação fato que poderia comprometer a análise (**FIGURA 11-A**). Da mesma forma ao verificado no experimento anterior, não foi observada a presença de qualquer reação inespecífica quando o anticorpo primário foi omitido (**FIGURA 11-B**).



**FIGURA 9:** Curva de diluição do anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup>, em secções histológicas de amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica. A-1:50; B-1:100. Aumento de 400X. Marcação positiva em tons de cor marrom.



**FIGURA 10: Curva de diluição do anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup>, em secções histológicas de amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica. A-1:200; B-1:400. Aumento de 400X. Marcação positiva em tons de cor marrom.**

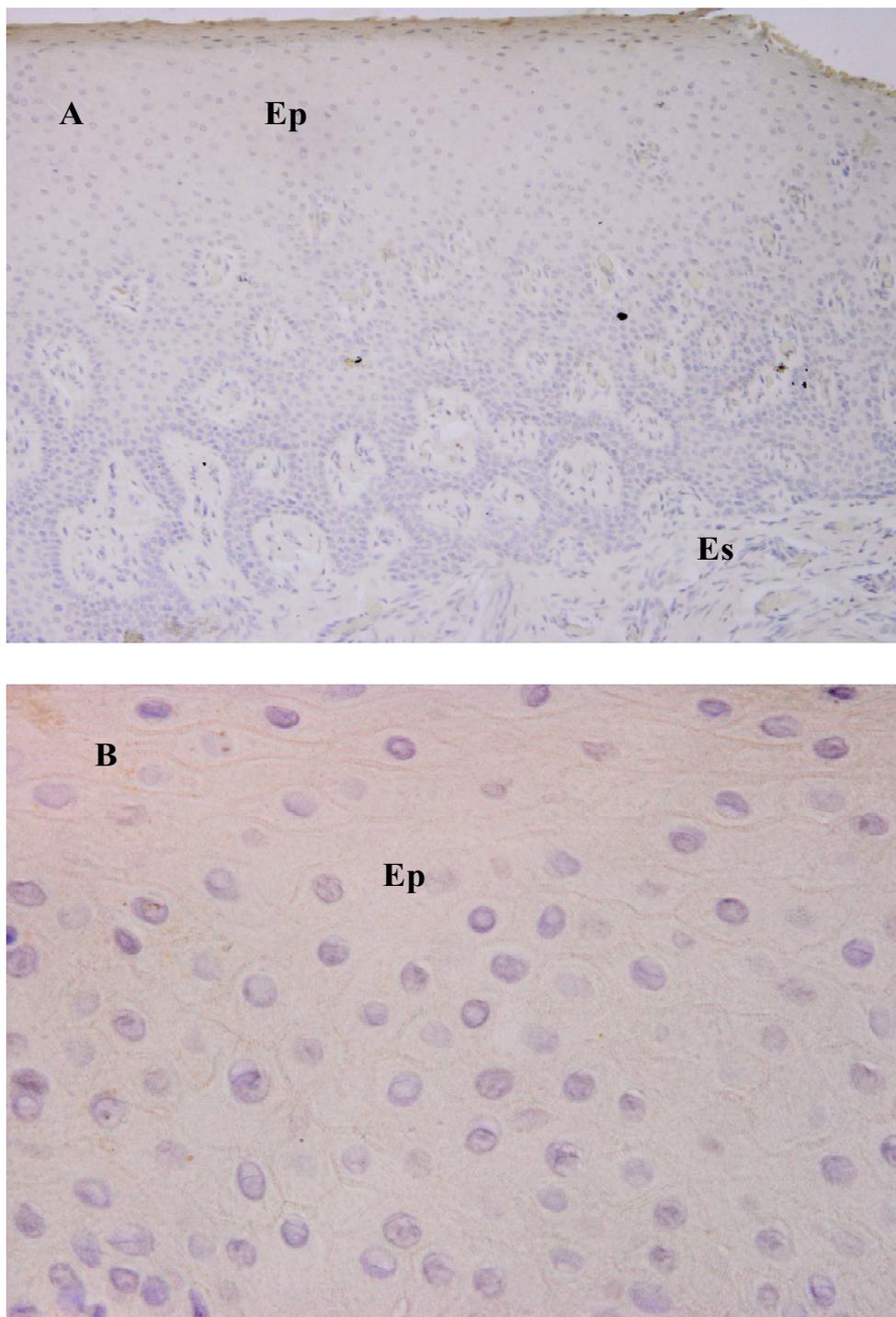


**FIGURA 11: Curva de diluição do anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup>, em secções histológicas de amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica. A-1:800; B-Omissão do Anticorpo Primário.. Grande perda de marcação na diluição de 1:800 (A) e nenhuma marcação quando houve omissão do anticorpo primário (B). Aumento de 400X. Marcação positiva em tons de cor marrom.**

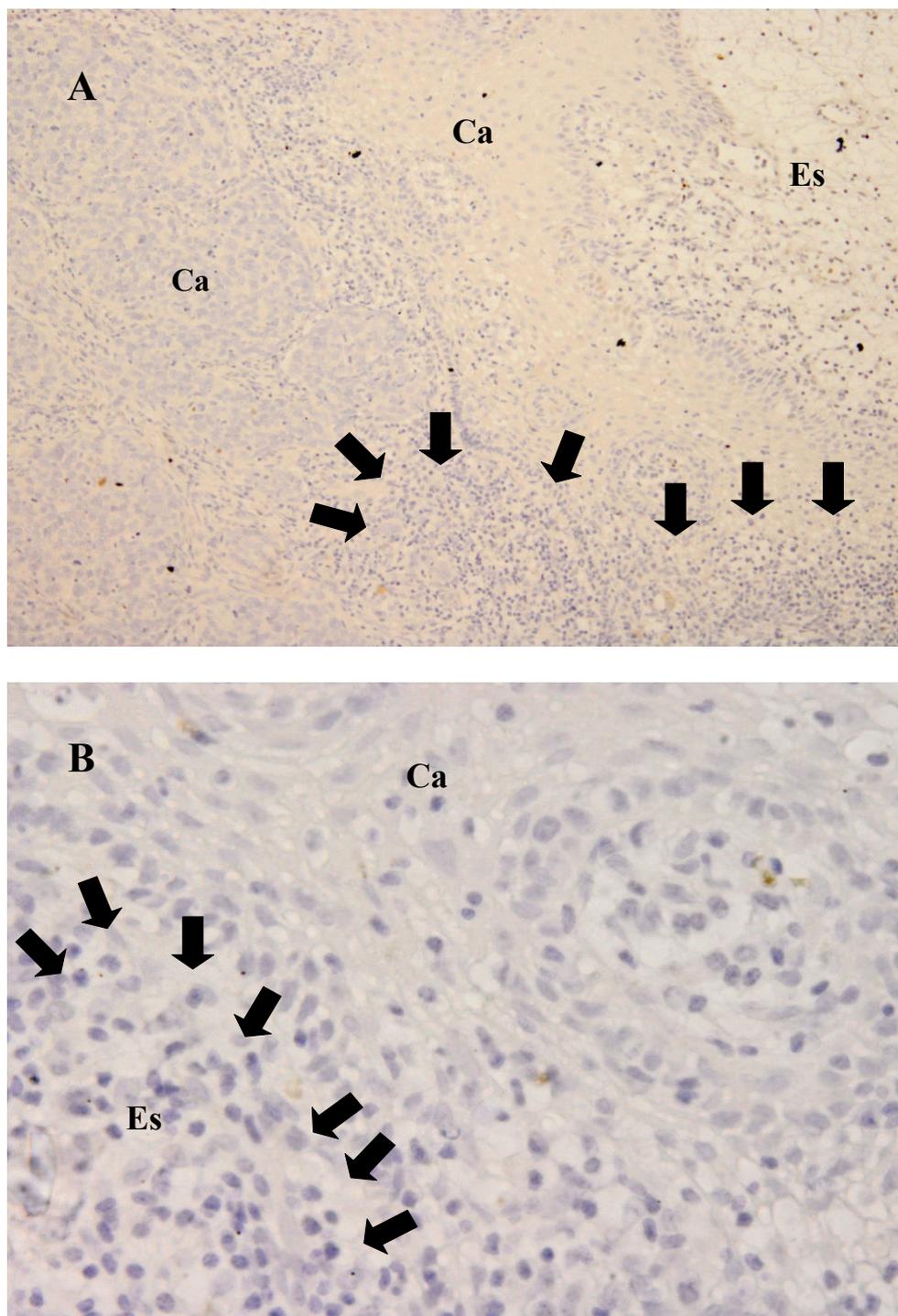
## 4.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16<sup>INK4A</sup> EM AMOSTRAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE BUCAL

Após a etapa de padronização da técnica de Imunohistoquímica procedemos à análise das amostras que seriam avaliadas no presente estudo. Um total de 34 amostras, sendo essas 25 amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal e 9 amostras controle negativos, foram analisadas quanto à imunorreatividade da proteína P16<sup>INK4A</sup> tomando-se como base os critérios de marcação acima mencionados (**FIGURAS 6 a 11**).

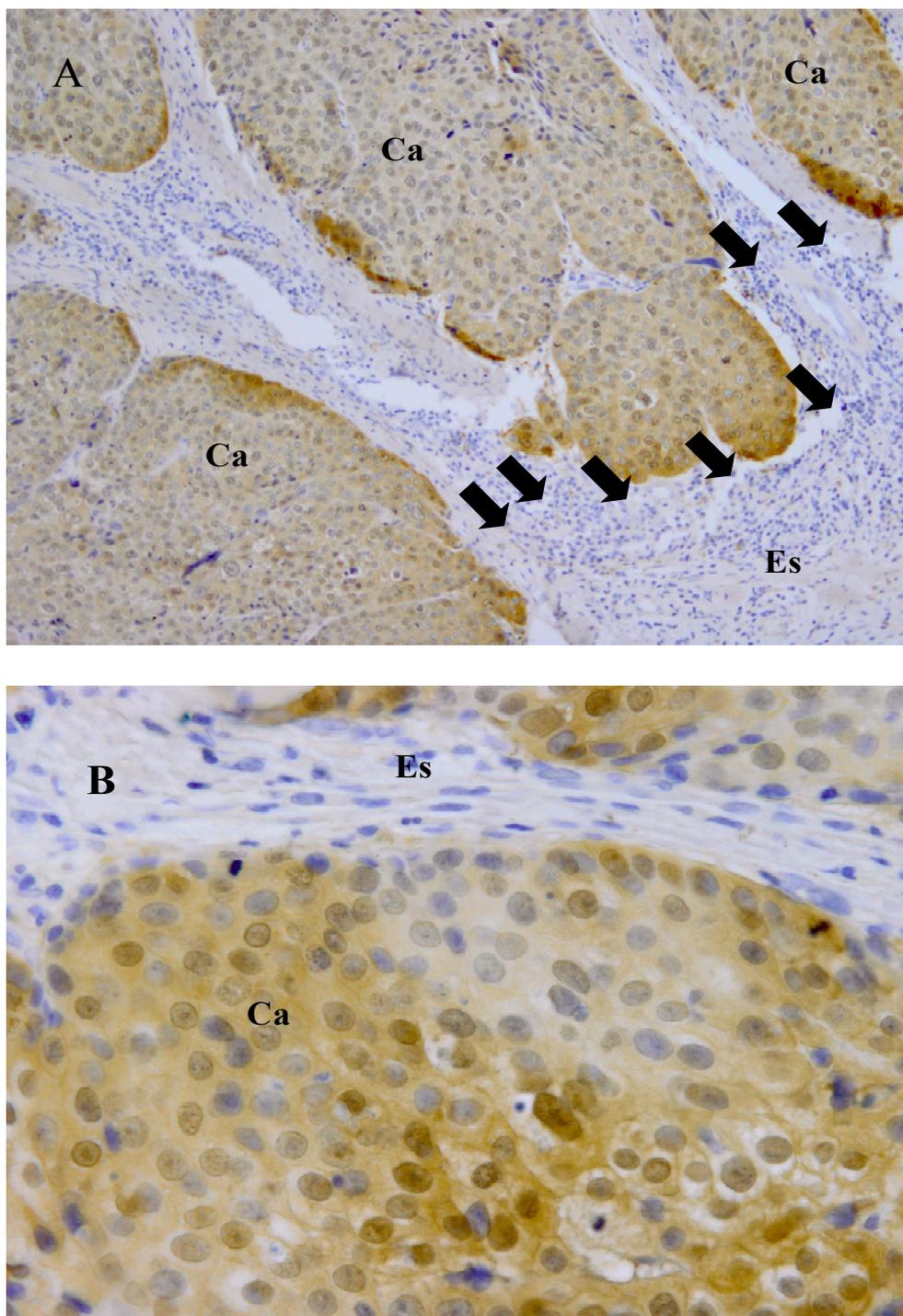
Destaca-se que nenhum tipo de marcação para a proteína P16<sup>INK4A</sup> foi observada nas 9 amostras controle negativo (**FIGURA 12**). Dentre as 25 amostras de CECB analisadas pudemos identificar o padrão de marcação considerado positivo (**FIGURA 14**). Em algumas amostras de Carcinoma de Células Escamosas pudemos observar campos exibindo características histopatológicas típicas de amostras de CBCE, que, no entanto, não apresentaram qualquer marcação para a proteína P16<sup>INK4A</sup> (**FIGURA 13**). Na maioria das amostras de carcinoma bucal identificou-se uma marcação nítida para a proteína (**FIGURA 14**). As amostras de CBCE apresentando os dois padrões foram quantificadas quanto à área de marcação e esses dados utilizados na análise estatística.



**FIGURA 12:** Marcação do anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup> em secções histológicas de amostras Controle e de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica. A e B - Amostra controle negativo. A-Aumento de 100x; B-Mesmas amostra presente em A, porém em aumento de 400x. As SETAS indicam infiltrado de células inflamatórias. Ca – Carcinoma invasivo. Ep- Tecido epitelial de revestimento, estratificado, pavimentoso, não queratinizado. Es- Estroma.

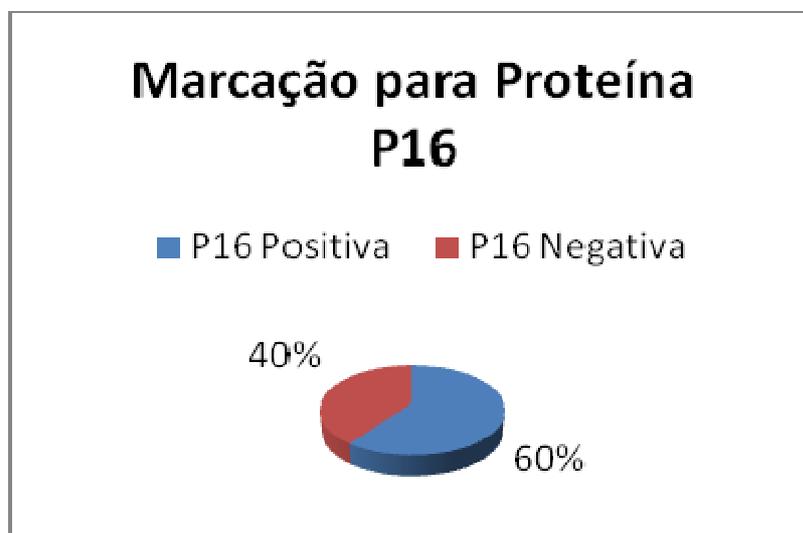


**FIGURA 13:** Marcação do anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup> em secções histológicas de amostras Controle e de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica. A e B - Amostras de CECB: região sem marcação para o anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup>. A- Aumento de 100x; B-Mesma amostra presente em A, porém em aumento de 400x. As SETAS indicam infiltrado de células inflamatórias. Ca – Carcinoma invasivo. Ep- Tecido epitelial de revestimento, estratificado, pavimentoso, não queratinizado. Es- Estroma.



**FIGURA 14:** Marcação do anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup> em secções histológicas de amostras Controle e de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica. A e B - Amostras de CECB: marcação bastante evidente para o anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup>. A-Aumento de 100x; B-Mesma amostra de A, porém em Aumento de 400x. As SETAS indicam infiltrado de células inflamatórias. Ca – Carcinoma invasivo. Ep- Tecido epitelial de revestimento, estratificado, pavimentoso, não queratinizado. Es- Estroma.

Após a análise das lâminas observamos ainda que 60% delas foram positivas para a proteína P16<sup>INK4A</sup> de acordo com o **GRÁFICO 1**.



**GRÁFICO 1: Porcentagem de amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal imuno-reativas para a proteína P16<sup>INK4A</sup>.**

Na **TABELA 1**, podemos observar quais amostras foram positivas para a proteína P16<sup>INK4A</sup>. Essa tabela ainda mostra qual a área total de marcação dessa proteína para os 40 campos capturados e a média de marcação por campo. Esses dados foram utilizados como base para, através de análise estatística com teste de Mann-Whitney, gerar a **TABELA 2**.

**TABELA 1: Relação da área total de marcação da proteína P16<sup>INK4A</sup> (40 campos) por amostra e média da área de marcação por campo**

<b>P16<sup>INK4A</sup> - Soma dos Campos e Média das Áreas de Marcação</b>					
	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Amostra 4</b>	<b>Amostra 5</b>
<b>SOMA</b>	0	1739,76	28950,39	181289,35	0
<b>MÉDIA</b>	0	84,87	1412,21	8843,38	0
	<b>Amostra 6</b>	<b>Amostra 7</b>	<b>Amostra 8</b>	<b>Amostra 9</b>	<b>Amostra 10</b>
<b>SOMA</b>	810299,73	71649,77	0	316001,57	3816,85
<b>MÉDIA</b>	39526,82	3495,11	0	15414,71	186,19
	<b>Amostra 11</b>	<b>Amostra 12</b>	<b>Amostra 13</b>	<b>Amostra 14</b>	<b>Amostra 15</b>
<b>SOMA</b>	60566,95	81893,61	33919,16	0	71400,63
<b>MÉDIA</b>	2954,49	3994,81	1654,59	0	3482,96
	<b>Amostra 16</b>	<b>Amostra 17</b>	<b>Amostra 18</b>	<b>Amostra 19</b>	<b>Amostra 20</b>
<b>SOMA</b>	41998,25	0	0	0	0
<b>MÉDIA</b>	2048,70	0	0	0	0
	<b>Amostra 21</b>	<b>Amostra 22</b>	<b>Amostra 23</b>	<b>Amostra 24</b>	<b>Amostra 25</b>
<b>SOMA</b>	60440,9	678782,16	90716,82	0	161171,6
<b>MÉDIA</b>	2948,34	33111,32	4425,21	0	7862,03
	<b>Controle 1</b>	<b>Controle 2</b>	<b>Controle 3</b>	<b>Controle 4</b>	<b>Controle 5</b>
<b>SOMA</b>	0	0	0	0	0
<b>MÉDIA</b>	0	0	0	0	0
	<b>Controle 6</b>	<b>Controle 7</b>	<b>Controle 8</b>	<b>Controle 9</b>	
<b>SOMA</b>	0	0	0	0	
<b>MÉDIA</b>	0	0	0	0	

#### 4.2.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA EXPRESSÃO DE P16<sup>INK4A</sup>

Após a captura das imagens por microscopia de luz e posterior análise dessas imagens por meio do Software KS300, os dados foram avaliados pela técnica de correlação de Mann-Whitney, sendo obtidos os seguintes resultados descritos a seguir na TABELA 2.

Ao efetuarmos a análise da área de marcação para o anticorpo anti-P16<sup>INK4</sup> em uma quantidade fixa de campos capturados (40) em cada amostra, verificou-se que mesmo em amostras de CECB nas quais pode ser observada na maioria dos campos uma marcação evidente para o anticorpo anti-P16<sup>INK4A</sup>, alguns campos dessas amostras

não apresentaram marcação para o anticorpo utilizado. Portanto, segundo avaliação prévia observou-se que os valores obtidos no presente estudo não se enquadravam em um padrão normal de distribuição, havendo assim, a necessidade de utilização de um teste não-paramétrico para a análise estatística dos dados. Além disso, quando o grupo controle foi incluído na análise, nenhuma marcação de P16<sup>INK4A</sup> pôde ser observado que os valores das áreas de marcação foram sempre iguais a zero, fato que já sugeria diferença entre as amostras, mesmo antes da realização da análise estatística pelo teste de Mann-Whitney.

**TABELA 2: Expressão de P16<sup>INK4A</sup> em Amostras controles e em Amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal**

<b>Amostras Controle</b>	<b>Amostras com Câncer</b>
0 <sup>a</sup> ± 0	2694,6 <sup>b</sup> ± 6452,6

**Legenda: a e b: as diferenças entre as letras demonstram diferença estatística pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05).**

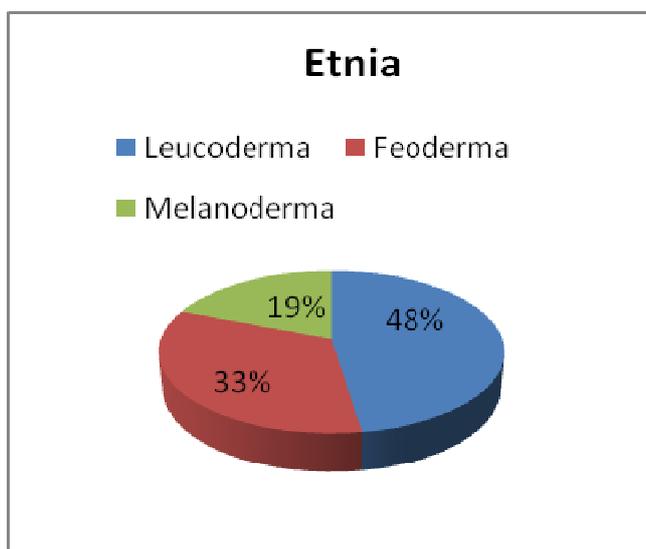
Após a aplicação do teste comprovamos então que existe diferença significativa, quanto a área de expressão de P16<sup>INK4A</sup>, entre amostras controle e amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal.

### **4.3 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS PACIENTES E DADOS CLÍNICOS DAS LESÕES**

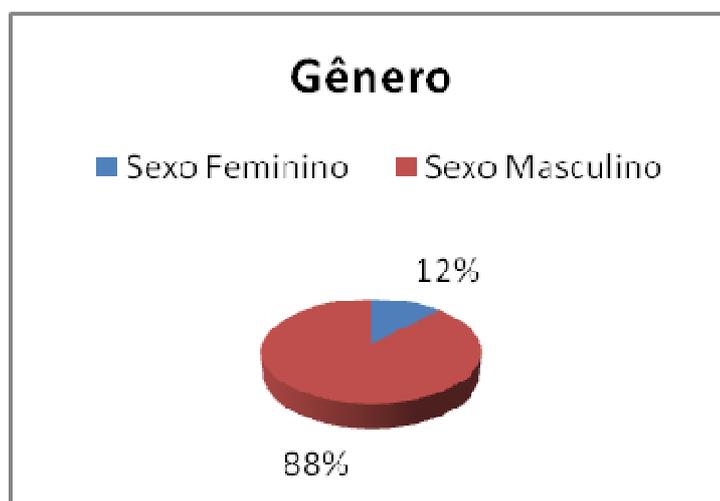
Após análise das fichas clínicas dos pacientes provenientes tanto da Faculdade de Odontologia da UFMG quanto do Hospital Municipal Odilon Behrens, foi possível realizar o levantamento dos dados epidemiológicos desses pacientes e, posteriormente analisar a correlação desses dados com a expressão de P16<sup>INK4A</sup> obtidas nas lesões correspondentes a cada paciente.

A maioria dos pacientes portadores de CECB era composta de indivíduos leucoderma (brancos) (48%) ou feoderma (morenos) (33%) como exibido no

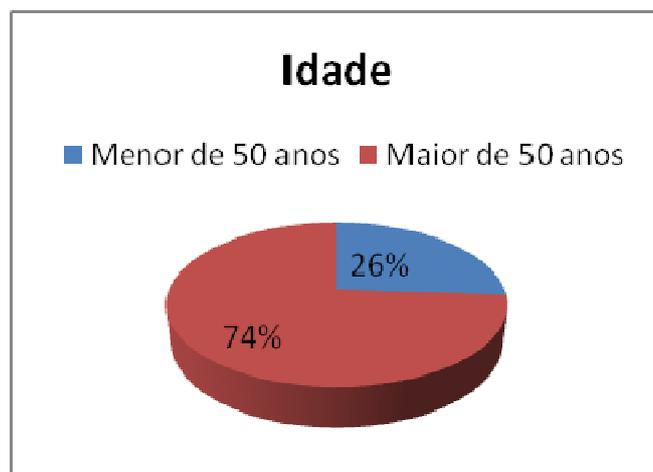
GRÁFICO 2.



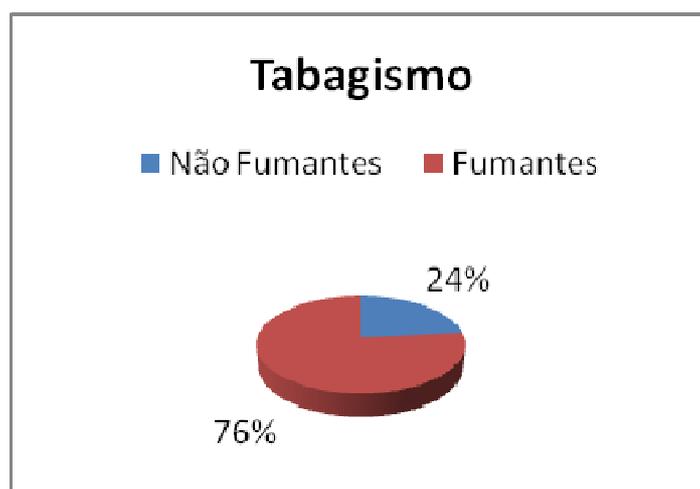
**GRÁFICO 2 – Distribuição dos pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal de acordo com a cor da pele.** Verificou-se, também, que a maioria dos pacientes eram homens (88%), com idade superior a 50 anos (74%), fumantes (76%), e etilistas (73%) como nos mostram os **GRÁFICOS 3 a 6**. Dentre os pacientes fumantes, a maioria deles consumia entre 11 e 20 cigarros ao dia (**GRÁFICO 7**).



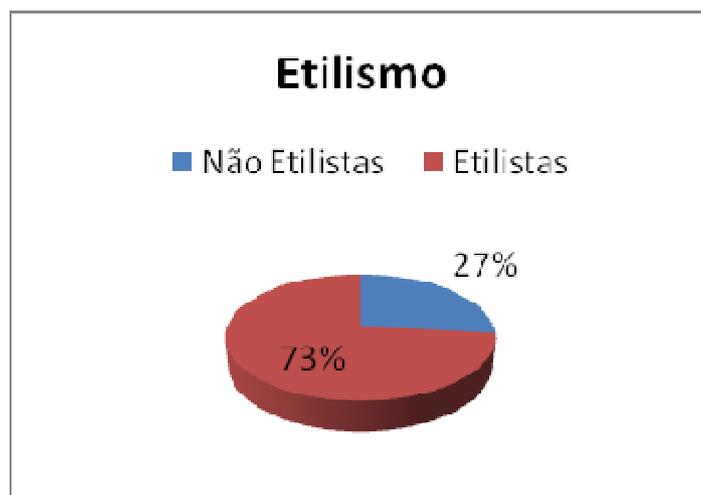
**GRÁFICO 3 – Proporção de diferentes gêneros entre os pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal.**



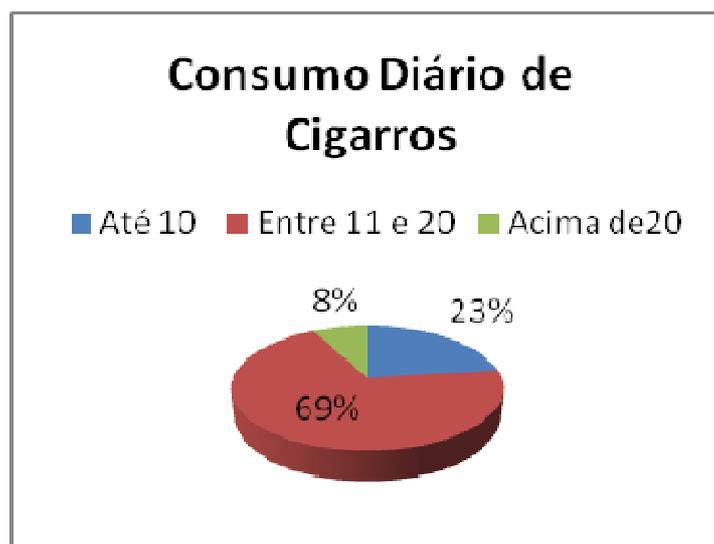
**GRÁFICO 4 – Distribuição dos pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal de acordo com a idade.**



**GRÁFICO 5 – Proporção de indivíduos que apresentavam o hábito do tabagismo entre os pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal.**



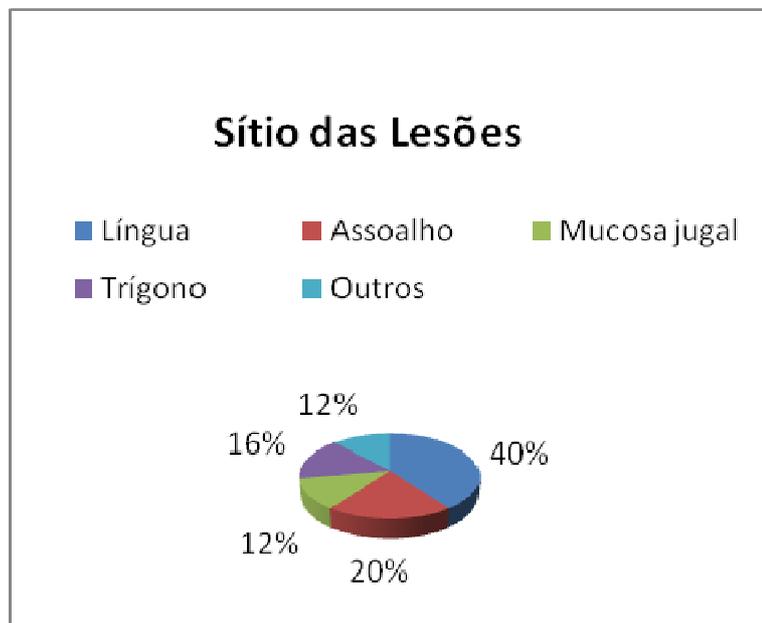
**GRÁFICO 6 – Proporção de indivíduos que apresentavam o hábito do etilismo entre os pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal.**



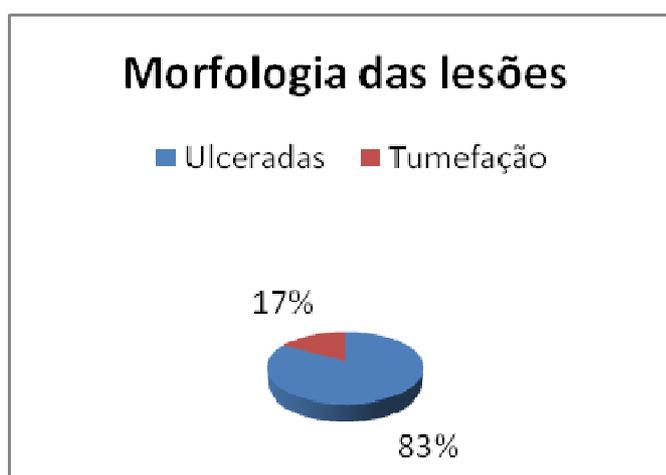
**GRÁFICO 7 – Distribuição do consumo de cigarros por dia entre os pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal.**

Com relação às lesões percebemos que estas acometiam principalmente as regiões de língua (40%) e assoalho bucal (20%), mas foram frequentes também nas regiões de trígono retromolar e mucosa jugal. Estas lesões eram, em sua maioria, lesões ulceradas e eritematosas. Constava ainda no prontuário clínico desses pacientes que a maioria relatava sintomatologia dolorosa e no momento do exame verificou-se que a

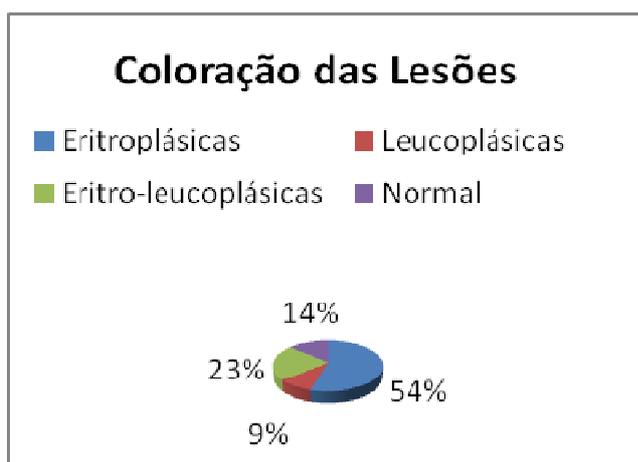
maioria dos pacientes apresentava alteração em linfonodo. Percebemos ainda que a grande maioria dos pacientes procurou atendimento com relativamente pouco tempo de evolução da doença (**GRÁFICOS 8 a 13**).



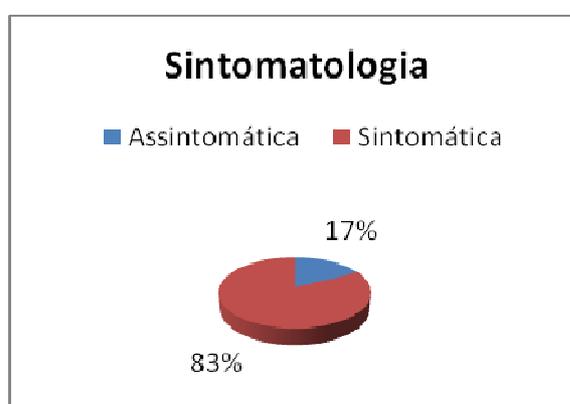
**GRÁFICO 8 – Distribuição das amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal de acordo com a localização das lesões.**



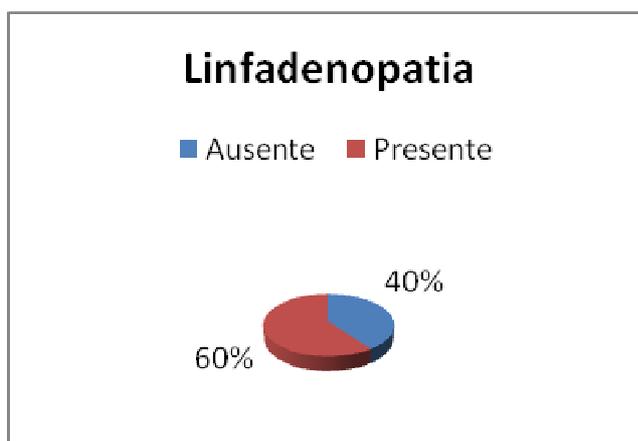
**GRÁFICO 9 – Proporção de características morfológicas das lesões de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal.**



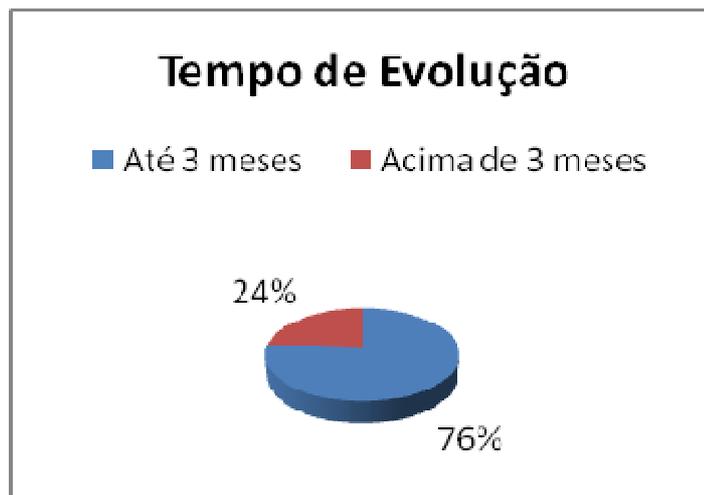
**GRÁFICO 10 – Proporção da coloração das lesões entre as amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal.**



**GRÁFICO 11 – Distribuição de Sintomatologia dolorosa das lesões entre as amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal.**



**GRÁFICO 12 – Proporção de linfadenopatia entre as amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal.**



**GRÁFICO 13 – Proporção do tempo de evolução das lesões dos pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal**

#### **4.4 CORRELAÇÃO DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES COM CECB E A EXPRESSÃO DE P16<sup>INK4A</sup>**

Em seguida foi avaliada a correlação da expressão de P16<sup>INK4A</sup> com os dados epidemiológicos dos pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide e os dados clínicos das lesões, sendo os resultados obtidos expressos nas **TABELAS 3 E 4**.

**TABELA 3: Relação entre os Dados Epidemiológicos dos pacientes e a expressão de P16<sup>INK4A</sup>**

<b>Dados Epidemiológicos#</b>				
<b>Cor da Pele</b>	<b>Total</b>	<b>P16 -</b>	<b>P16 +</b>	<b>p</b>
Leucoderma	10	05 (50%)	05 (50%)	0,225
Feoderma	07	04 (57,2%)	03 (48,2%)	
Melanoderma	04	-	04 (100%)	
Total	21	09	12	
<b>Idade</b>	<b>Total</b>	<b>P16 -</b>	<b>P16+</b>	<b>p</b>
Abaixo de 50 anos	06	02 (33,3%)	04 (66,6%)	0,453
Acima de 50 anos	17	08 (47%)	09 (53%)	
Total	23	10	13	
<b>Sexo</b>	<b>Total</b>	<b>P16 -</b>	<b>P16 +</b>	<b>p</b>
Feminino	03	02 (66,6%)	01 (33,3%)	0,346
Masculino	22	08 (36,4%)	14 (63,6%)	
Total	25	10	15	
<b>Tabagismo</b>	<b>Total</b>	<b>P16 -</b>	<b>P16 +</b>	<b>p</b>
Não fumante	04	-	04 (100%)	0,05
Fumante	13	08 (61,5%)	05 (38,5%)	
Total	17	08	09	
<b>Nº de cigarros por dia</b>	<b>Total</b>	<b>P16 -</b>	<b>P16 +</b>	<b>p</b>
Até 10 cigarros	03	03 (100%)	-	0,315
De 11 a 20 cigarros ao dia	09	04 (44,5%)	05 (55,5%)	
Acima de 20 cigarros ao dia	01	01 (100%)	-	
Total	13	08	05	
<b>Etilismo</b>	<b>Total</b>	<b>P16 -</b>	<b>P16 +</b>	<b>p</b>
Não etilista	04	02 (50%)	02 (50%)	0,662
Etilista	11	05 (45,5%)	06 (54,5%)	
Total	15	07	08	

# Resultados analisados estatisticamente por meio do Teste Exato de Fisher; um valor de  $p < 0.05$  apresenta significância estatística.

**TABELA 4: Relação entre as Características das lesões e Sintomatologia dos pacientes e a expressão de P16<sup>INK4A</sup>**

<b>Dados da Lesão</b>				
<b>Localização da lesão</b>	<b>Total</b>	<b>P16 -</b>	<b>P16 +</b>	<b>p</b>
Língua	10	05 (50%)	05 (50%)	<b>0,047</b>
Assoalho	05	02 (40%)	03 (60%)	
Mucosa jugal	03	03 (100%)	-	
Trígono retromolar	04	-	04 (100%)	
Outros	03	-	03 (100%)	
Total	25	10	15	
<b>Tipo da lesão</b>				
<b>Tipo da lesão</b>	<b>Total</b>	<b>P16 -</b>	<b>P16 +</b>	<b>p</b>
Ulcerativa	20	10 (50%)	10 (50%)	0,094
Tumefação	04	-	04 (100%)	
Total	24	10	14	
<b>Cor da lesão</b>				
<b>Cor da lesão</b>	<b>Total</b>	<b>P16 -</b>	<b>P16 +</b>	<b>p</b>
Eritroplásica	12	06 (50%)	06 (50%)	0,721
Leucoplásica	02	-	02 (100%)	
Eritro-leucoplásica	05	02 (40%)	03 (60%)	
Normal	03	02 (66,6%)	01 (33,3%)	
Total	22	10	12	
<b>Sintomatologia</b>				
<b>Sintomatologia</b>	<b>Total</b>	<b>P16 -</b>	<b>P16 +</b>	<b>p</b>
Ausência	04	01 (25%)	03 (75%)	0,404
Presença	19	09 (47,4%)	10 (52,6%)	
Total	23	10	13	
<b>Tempo da doença</b>				
<b>Tempo da doença</b>	<b>Total</b>	<b>P16 -</b>	<b>P16 +</b>	<b>p</b>
Até 3 meses de evolução	16	06 (37,5%)	10 (62,5%)	0,656
Acima de 3 meses de evolução	05	02 (40%)	03 (60%)	
Total	21	08	13	
<b>Linfoadenopatia</b>				
<b>Linfoadenopatia</b>	<b>Total</b>	<b>P16 -</b>	<b>P16 +</b>	<b>p</b>
Ausente	06	03 (50%)	03 (50%)	0,622
Presente	09	05 (55,5%)	04 (44,4%)	
Total	15	08	07	

# Resultados analisados estatisticamente por meio do Teste Exato de Fisher; um valor de  $p < 0.05$  apresenta significância estatística.

Ao efetuar-se uma análise da correlação entre os dados epidemiológicos dos pacientes portadores de CECB e a expressão positiva para P16<sup>INK4A</sup> nas amostras de tumor obtidas desses indivíduos, observou-se que todos os pacientes melanoderma

foram P16<sup>INK4A</sup> positivos. Porém esse resultado não foi estatisticamente significativo.

Em relação à idade dos pacientes, verificou-se que a maioria dos pacientes com abaixo de 50 anos (66%) e acima de 50 anos (53%), apresentaram expressão positiva para P16<sup>INK4A</sup> em suas lesões. Da mesma forma, observou-se que 63,6% dos pacientes do sexo masculino expressaram a proteína P16<sup>INK4A</sup> em suas amostras de CECB. Entretanto os últimos resultados não apresentaram significância estatística.

Em relação ao hábito do tabagismo, observou-se que 100% dos pacientes não fumantes apresentaram expressão positiva de P16<sup>INK4A</sup> em suas amostras de CECB, enquanto que a maioria dos pacientes tabagistas (61,5%), não apresentou expressão de P16<sup>INK4A</sup> em suas amostras de tecido obtidas do tumor. Esses dados foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

Avaliou-se também o número de cigarros consumidos ao dia pelos pacientes de CECB analisados no presente estudo e a expressão de P16<sup>INK4A</sup> e verificou-se que a maioria (55,5%) dos pacientes que consumiam entre 11 e 20 cigarros ao dia apresentou expressão positiva para a proteína. Da mesma forma, observou-se expressão positiva de P16<sup>INK4A</sup> na maioria dos indivíduos que apresentavam o hábito do etilismo (54,5%). Porém esses resultados não foram estatisticamente significativos.

Dentre os resultados obtidos da comparação da expressão de P16<sup>INK4A</sup> e as características morfológicas das lesões e sintomatologia clínica apresentada pelos pacientes, observou-se que em relação ao sítio da lesão e a expressão dessa proteína, 100% das amostras de Carcinoma bucal localizadas na região do trígono retromolar e em sítios orais como lábio, rebordo alveolar e palato e 60% das amostras localizadas no assoalho bucal, apresentaram expressão positiva para P16<sup>INK4A</sup>. Esses resultados apresentaram significância estatística ( $p < 0,05$ ).

Verificou-se também que 100% das amostras de tumor que apresentavam tumefação provenientes dos pacientes com CECB apresentaram marcação positiva para P16<sup>INK4A</sup>, sendo, entretanto, esse resultado estatisticamente não significativo. Quando a expressão de P16<sup>INK4A</sup> foi avaliada de acordo com a coloração das lesões, verificou-se que 50% das lesões eritoplásticas e 60% das lesões eritro-leucoplásticas apresentaram expressão positiva para essa proteína.

Por meio da comparação entre os sintomas apresentados pelos pacientes e a expressão de P16<sup>INK4A</sup> verificou-se que a maioria dos pacientes sem sintomatologia (75%) e com até 3 meses de evolução da doença (62,5%) apresentaram expressão positiva para a proteína. Não observou-se diferenças na expressão de P16<sup>INK4A</sup> entre o grupo de pacientes apresentando linfadenopatia daqueles que não apresentaram esse sintoma. Contudo, esses resultados não foram considerados estatisticamente significativos.

## 5. DISCUSSÃO

---

### 5.1 A CORRELAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS E A PATOGÊNESE DO CECB

No presente estudo verificou-se que a maioria dos pacientes estudados portadores de CECB era do sexo masculino apresentando acima de 50 anos.

Dados provenientes do IARC (2004) ressaltam que acima de 90% dos casos de carcinoma bucal, ocorrem em pacientes com idade superior a 45 anos, sugerindo ainda que a idade mais avançada poderia representar um fator de risco considerável na patogênese dessa neoplasia, por possibilitar um maior tempo de contato dos pacientes de outros fatores de risco, como por exemplo, o cigarro e o álcool.

Estudos demonstram que o CECB tipicamente ocorre em pacientes do sexo masculino apresentando entre 50 a 80 anos. A taxa de incidência dessa neoplasia em pacientes jovens com abaixo de 40 anos varia de 0,4 a 3,6% (Cusumano *et al.*, 1988; Llewellyn *et al.*, 2001)

Segundo resultados provenientes de um programa de rastreamento e controle do Carcinoma bucal (“National Cancer Institute’s Surveillance, Epidemiology and End Results” – SEER), desenvolvido nos EUA no período de 1985 a 1996, 92,3% dos casos desse tipo de câncer ocorreram em indivíduos do sexo masculino com acima de 40 anos, sendo que quase 50% dos indivíduos afetados, apresentavam acima de 65 anos (Shiboski *et al.*, 2000).

Em estudo epidemiológico recente realizado com 121 pacientes com CECB da população brasileira, observou-se que a maioria dos pacientes afetados apresentava acima de 40 anos (89%), sendo a proporção entre homens e mulheres de 3,2:1. Os indivíduos jovens (com abaixo de 40 anos) representavam 11% do total de pacientes, com proporção de 1,6:1 entre pacientes do sexo masculino e feminino (Hirota *et al.*, 2008).

Destaca-se que, historicamente, o CECB sempre esteve associado ao sexo masculino, em indivíduos com acima de 60 anos de idade, com hábito de tabagismo e etilismo. Porém, mais recentemente, tem havido variações nesse quadro, e tem sido

observado um aumento da incidência tanto em indivíduos mais jovens como em mulheres, ambos não tabagistas e não etilistas, (Llewellyn *et al.*, 2001; Schantz & Yu, 2002).

Em concordância com a constatação acima descrita, muitos estudos têm revelado uma diminuição da incidência de câncer bucal relacionado ao consumo de tabaco e um aumento do surgimento de casos relacionados ao HPV (Shiboski, Schimidt & Jordan 2005; Chaturverdi *et al.*; 2008; Ryerson *et al.*, 2008; revisão em Marur *et al.*, 2010).

Em estudo realizado nos Estados Unidos, baseado nos dados epidemiológicos, na taxa de sobrevivência e no resultado do tratamento de pacientes que foram acompanhados durante 31 anos (1973 a 2004), observou-se um aumento da incidência por ano, de tumores da orofaringe, que eram em sua maioria associados ao HPV, de 1 a 3% na região da base da língua, e de 0 a 6% na região tonsilar. Ao contrário, observou-se no mesmo período, uma redução de 1 a 9% na incidência de carcinoma de cavidade oral não - associados ao HPV por ano (Chaturverdi *et al.*, 2008). Neste mesmo estudo constatou-se que houve aumento de incidência do carcinoma de orofaringe predominantemente em homens brancos de idade jovem, mas não em mulheres. De maneira similar a esse estudo, o aumento de incidência de carcinoma de orofaringe foi relatado em outros países do mundo, como, por exemplo, na Suécia (Hammarstedt *et al.*, 2007), Holanda (Braakhuis, Visser & Leemans, 2009) e Reino Unido (Robinson & Macfarlane, 2003; Conway *et al.*, 2006).

Apesar da reconhecida importância do HPV no desenvolvimento do carcinoma de orofaringe, a epidemiologia da infecção oral por HPV na cavidade oral não é muito bem compreendida. Alguns estudos sugerem que a frequência do HPV na cavidade bucal aumentaria com a idade. Assim, a prevalência do HPV na região oral em adolescentes varia de 3 a 5% (Summersgill *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2007; D'Souza *et al.*, 2009) e em adultos, de 5 a 10% (Schwartzet *et al.*, 1998; Hansson *et al.*, 2005). Dados sugerem também que a prevalência da infecção oral pelo HPV seria aumentada de acordo com o número de parceiros sexuais, seria mais comum em homens, em pacientes HIV - positivos e em tabagistas (Summersgill *et al.*, 2001; Kreimer *et al.*, 2004; D'Souza *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007; D'Souza *et al.*, 2009).

No presente estudo verificou-se que a maioria dos pacientes portadores de

CECB era etilista (73%), tabagista (76%) e consumia entre 11 a 20 cigarros ao dia (69%).

O cigarro é considerado o principal fator de risco associado à patogênese do CECB, de forma que o risco de fumantes crônicos virem a desenvolver o Carcinoma Epidermóide é 20 vezes maior do que indivíduos não fumantes, sendo esse efeito associado ao número de cigarros utilizado (Vallecillo *et al.*, 2007; Hirota *et al.*, 2008). Segundo estatísticas mundiais, cerca de 1 bilhão de homens e 250 milhões de mulheres do planeta são tabagistas, e 2 bilhões de pessoas consumidores de bebidas alcoólicas. Levando em consideração esses grupos, a incidência mundial do CECB é de 25% entre os tabagistas, 7 a 20% entre os etilistas, e de 85% entre os indivíduos tabagistas e etilistas (Petti *et al.*, 2008).

O hábito do tabagismo sempre esteve fortemente associado ao surgimento dos tumores orais. Em estudo realizado com a população dos EUA em um período de 17 anos (1976-1993), verificou-se que 74% dos pacientes que desenvolveram carcinoma bucal eram fumantes (Shiboski *et al.*, 2000). Outro estudo desenvolvido com pacientes do estado americano do Kentucky, apenas 3,5% dos pacientes que desenvolveram carcinoma oral eram não fumantes (Johnson *et al.*, 2001).

Em estudo realizado com 121 pacientes de CECB da população brasileira verificou-se que a maioria (75%) dos pacientes com acima de 40 anos afetados eram tabagistas e etilistas, sendo que 60% desses pacientes consumiam acima de 20 cigarros e 84 gramas de álcool por dia, sendo considerados consumidores “pesados” (Hirota *et al.*, 2008).

Como anteriormente destacado, verificou-se também, no presente estudo, que a maioria (73%) dos pacientes portadores de CECB apresentava o hábito do etilismo.

De acordo com achados provenientes de estudos epidemiológicos, o consumo de bebidas alcoólicas está etiologicamente relacionado à ocorrência de tumores malignos da cavidade oral, da faringe, da laringe, do esôfago, do fígado, do reto e de mama. Devido à capacidade de gerar tumores tanto em humanos como em animais, o etanol presente em bebidas alcoólicas é classificado pelo IARC como agente carcinogênico para humanos do grupo 1 (Baan *et al.*, 2007).

Em um estudo de caso-controle conduzido por Schlecht e colaboradores (1999) investigou-se o efeito do consumo de tabaco e de álcool, e o efeito acumulativo do álcool entre pacientes nunca expostos ao fumo, sobre o risco de câncer do trato aerodigestivo. Nesse estudo foram avaliados 784 casos de pacientes das regiões Centro-Oeste (Goiás) e Sul (São Paulo e Paraná) do Brasil, portadores de câncer da cavidade oral, faringe e laringe, e em 1578 controles saudáveis não - tabagistas e não - etilistas. Verificou-se um efeito independente do álcool em relação aos efeitos interativos do tabagismo, na etiologia da maioria dos tumores acima relacionados.

Em estudo posterior o mesmo grupo de pacientes analisado no trabalho acima descrito foi avaliado quanto ao efeito do consumo de diferentes tipos de bebida alcoólica sobre o risco de câncer em sítios específicos do trato aero - digestivo. Observou-se que, em relação aos indivíduos controle, o risco para o desenvolvimento de câncer no trato aero - digestivo variou de acordo com o sítio considerado, mas apresentou um aumento com uma maior exposição ao etanol (idades *versus* tempo do consumo) e de acordo com o tipo de bebida alcoólica consumida. O risco para desenvolvimento de câncer da cavidade oral foi de 6,9 vezes e de 4,5 para os pacientes consumidores de vodka e cachaça, respectivamente (Schlecht *et al.*, 2001).

Considera-se que os fatores de risco freqüentemente possam agir aumentando a taxa de mutação de genes envolvidos na desintoxicação de metabólitos químicos, no reparo de DNA e no controle do ciclo celular. Os metabólitos ativos do tabaco (como as nitrosaminas e os radicais livres) são responsáveis em causar alterações em enzimas com atividade anti - oxidante (revisão em Scully *et al.*, 2000 a, b, c).

O mecanismo de ação do álcool está principalmente relacionado ao produto de sua oxidação, o aldeído acético, cuja ação carcinogênica já foi comprovada em estudos genético - epidemiológicos como um fator de risco dos tipos de câncer relacionados ao álcool como o câncer do esôfago e de cabeça e pescoço. De fato, o acetaldeído associado ao consumo do álcool foi recentemente classificado pelo IARC como agente carcinogênico em humanos do grupo 1 (Secretan *et al.*, 2009).

O risco de etilistas crônicos desenvolverem CECB é de 5 vezes maior que os indivíduos não consumidores de álcool e esse efeito é dose-dependente (Pellucchi *et al.*, 2008). A associação do álcool e do cigarro tem ação sinérgica na patogênese do CECB,

porque o cigarro parece aumentar a produção de aldeído acético, enquanto que a presença do etanol promoveria a ativação de pró-carcinogênicos do tabaco. Assim, em um trabalho realizado com pacientes adultos jovens portadores de CECB, foi constatado que 77% dos indivíduos analisados eram fumantes, 52% eram consumidores de álcool e 85% eram tabagistas e fumantes (Rodriguez *et al.*, 2004).

Porém, dentre os demais agentes químicos potencialmente carcinogênicos também presentes em bebidas alcoólicas (nitrosos, certos pesticidas e micotoxinas), destaca-se o etil-carbamato, substância que tem sido considerada o mais provável segundo candidato com ação carcinogênica em consumidores regulares de certos tipos de bebidas alcoólicas (revisão em Battaglia *et al.*, 1990).

O Ministério da Agricultura (Brasil) estabelece como 0,15 mg/litro o limite máximo de etil-carbamato em bebidas alcoólicas como a cachaça; porém trabalhos recentes indicam que 70% dos produtos da Paraíba, Brasil, apresentaram um limite superior ao permitido pela Legislação brasileira (Nóbrega *et al.*, 2009; Lachenmeier *et al.*, 2009). Em um estudo de meta-análise recente, verificou-se que, em adição ao etanol, o etil-carbamato presente em bebidas alcoólicas altamente consumidas no Brasil como a cachaça e a tiquira (aguardente derivado da mandioca consumida principalmente na região Norte do Brasil) apresentou um grande risco de câncer para a população brasileira (Lachenmeier *et al.*, 2010).

No presente estudo avaliou-se a proporção de algumas características da lesão dos pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide e verificou-se que a maioria das amostras de CECB eram eritroplásicas (54%) ou eritro – leucoplásicas (23%), ulcerativas (83%) e localizadas em sua maioria na língua (40%) e no assoalho bucal (20%).

Em um estudo no qual um número expressivo (3526) de biópsias de pacientes portadores de lesões precursoras e de carcinoma bucal foi analisado, verificou-se o acometimento preferencial de alguns sítios orais, que foram considerados de alto-risco para o desenvolvimento de lesões, incluindo a região ventral da língua e o assoalho bucal. Demonstrou-se também um risco de 40% de displasia ou carcinoma, de biópsias obtidas da região do assoalho bucal (Waldron & Schafer, 1975).

Vários trabalhos reportam que os sítios orais mais comumente acometidos pelo

CECB consistem na borda lateral da língua (40%), no assoalho bucal (30%), no triângulo retromolar e na gengiva mandibular (30%) (revisão em Silverman, 2001; Kademani *et al.*, 2005). Por serem cobertas por uma fina mucosa, não queratinizada, acredita-se que essas áreas estejam mais sujeitas ao ataque de substâncias carcinogênicas do que a mucosa queratinizada (Kademani, 2007).

Em estudo realizado com um grupo de pacientes não tabagistas portadores de carcinoma bucal provenientes da Austrália (Rich & Raden, 1984) e Holanda (Jovanic *et al.*, 1993), verificou-se que os principais sítios das lesões observados na maioria desses pacientes foram na região vestibular do rebordo alveolar superior, sendo raras as lesões encontradas no assoalho bucal.

Em estudo epidemiológico no qual 121 pacientes portadores de CECB da população brasileira foram analisados, verificou-se que a maioria (77%) dos pacientes jovens (com abaixo de 40 anos) apresentou lesões na borda lateral da língua, enquanto que pacientes com acima dessa idade (considerados não-jovens), apresentaram como sítios da lesão a borda da língua e o assoalho bucal (49%). Cerca de 62% dos pacientes jovens e 44% dos pacientes com acima de 40 anos reportaram o aparecimento de suas lesões 2 meses antes da data da consulta. Verificou-se a presença de dor em 61,5% dos pacientes jovens e em 74% dos pacientes não-jovens (Hirota *et al.*, 2008).

Quanto à sintomatologia clínica apresentada pelos pacientes portadores de CECB analisados no presente estudo, observou-se que a maioria desses pacientes exibiu sintomatologia dolorosa (83%), com linfadenopatia (60%) e com tempo de evolução da lesão de abaixo de 3 meses (76%).

No estudo desenvolvido por Hirota *et al.* (2008) em indivíduos da população brasileira, observou-se a presença de dor em 61,5% dos pacientes jovens (com abaixo de 40 anos) e em 74% dos pacientes com acima de 40 anos (pacientes não-jovens). Além disso, cerca de 62% dos pacientes jovens e 44% dos pacientes não-jovens reportaram um tempo de evolução da lesão de 2 meses.

A maioria dos trabalhos da literatura dedicados ao estudo da sintomatologia associada ao câncer bucal como a dor, a perda de peso, a presença de inflamação, entre outros exemplos, focalizou principalmente os sintomas relacionados ao período pós-diagnóstico, e durante e após o tratamento do câncer, sendo poucos os estudos que

investigaram esses aspectos em períodos iniciais da doença (Less, 1999; Epstein *et al.*, 1999; Cuffari *et al.*, 2006).

Muitos tipos de carcinoma oral não apresentam sinais clinicamente detectáveis enquanto se encontram no estágio de lesão pré-maligna ou no estágio localizado (no qual não há comprometimento dos linfonodos) quando ainda são clinicamente tratáveis. Considera-se que a ausência de sintomatologia específica como a dor em muitos dos casos de CECB assim como nos estágios iniciais dessa doença, poderia contribuir a um atraso dos pacientes em procurar um serviço especializado, e ao estabelecimento do diagnóstico somente em estágios mais avançados do Carcinoma bucal (Kademani, 2007; revisão em Baykul *et al.*, 2010). O diagnóstico tardio pode resultar em tratamentos mais caros, agressivos e desfigurantes, além de uma baixa taxa de sobrevida e qualidade de vida entre os pacientes sobreviventes (revisão em Baykul *et al.*, 2010).

O estágio em que o tumor se encontra no período do diagnóstico, ainda é considerado como um dos marcadores mais importantes de prognóstico para o CECB, e estágios de tumores mais avançados estão freqüentemente associados altas taxas de mortalidade (Garzino-Demo *et al.*, 2006; McDowell, 2006). Como mencionado, estudos indicam que o atraso no diagnóstico da doença poderia ser devido tanto à atitude passiva do paciente, quanto à dificuldade dos especialistas em interpretar os sintomas fácil e corretamente (Kowalski *et al.*, 1994).

## **5.2 A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16<sup>INK4A</sup> NA MUCOSA NORMAL**

É amplamente aceito que o câncer surge como o resultado de um acúmulo de alterações genéticas que afetam o controle normal do crescimento celular e a diferenciação terminal. Genes supressores de tumor são genes celulares normais que quando ativados de forma não apropriada podem levar à transformação neoplásica (Bishop 1987; Tsai *et al.*, 2001). P16<sup>INK4A</sup> é classificado como um GST, e a inativação desse gene tem sido observada em diversos tipos de tumores humanos, incluindo melanomas (Reed *et al.*, 1996), leucemias, linfomas, carcinomas de pulmão e esôfago (Gazzeri *et al.*, 1998; Todd *et al.*, 2002), assim como em carcinomas de cabeça e

pescoço (Zhang *et al.*, 1994; Lang *et al.*, 1998; revisão em Todd *et al.*, 2002).

Na maioria dos casos, acredita-se que o Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço se desenvolva a partir do epitélio normal através de um processo de múltiplos passos envolvendo diversos graus de displasia, levando eventualmente à transformação maligna e ao estabelecimento do carcinoma (Hardisson 2003).

Em células não neoplásicas, o ciclo celular é controlado por uma série de proteínas que atuam em “check-points” específicos, onde normalmente controlam a progressão para a próxima fase do ciclo (Todd *et al.*, 2002). A progressão da fase G1 para a fase S é controlada por uma proteína reguladora “master”, a PRb, cuja atividade é negativamente regulada por um sistema complexo de ciclinas e CDKs, e positivamente controlada por membros de 3 distintas famílias de inibidores de CDKs como a proteína P16<sup>INK4A</sup> (Serrano *et al.*, 1996). A expressão de P16<sup>INK4A</sup> é constantemente baixa durante a maior parte do ciclo celular, apresentando um aumento marcante na fase G1 do ciclo (Tam *et al.*, 1994; Sartor, 1999).

No presente estudo verificou-se ausência da expressão de P16<sup>INK4A</sup> nas espécimes controles analisadas tanto no epitélio quanto no estroma. Porém observou-se uma forte marcação de P16<sup>INK4A</sup> nas amostras de tumor, assim como em fibroblastos presentes no estroma adjacente.

Outros trabalhos também apresentaram resultados semelhantes aos encontrados no nosso estudo, onde nenhuma expressão de P16<sup>INK4A</sup> foi observada na mucosa normal. Por meio da utilização de um grupo de amostras controle obtidas de pacientes saudáveis, semelhantes às amostras controles utilizadas em nosso estudo, Buajeeb e colaboradores (2009) verificaram ausência de marcação de P16<sup>INK4A</sup> nas 10 (100%) amostras controles utilizadas, em contraposição à presença de forte imuno - reatividade da proteína em 15 amostras de Leucoplasia oral e 16 amostras de CECB. Da mesma forma, nenhuma marcação de P16<sup>INK4A</sup> foi observada nas amostras controles empregadas no estudo conduzido por Eleutério e colaboradores (2007). Três estudos que foram dedicados à análise de P16<sup>INK4A</sup> em 45 (Muirhead *et al.*, 2006) e 79 (Nemes *et al.*, 2006) amostras de CECB, ou em 41 amostras de Displasia oral (Cunningham *et al.*, 2006) utilizaram a mucosa normal adjacente à cada lesão como controle interno negativo da reação: nenhuma marcação de P16<sup>INK4A</sup> foi observada no tecido normal.

Entretanto, em trabalhos desenvolvidos por outros grupos, verificou-se marcação positiva de P16<sup>INK4A</sup> em amostras controles e um padrão de expressão de P16<sup>INK4A</sup> de intensidade variável. No estudo desenvolvido por Pande e colaboradores (1998) avaliou-se a expressão de P16<sup>INK4A</sup> em 35 amostras de CECB, 22 amostras de lesões pré-malignas e em 30 amostras de controle normal obtidas de indivíduos saudáveis. Uma fraca reatividade para P16<sup>INK4A</sup> foi observada em 28 (93%) das amostras controle analisadas. Da mesma forma, Sartor e colaboradores (1999) observaram por “Western blot” uma discreta expressão de P16<sup>INK4A</sup> em 2 (66%) das amostras controles utilizadas em seu estudo. Por outro lado, no trabalho desenvolvido por Shintani e colaboradores (2002), que analisaram um número expressivo de amostras da cavidade oral (N= 180, 42 amostras de Displasia oral e 117 amostras de CECB), todas as 20 amostras controles e 100% das amostras de Displasia leve e moderada analisadas apresentaram forte expressão de P16<sup>INK4A</sup>. A perda de expressão da proteína foi verificada em 30% das amostras de Displasia severa e em 70% das amostras de CECB que foram analisadas (Shintani *et al.*, 2002).

Como anteriormente ressaltado, a expressão normal da proteína P16<sup>INK4A</sup> no epitélio normal não transformado é transitória e dependente da fase do ciclo celular, sendo geralmente expressa em baixos níveis na maior parte desse ciclo (Tam *et al.*, 1994; revisão em Todd *et al.*, 2002).

Porém alguns autores consideram que a diversidade dos resultados encontrados nos diferentes estudos possa ser devido (i) à diferença nos procedimentos técnicos como o protocolo da técnica de Imunohistoquímica empregado em diferentes laboratórios; (ii) ao tipo de amostra utilizada (tecido à fresco e amostras incluídas em parafina); (iii) à forma de coleta das amostras; (iv) à natureza (monoclonal ou policlonal) e à especificidade dos anticorpos utilizados (Anderson *et al.*, 2005; Bradley *et al.*, 2006; Buajeeb *et al.*, 2009).

Além disso, considera-se que as variações observadas nos resultados encontrados entre diferentes trabalhos, poderiam ainda estar relacionadas ao padrão de marcação considerado. Alguns estudos avaliam só a marcação de P16<sup>INK4A</sup> verificada no núcleo, (Ralhan *et al.*, 2006), enquanto que outros consideram ambas as marcações, nuclear e citoplasmática (Buajeeb *et al.*, 2009). Em um estudo baseado na análise de astrocitomas de alto grau, verificou-se que a expressão citoplasmática de P16<sup>INK4A</sup>

estava relacionada a um pior diagnóstico desse tipo de tumor (Arifin *et al.*, 2006). Destaca-se que no presente estudo foram consideradas ambas as marcações de P16<sup>INK4A</sup>, nuclear e citoplasmática.

### **5.3 EXPRESSÃO DE P16<sup>INK4A</sup> EM LESÕES DA CAVIDADE ORAL**

No presente estudo observou-se um aumento da expressão de P16<sup>INK4A</sup> nas amostras de CECB que foram analisadas em comparação às amostras de mucosa normal obtidas de indivíduos não apresentando nenhuma patologia da cavidade oral.

Diversos estudos na literatura foram dedicados à análise da expressão de P16<sup>INK4A</sup> por meio da técnica de imunohistoquímica tanto em lesões pré-malignas como em amostras de carcinoma bucal. Alguns desses trabalhos são concordantes com os achados do presente estudo, onde um aumento da expressão da proteína foi verificado, enquanto que em outros estudos, uma redução da expressão de P16<sup>INK4A</sup> foi observada.

A **TABELA 5** apresenta uma relação dos principais estudos que foram desenvolvidos acerca da análise da expressão de P16<sup>INK4A</sup> em lesões pré-malignas da cavidade oral.

**TABELA 5: Expressão da proteína P16<sup>INK4A</sup> em Lesões Pré-malignas da Cavidade Oral**

Referência	“N”	Lesão Oral	Expressão P16 <sup>INK4A</sup>
Papadimitrakopoulou <i>et al.</i> , 1997	36	Lesões pré-malignas	redução em 47%
Pande <i>et al.</i> , 1998	22	Leucoplasia oral	redução em 6%
Sartor <i>et al.</i> , 1999	9	Queratose e displasia	redução em 78%
Shintani <i>et al.</i> , 2002	42	Displasia leve Displasia moderada Displasia severa	redução em 0% redução em 6% redução em 30%
Gologan <i>et al.</i> , 2005	60	Queratose Displasia leve Displasia moderada Displasia severa Ulcera crônica	redução em 0% 64,3% de baixa expressão 50% de alta expressão 69,4% de alta expressão 60% de baixa expressão
Bradley, 2006		Displasia leve Displasia moderada/severa	redução em 39% redução em 66%
Cunningham <i>et al.</i> , 2006	41	Displasia oral	aumento da expressão de 62%
Buajeeb <i>et al.</i> , 2008	28	Displasia oral	redução em 43%

Em alguns trabalhos foi proposto, que a perda da expressão de P16<sup>INK4A</sup> poderia ser utilizada como biomarcador para a Displasia oral e a transformação maligna (Reed *et al.*, 1996; Papadimitrakopoulou *et al.*, 1997; Pande *et al.*, 1998). Porém alguns autores consideraram que a expressão de P16<sup>INK4A</sup> não seria um marcador útil na diferenciação de lesões displásicas e não displásicas. Bradley *et al.*, (2006) não observaram diferenças significativas na perda de expressão de P16<sup>INK4A</sup> entre amostras de mucosa não displásica (36%) e apresentando displasia leve (39%) em relação à perda

observada em amostras apresentando displasia moderada e severa (66%). Da mesma forma, Buajeeb *et al.*, (2009) também não encontraram diferenças na expressão de P16<sup>INK4A</sup> entre amostras de mucosa normal e amostras de leucoplasia oral com ou sem displasia.

A **TABELA 6** apresenta uma relação de trabalhos conduzidos acerca da análise da expressão de P16<sup>INK4A</sup> em amostras de Carcinoma de cabeça e pescoço e de CECB.

**TABELA 6: Expressão da proteína P16<sup>INK4A</sup> no Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal**

Referência	“N”	Lesão Oral	Expressão P16 <sup>INK4A</sup>
Reed <i>et al.</i> , 1996	29	CCECP	redução de 66 a 80%
Andl <i>et al.</i> , 1998	208	CCECP	aumento
Pande <i>et al.</i> , 1998	35	CECB	redução em 59%
Sartor <i>et al.</i> , 1999	26	CECB	redução em 70%
Lai <i>et al.</i> , 1999	46	CCECP	aumento
Nakahara <i>et al.</i> , 2000	78 46	CECB Leucoplasia	Redução em 67,9% Expressão normal em quase todos os casos
Tsai, 2001	48	CECB	redução em 54%
Rocco <i>et al.</i> , 2001 (revisão)		CCECP	redução
Poi <i>et al.</i> , 2001	100	CCECP	redução
Shintani, 2002	117	CECB	redução de 30%
Wiest <i>et al.</i> , 2002	28	CCECP	aumento
Geisler <i>et al.</i> , 2002	171	CCECP	aumento
Natarajan <i>et al.</i> , 2003	73	CCECP	redução
Hafkamp <i>et al.</i> , 2003	47	CECB	aumento
Fregonesi <i>et al.</i> , 2003	46	CECB	aumento
Li <i>et al.</i> , 2004	50	CCECP	aumento
Paradiso <i>et al.</i> , 2004	57	CCECP	expressão em 51%
Ai <i>et al.</i> , 2005	100	CCECP	redução
Greer Jr <i>et al.</i> , 2008	29	CECB	redução em 52%
Buajeeb <i>et al.</i> , 2009	10 15 15 16	Mucosa normal Leucoplasia sem displasia Leucoplasia com displasia Câncer	expressão negativa em 100% expressão negativa em 73,3% expressão negativa em 100% expressão negativa em 81,25%

Como apresentado na **TABELA 6**, enquanto alguns trabalhos encontraram resultados semelhantes àqueles encontrados no presente estudo, ou seja, de um aumento da expressão de P16<sup>INK4A</sup> em amostras de CECB, outros trabalhos verificaram uma perda na expressão dessa proteína em amostras de carcinoma bucal.

No presente estudo verificou-se também uma redução da expressão de P16<sup>INK4A</sup> (de 61,5%) em pacientes portadores de CECB que apresentaram o hábito do tabagismo. Nos trabalhos da literatura onde foi verificada uma redução da expressão de P16<sup>INK4A</sup> em amostras de CECB, essa redução foi atribuída à inativação do gene de P16<sup>INK4A</sup> pela presença de mutações.

Três principais mecanismos de inativação do gene de P16<sup>INK4A</sup> já foram amplamente descritos em Carcinomas de cabeça e pescoço: a presença de mutações inativadoras do gene (Akanuma *et al.*, 1999), a hipermetilação do promotor e as deleções homozigóticas (Scully *et al.*, 2000).

Nas classes de tumores HPV negativos, nos quais a inativação dos genes de P53 e P16<sup>INK4A</sup> ocorreria mediante a presença de alterações genéticas, os níveis dessas duas proteínas são variáveis e dependentes do tipo de mutações presentes.

#### *Inativação do Gene de P16<sup>INK4A</sup> pela presença de Mutações de Ponto ou Deleções*

Uma elevada expressão das duas proteínas (P53 e P16<sup>INK4A</sup>) é observada na presença de mutações de ponto que promoveriam a síntese de proteínas funcionalmente inativas (revisão em Scully *et al.*, 2000).

Sartor e colaboradores (1999) encontraram uma relação inversa entre a presença de PRb e a de P16<sup>INK4A</sup> em amostras de CECB e linhagens celulares analisadas, sugerindo que a ausência da expressão da proteína era provavelmente devido à presença de aberrações genéticas no gene de P16<sup>INK4A</sup>, e não causada por algum defeito na regulação exercida por PRb.

Uma maior frequência de mutações em linhagens celulares de carcinoma oral também já havia sido observada em outro estudo (Zhang *et al.*, 1994), onde os autores argumentaram que a presença de mutações no gene de P16<sup>INK4A</sup> poderia conferir certa vantagem no crescimento de células, sendo as células portadoras de tais mutações selecionadas positivamente nessas linhagens celulares.

Por outro lado, em tumores resultantes de dano genômico aleatório causado por mutagênicos químicos ou instabilidade genômica, a imuno-reatividade para P16<sup>INK4A</sup> e P53 está freqüentemente reduzida.

Sartor e colaboradores (1999) analisaram a expressão de PRb assim como de dois reguladores da via de PRb, a proteína P16<sup>INK4A</sup> e a ciclina D1, em amostras de CECB, em lesões pré-malignas e em 8 linhagens celulares de carcinoma oral, e encontraram ausência da expressão de P16<sup>INK4A</sup> em 18/26 (69%), 7/9 (78%) e 8/8 (100%) dessas amostras, respectivamente. Esses autores também analisaram o padrão de mutações do gene de P16<sup>INK4A</sup> e observaram uma freqüência de deleções e mutações de ponto desse gene em 19% das amostras de CECB e em 75% das linhagens celulares. Dentre as alterações observadas, destaca-se a presença de mutações de ponto, que resultaram na formação de códons de terminação ou de mutações do tipo “frameshift”, e deleções dos éxons 1 e 2.

A freqüência de deleções observada em porções ou na totalidade do gene de P16<sup>INK4A</sup> varia entre os diferentes trabalhos. Reed e colaboradores (1996) encontraram deleção homozigótica no gene de P16<sup>INK4A</sup> em 67% das amostras de CCECP que estudaram, enquanto que Zhang e colaboradores (1994) não detectaram nenhuma deleção desse gene em 68 amostras de carcinoma de cabeça e pescoço analisadas. Entretanto alguns trabalhos mostraram que a presença de deleções no gene não acarretaria, necessariamente, perda da expressão de P16<sup>INK4A</sup>, assim como a perda da expressão da proteína poderia ocorrer em uma freqüência bem maior do que a presença de deleções nesse gene (Gonzalez-Zulueta *et al.*, 1995).

#### *Inativação do Gene de P16<sup>INK4A</sup> pela presença de Hipermetilação do Promotor*

No estudo conduzido por Otterson e colaboradores (1995) uma completa ausência da expressão de P16<sup>INK4A</sup> foi observada em 16/26 (62%) de amostras de CECB, em 5/9 (56%) de lesões pré-malignas e em 2/8 (25%) das linhagens celulares analisadas, as quais não apresentaram nenhuma mutação no gene de P16<sup>INK4A</sup>. Portanto, além da presença de mutações do gene de P16<sup>INK4A</sup>, outros mecanismos também mostraram ser capazes de promover a diminuição da expressão da proteína, como a metilação do gene de P16<sup>INK4A</sup>, capaz de silenciar a transcrição desse gene (Yuen *et al.*, 2002).

Koscielny e colaboradores (2006), estudaram a correlação da inativação do gene de P16<sup>INK4A</sup> de 67 tumores primários com dados clínicos de pacientes acompanhados por um período de três anos e concluíram que a inativação de P16<sup>INK4A</sup> representa um fato importante no mecanismo de carcinogênese nos carcinomas escamosos de laringe, faringe e cavidade oral. No seu estudo demonstrou-se que o gene de P16<sup>INK4A</sup> estava predominantemente inativada por metilação da região promotora e por perda heterozigotidade na região cromossômica 9p21. A inativação por metilação estava presente em 29% dos casos enquanto a inativação por perda de heterozigotidade estava presente em 32% dos tumores analisados. Esses autores observaram que a taxa de metilação do gene P16<sup>INK4A</sup> não estava relacionada ao tamanho, estágio ou grau de diferenciação histológica dos tumores examinados. Destacaram que independente do mecanismo envolvido, a inativação genômica do gene de P16<sup>INK4A</sup> resultaria em perda funcional ou da expressão da proteína P16<sup>INK4A</sup> com conseqüências para o controle do ciclo celular durante a progressão do tumor.

Ruesga e colaboradores (2006) realizaram a análise da presença de hipermetilação da região promotora de P16<sup>INK4A</sup> em amostras citológicas orais, para verificar a possível utilização desse parâmetro como marcadores em pacientes com risco de desenvolver o Carcinoma Bucal de Células Escamosas. Após estudar 145 pacientes e classificá-los em grupo de tabagistas e etilistas crônicos, grupo de pacientes com lesão prévia de câncer bucal, grupo de pacientes com lesão prévia de câncer laríngeo, e grupo de pacientes com lesão de líquen plano oral, puderam concluir que 20% dos pacientes analisados apresentaram hipermetilação da região promotora do gene P16<sup>INK4A</sup>. Dos pacientes que já haviam apresentado alguma lesão de carcinoma de células escamosas na boca e que tinham a possibilidade de desenvolver nova lesão ou lesão secundária, 46,8% deles, apresentaram hipermetilação de P16<sup>INK4A</sup>. Esses resultados podem indicar que a metilação da região promotora de P16<sup>INK4A</sup> seria uma alteração epigenética freqüente em lesões pré-cancerosas e lesões de carcinoma bucal, e ainda, que essas alterações são eventos primários que persistem e expandem os limites das lesões. Notaram ainda que a hipermetilação em P16<sup>INK4A</sup> era um evento freqüente entre fumantes, porém não observaram associação significativa entre consumo de álcool e hipermetilação de P16<sup>INK4A</sup>. Conclui ainda que a detecção de hipermetilação de P16<sup>INK4A</sup> em amostras citológicas orais é um procedimento simples, que pode ser usado para prever o risco de desenvolvimento ou reincidência de Carcinomas bucais de células

Escamosas.

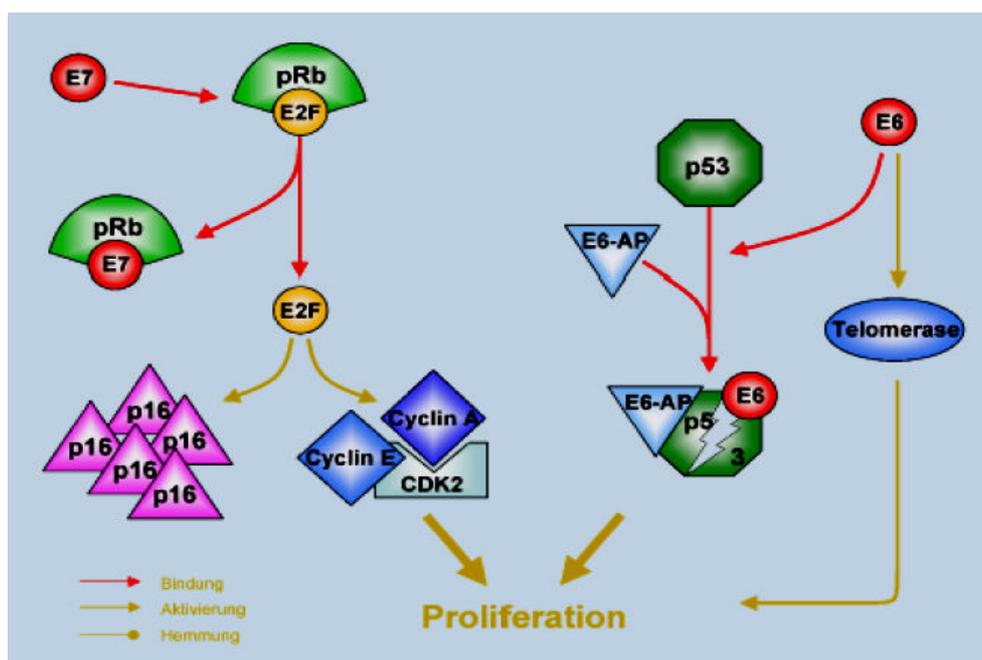
Em outro estudo, desenvolvido por Otha e colaboradores (2009), utilizou-se quatro métodos diferentes para avaliar as alterações genéticas nos genes de P16<sup>INK4A</sup> e P14 em 44 casos de Carcinomas Buciais de Células Escamosas. A supressão de expressão de RNA mensageiro de P16<sup>INK4A</sup> e P14 foi observada em 61,4 % dos casos para P16<sup>INK4A</sup> e 10% para P14. A perda de heterozigotidade de P16<sup>INK4A</sup> e P14 foi observada em 68,2 % dos casos e mutações para os dois genes foi observada em apenas 9% das amostras analisadas para P16<sup>INK4A</sup> e 4,5% para P14. Nos casos de mutação, havia perda de heterozigotidade em 100% dos casos. Observou ainda metilação da região promotora do gene de P16<sup>INK4A</sup> em 63,6% das amostras. Com isso, comprovam que os genes supressores de tumor P16<sup>INK4A</sup> e P14 eram inativados principalmente por metilação. Nas amostras utilizadas, a frequência total detectada de P16<sup>INK4A</sup>, P14 e alterações no locus 9p21 foi de 97,7%, incluindo a perda de heterozigotidade, mutações, metilação e alterações na expressão de mRNA de P16<sup>INK4A</sup> e P14.

Em 2008, O'Regan e colaboradores desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar alterações moleculares adicionais de P16<sup>INK4A</sup> em cânceres de cabeça e pescoço relacionando idade, sitio e a presença de vírus do papiloma humano (HPV). Como demonstrado em outros estudos, em grande parte dos casos, a expressão de P16<sup>INK4A</sup> está comprometida devido a mutações, deleções e hipermetilações. Nesse estudo incluiu-se mais uma variável, as alterações epigenéticas induzidas por HPV, que de acordo com evidências, estariam relacionadas à super - expressão de P16<sup>INK4A</sup> em lesões de carcinoma de células escamosas. Demonstrou-se nesse estudo que a inativação de P16<sup>INK4A</sup> estava presente em 46% dos casos e que a metilação da região promotora do gene P16<sup>INK4A</sup> estava mais presente em mulheres do que em homens. Todos os casos de metilação de P16<sup>INK4A</sup> foram encontrados na região anterior da língua e 75% dos acometidos eram pacientes jovens. Esses resultados indicaram que a metilação de P16<sup>INK4A</sup> é o evento mais comum em pacientes com idade inferior a 40 anos, em contraste com as deleções de P16<sup>INK4A</sup> que foram mais encontradas em pacientes com acima de 40 anos. Observou-se ainda que em casos em que houve detecção das oncoproteínas E6 e E7 do Vírus do Papiloma Humano concomitantemente havia a super - expressão de P16<sup>INK4A</sup>. Dessa maneira os autores concluíram que vários mecanismos relacionados à alteração da expressão genética de P16<sup>INK4A</sup> parecem existir, sendo que a metilação e a deleção desse gene seriam dois mecanismos proeminentes de inativação.

Uma outra hipótese também considerada para a patogênese do carcinoma da cavidade oral têm sido postulada com base nos trabalhos que verificaram um aumento da expressão de P16<sup>INK4A</sup> em amostras de CECB.

Essa hipótese é baseada no bem estabelecido modelo de carcinogênese relacionado ao câncer cervical. O efeito carcinogênico de HPVs de alto risco é fortemente atribuído à ação das duas principais proteínas virais, E6 e E7. A atividade transformadora das oncoproteínas E6 e E7 está principalmente relacionada à capacidade de ligação dessas e inativação das proteínas supressoras de tumor P53 e PRb, respectivamente (**FIGURA 15**). Como mencionado anteriormente, a proteína P16<sup>INK4A</sup> é responsável pela regulação positiva da atividade de PRb por meio da ligação às CDKs 4 e 6 que normalmente inativam PRb por meio de eventos de fosforilação (Trunk *et al.*, 2004), de forma que P16<sup>INK4A</sup> protegeria a PRb de eventos de inativação mediados por fosforilação.

Durante o ciclo celular normal, a PRb controla os níveis de P16<sup>INK4A</sup> por um mecanismo de “feedback” negativo. Porém nos tumores HPV positivos a oncoproteína E7 parece ser capaz não só de inativar a PRb, mas também de superar o efeito da atividade anti-supressora da proteína P16<sup>INK4A</sup> causando um aumento da expressão dessa proteína (Khleif *et al.*, 1996).



**FIGURA 7: Modelo da associação das oncoproteínas E6 e E7 com proteínas do ciclo celular.** [Fonte: Trunk *et al.*, 2004 (modificado)].

No Carcinoma Cervical de Células Escamosas já foi demonstrado que a inativação funcional de PRb pela oncoproteína E7 de HPVs de alto risco é capaz de levar à super-expressão de P16<sup>INK4A</sup> que pode ser demonstrada por meio da técnica de Imunohistoquímica. A maioria desses trabalhos mostrou que alterações da expressão da proteína P16<sup>INK4A</sup> estão intimamente associadas com a progressão da doença (Sano *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 2006; Queiroz *et al.*, 2006; Masumoto *et al.*, 2006; Samama *et al.*, 2006; Ruesga *et al.*, 2006; Koscielny *et al.*, 2006; Ohta *et al.*, 2009).

A super - expressão de P16<sup>INK4A</sup> não tem sido detectada em carcinomas de células escamosas não relacionados à infecção pelo HPV. Além disso, é importante destacar que em Lesões Escamosas Intraepiteliais (LEIs) displásicas da cérvix uterina, a super-expressão de P16<sup>INK4A</sup> é aceita como um marcador da infecção pelo HPV (Yuen *et al.*, 2002).

Baseado no modelo acima, considera-se que a infecção pelo Papilomavírus humano na cavidade oral pode estar relacionada à patogênese do carcinoma bucal, e ainda, que a super-expressão de P16<sup>INK4A</sup> em amostras de CECB observada em diversos trabalhos da literatura (Wiest *et al.*, 2002; Fregonesi *et al.*, 2003; Hafkamp *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; O'Regan *et al.*, 2008) poderia ser consequência da inativação de PRb pela proteína E7, principalmente de HPVs de alto risco.

Embora no presente estudo não tenha sido determinada a infecção pelo HPV nas amostras analisadas, os resultados aqui obtidos do aumento da expressão de P16<sup>INK4A</sup> em amostras de CECB são compatíveis com essa hipótese.

Destaca-se que a expressão do RNAm para a proteína E7 de HPVs de alto risco já foi demonstrada tanto em amostras de câncer cervical e linhagens celulares relacionadas (Ke *et al.*, 1999) quanto em amostras de CCECP e Carcinoma oral de células escamosas (Mannarini *et al.*, 2009).

Entretanto é importante destacar que embora alguns trabalhos tenham verificado a importante associação da expressão de P16<sup>INK4A</sup> com a presença da infecção pelo HPV, principalmente dos de alto risco HPVs 16 e 18 em amostras de lesões orais pré-malignas (Fregonesi *et al.*, 2003; Cunningham *et al.*, 2006;) e de CECB (Wiest *et al.*, 2002; Fregonesi *et al.*, 2003; Hafkamp *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004); outros trabalhos não verificaram essa correlação (Pande *et al.*, 1998; Gasco *et al.*, 2003; Nemes *et al.*, 2006).

Portanto, como será discutido adiante, o verdadeiro papel da infecção pelo HPV na patogênese do carcinoma bucal ainda permanece por ser estabelecido.

#### **5.4 A INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO E A PATOGÊNESE DO CARCINOMA BUCAL**

No presente estudo tentou-se realizar a prevalência da infecção pelo HPV e dos principais tipos oncogênicos nas amostras aqui analisadas, por meio da reação de PCR, porém não obtivemos sucesso no desenvolvimento dessa parte do estudo. Um dos fatores que devem ter contribuído a esse aspecto, consistiu no fato de termos tentado a amplificação do DNA viral em amostras de tecidos fixadas em formol e incluídas em parafina, que são fatores que conhecidamente interferem tanto na qualidade do DNA extraído quanto na capacidade de amplificação da reação de PCR (Resnick *et al.*, 1990; Greer *et al.*, 1991; Shimizu *et al.*, 1995; Poljak, Seme, Gale, 2000; Lehmann, Kreipe, 2001;).

A infecção com subtipos de HPV de alto risco têm sido considerada como um possível fator etiológico, juntamente com os bem estabelecidos fatores de risco, o uso do tabaco e o consumo do álcool, na etiologia multifatorial dos Carcinomas de Cabeça e Pescoço. A incidência do DNA de HPV em tumores de cabeça e pescoço varia na literatura de 0 a 100% (revisão em Sugerman & Shillitoe, 1997; em Scully 2002, Scully *et al.*, 2000; em Syrjänen 2005). Essa ampla variação pode ser explicada por diferenças metodológicas entre os diferentes estudos, incluindo a utilização de distintos métodos de detecção, o número variável de amostras analisadas, o tipo e a localização da lesão, a composição dos grupos estudados, entre outros aspectos (Kozomara *et al.*, 2005).

Alguns autores consideram que a presença da infecção pelo HPV na cavidade bucal seria semelhante ao frequentemente observado nas infecções anogenitais causadas pelo vírus, ou seja, de que as lesões escamosas benignas da cavidade oral, assim como aquelas da faringe, laringe e seios paranasais estariam mais associadas aos tipos de HPV 6 e 11, enquanto que os HPVs 16 e 18 seriam mais encontrados em lesões pré-malignas e da carcinoma bucal.

A taxa do DNA de HPV encontrado em amostras de carcinoma tonsilar é de

51%, considerada uma das mais altas taxas de detecção viral dentre todos os tipos de câncer humanos localizados fora da região anogenital.

Como sugerido, a infecção persistente pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) pode ser citada como um fator de risco relevante na patogênese do CECB (Scully *et al.*, 2000; Syrjänen 2005; Neville *et al.*, 2009). Alguns trabalhos já demonstraram a presença do HPV em lesões de CBCE (Scully, 2002; Kojima *et al.*, 2002; Dahlstrom *et al.*, 2003 e Herrero *et al.*, 2003; Syrjänen, 2005).

As evidências da associação de HPVs de alto risco com lesões neoplásicas bucais existem, porém se comparada à associação observada em lesões da cérvix uterina (>99,7%) (Doorbar, 2005), essa proporção é menor e varia de 10 a 61,5%. O tipo de vírus mais comumente encontrado nessas lesões é o HPV16 seguido pelo HPV18 (Kreimer *et al.*, 2005; Syrjänen, 2005; Doorbar, 2005).

Assim, enquanto não existe um consenso definitivo sobre o envolvimento direto do HPV na patogênese de todos os tipos de carcinomas de cabeça e pescoço, existem evidências da correlação do HPV no desenvolvimento dos tumores de cabeça e pescoço HPV-positivos como o carcinoma tonsilar, e uma proposição de que esses tumores poderiam se desenvolver a partir de mecanismos diferentes daqueles observados em carcinomas genitais associados ao HPV, como o câncer cervical (Syrjanen, 2005).

## **5.5 UTILIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE P16<sup>INK4A</sup> COMO BIOMARCADOR DO CARCINOMA BUCAL**

A maioria dos estudos dedicados à avaliação de bio - marcadores do CECB foram direcionados à análise de componentes associados a duas vias regulatórias bem definidas do ciclo celular, a de PRb e a de P53. Em relação aos trabalhos que avaliaram a expressão de P16<sup>INK4A</sup> ou de outros marcadores relacionados às duas vias anteriores, destaca-se que a maioria dos estudos publicados utilizaram um único marcador (Yuen *et al.*, 2002), como o estudo aqui desenvolvido, ou de 2-3 marcadores biológicos (Bova *et al.*, 1999; Jayasurya *et al.*, 2005, Suzuki *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2009; Greer Jr *et al.*, 2008).

Visando a identificação de marcadores que pudessem ser relacionados ao prognóstico do carcinoma bucal, Shah e colaboradores (2009) analisaram a expressão de 10 marcadores moleculares em 132 amostras de CECB. Esses autores salientaram que a análise de um número reduzido de biomarcadores não seria suficiente para avaliar a relação e complexa conexão possivelmente estabelecida entre as moléculas carcinogênicas e as suas vias relacionadas. De forma interessante, por meio de uma análise univariada de um total de 89 pacientes que puderam ser acompanhados por um período de 2 anos, dentre os 10 marcadores analisados, a expressão das moléculas de P16<sup>INK4A</sup>, P53 (proteínas regulatórias do ciclo celular) e de Stat 3 (proteína envolvida em uma via de sinalização mitógena), mostraram potencial como biomarcadores de predição de prognóstico. Quando a expressão de P16<sup>INK4A</sup> foi comparada entre amostras de CBCE de pacientes que apresentaram recidiva da doença e aqueles que não a apresentaram, a perda da expressão da proteína esteve relacionada com um maior risco de desenvolvimento de recorrência do CECB (Shah *et al.*, 2009).

A variação na expressão de P16<sup>INK4A</sup> no processo de desenvolvimento do carcinoma bucal também foi avaliada por Suzuki e colaboradores (2006). Após análise de amostras de Carcinoma bucal de células escamosas, os autores concluíram que devido à significativa correlação observada entre a expressão de P16<sup>INK4A</sup> e o comportamento biológico dessa neoplasia, a proteína P16<sup>INK4A</sup> poderia ser utilizada como biomarcador confiável pra se estimar um prognóstico das lesões cancerosas, assim como para a escolha de medidas de manejo e de controle dessas lesões.

A significância prognóstica da expressão de P16<sup>INK4A</sup> permanece em controvérsia. Nos estudos acima a expressão de P16<sup>INK4A</sup> foi considerada um marcador molecular útil para a predição do risco de recorrência. De maneira similar, os estudos desenvolvidos por Jayasurya e colaboradores (2005) e por Bova e colaboradores (1999) correlacionaram a perda de função de P16<sup>INK4A</sup> com um pobre prognóstico da doença. Entretanto Pande e colaboradores (2002) não conseguiram estabelecer qualquer significância prognóstica para a expressão de P16<sup>INK4A</sup>.

Em contrapartida, no estudo desenvolvido por Buajeeb e colaboradores (2009) a expressão de P16<sup>INK4A</sup> foi analisada em 16 casos de CBCE e 15 casos de Leucoplasia Oral, sendo observada marcação positiva para a proteína em apenas 18,5% das amostras de câncer e em 26,7% das amostras de Leucoplasia. Os autores concluíram nesse

trabalho que a proteína P16<sup>INK4A</sup> não poderia ser utilizada como biomarcador de progressão do Carcinoma Bucal de Células Escamosas.

Destaca-se que o estudo aqui apresentado foi de caráter retrospectivo e direcionado à avaliação da expressão de P16<sup>INK4A</sup> em 25 amostras de Carcinoma Epidermóide da Cavidade Bucal, não sendo dessa forma analisada a expressão dessa proteína em amostras correspondentes a Lesões precursoras dessa neoplasia. Assim, a expressão de P16<sup>INK4A</sup> não pôde ser avaliada como molécula bio - marcadora de progressão do CECB.

Em adição ao relevante papel de P16<sup>INK4A</sup> na patogênese do CECB, a literatura reporta a existência de diversas outras moléculas que apresentam um grande potencial como importantes bio - marcadores de progressão do carcinoma bucal.

Uma dessas moléculas é o produto do GST P21<sup>Cip1</sup> um potente inibidor da atividade de CDKs, pode ser induzido por uma via P53 dependente ou P53 independente (DiGiuseppe *et al.*, 1995). A expressão de P21<sup>Cip1</sup> é normalmente detectada em amostras de epitélio normal, enquanto que amostras de epitélio apresentando graus de displasia leve, moderada e severa, e amostras de CBCE exibiram uma perda progressiva de P21<sup>Cip1</sup> sugerindo que alterações na expressão dessa proteína podem representar um evento precoce na carcinogênese oral (Shintani *et al.*, 2002). No mesmo estudo, a expressão de P12<sup>DOC-1</sup> e P16<sup>INK4A</sup> foi avaliada em 20 amostras de mucosa oral normal, em 42 amostras de lesões pré-malignas (displasia oral) e em 117 amostras de CECB. Esses autores encontraram uma perda completa da expressão de P12<sup>DOC-1</sup> e P16<sup>INK4A</sup> em 72% e 69,2% nas amostras de CECB, e em 14,3% e 28,6% das amostras de displasia (Shintani *et al.*, 2002).

A proteína P27<sup>KIP1</sup> associa-se aos complexos ciclina E-CDK2; ciclina A-CDK2 e ciclina D1-CDK4 e impede a ativação dos mesmos. A remoção de P27<sup>KIP1</sup> por meio de sua ligação ao complexo ciclina D2-CDK, permite a progressão do ciclo celular através do “checkpoint” G1-S (Sherr, 1996). A imuno-reatividade para P27<sup>KIP1</sup> é observada no epitélio normal e em amostras de displasia leve e moderada, porém a redução de P27<sup>KIP1</sup> já foi observada em vários tumores humanos incluindo o carcinoma bucal (Kudo *et al.*, 2000). De fato, amostras de CECB e aquelas apresentando displasia severa exibem uma perda freqüente da expressão de P27<sup>KIP1</sup> (Shintani *et al.*, 2002). Os últimos autores

concluem que alterações na expressão das ciclina E e D1, de CDK2 e 4, de P21<sup>Cip1</sup>, P27<sup>KIP1</sup> e P16<sup>INK4A</sup>, parecem ser freqüentes em lesões orais pré-neoplásicas e neoplásicas, e poderiam contribuir, de forma relevante, à progressão da Carcinogênese oral.

Concluimos, do estudo aqui apresentado, que faz-se necessário o desenvolvimento de novos estudos de caráter prospectivo ou mesmo retrospectivo, onde um número maior de amostras provenientes de pacientes portadores de CECB possa ser analisado, e nos quais além de P16<sup>INK4A</sup>, outros novos marcadores moleculares possam ser avaliados quanto ao seu papel no desenvolvimento dessa importante neoplasia.

## **6. CONCLUSÕES**

---

- 1) No presente estudo verificou-se que os pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Bucal apresentaram perfil epidemiológico e sintomatologia clínica que são comumente observados em indivíduos portadores dessa neoplasia.
- 2) Observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a expressão da proteína P16<sup>INK4A</sup> apresentada por amostras de CECB em comparação àquela apresentada por tecidos saudáveis.
- 3) Verificou-se correlação positiva entre a expressão de P16<sup>INK4A</sup> e o hábito do tabagismo e entre o sítio de localização das lesões no interior da cavidade oral.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AI L, *et al.* The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Mod Pathol* 2003; 16:944-50.

AKANUMA D, *et al.* Inactivation of the p16 (INK4a) gene in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncology* 1999; 35:476-83.

ANDERSSON S, *et al.* Expression of E6/E7 mRNA from 'high risk' human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16INK4a. *Int J Oncol* 2006; 29:705-11.

ANDL T, *et al.* Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar Squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res.* 1998; 58: 5-13.

ARIFIN MT, *et al.* Cytoplasmic, but not nuclear, p16 expression may signal poor prognosis in high-grade astrocytomas. *J Neurooncol* 2006; 77: 273-7.

AXELL T, *et al.* Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21, 1994. *J Oral Pathol Med* 1996; 25: 49-54.

BAAN R, STRAIF K, GROSSE Y, SECRETAN B, EL GHISSASSI F, BOUVARD V, ALTIERI A, COGLIANO V, WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group: Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncol* 2007, 8:292-293.

BADARACCO G, *et al.* Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. *Anticancer Res* 2000; 20: 1301-6.

BAGCHI S, WEINMANN R, RAYCHAUDHURI P. The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Planta Med.* 1991; 57(3):282-3.

BATTAGLIA R, CONACHER HBS, PAGE BD. Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: a review. *Food Addit Contam* 1990, 7:477-496.

BAYKUL T, *et al.*, Early Diagnosis of Oral Cancer. *The Journal of International Medical Research.* 2010; 38: 737-749.

BERNARD D, *et al.*, CBX7 controls the growth of normal and tumor-derived prostate cells by repressing the Ink4a/Arf locus. *Oncogene.* 2005; 24(36):5543-51.

BERRINO F, *et al.*, editors. Survival of cancer patients in Europe: the EURO CARE-2 study. IARC Scientific Publication No. 151. Lyon, France;1999.

BISHOP JM. The molecular genetics of cancers. *Science* 1987; **235**: 305-11.

BOUDA M, *et al.* “High risk” HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol* 2000; 13: 644-53

BOVA RJ, *et al.* Cyclin D1 and p16<sup>INK4A</sup> expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2810-2819.

BRAAKHUIS BJ, VISSER O, LEEMANS CR. Oral and oropharyngeal cancer in The Netherlands between 1989 and 2006: Increasing incidence, but not in young adults. *Oral Oncol.* 2009 Sep;45(9):e85-9. Epub 2009 May 19.

BRADLEY KT, BUDNICK SD, LOGANI S. Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity. *Mod Pathol* 2006; 19: 1310-6.

BRASILEIRO FILHO G. *Bogliolo Patologia*. Editora Guanabara Koogan; 7<sup>a</sup> Edição, 2006.

BUAJEED W, *et al.* Expression of p16 in oral cancer and premalignant lesions. *J Oral PatholMed* 2009; 38: 104-108.

CALIARI, MV. *Princípios de Morfometria Digital: KS300 para iniciantes*. 1<sup>a</sup> Ed. UFMG, 1997. 149p.

CAIRNS P, *et al.* Frequency of homozygous deletion at p16/cdkn2 in primary human tumors. *Nat Genetics* 1995; 11:210-2.

CARTWRIGHT NH, *et al.* Detection of human papillomavirus in vulval carcinoma using semi-nested PCR and restriction enzyme typing: a rapid and sensitive technique. *Clin Mol Pathol.* 1996;49(4):M236-9.

CHANG SE, *et al.* Ras mutations in United Kingdom examples examples of oral malignancies are infrequent. *Int J Cancer* 1991; 48:409-12.

CHATURVEDI AK, *et al.* Incidence trends for human papillomavirus-related and – unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 2008; 26: 612-19.

CHEN TY, *et al.* The clinical significance of pathological findings in surgically resected margins of the primary in head and neck carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987; 13:833-7.

CONWAY DI, *et al.* Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990-1999) -- recent trends and regional variation. *Oral Oncol.* 2006 Jul;42(6):586-92. Epub 2006 Feb 15.

COWAN CG, *et al.* Potentially malignant oral lesions in northern Ireland: a 20-year population-based perspective of malignant transformation. *Oral Dis.* 2001;7(1): 18-24.

CUFFARI L, *et al.* Pain complaint as the first symptom of oral cancer: a descriptive study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Jul;102(1):56-61. Epub 2006 Apr 24.

CUNNINGHAM LL Jr, *et al.* Overexpression of p16INK4 is a reliable marker of human papillomavirus-induced oral high-grade squamous dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 ;102(1):77-81. Epub 2006 Apr 24.

DAHLSTROM KR, *et al.* Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(7):2620-6.

DE PAULA AM, *et al.* Cell proliferation markers in the odontogenic keratocyst: effect of inflammation. *J Oral Pathol Med.* 2000; 29(10):477-82.

DIGIUSEPPE JA, *et al.* p53-independent expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol.* 1995; 147(4):884-8.

DOORBAR J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005; 32 Suppl 1:S7-15.

DRUMMOND SN, *et al.* TP53 codon 72 polymorphism in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2002 Nov-Dec;22(6A):3379-81

D'SOUZA G, *et al.* Six-month natural history of oral versus cervical human papillomavirus infection. *Int J Cancer.* 2007 Jul 1;121(1):143-50.

D'SOUZA G, *et al.* Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis.* 2009 May 1;199(9):1263-9.

DUARTE EC, *et al.* Genetic polymorphisms of carcinogen metabolizing enzymes are associated with oral leukoplakia development and p53 overexpression. *Anticancer Res.* 2008 Mar-Apr;28(2A):1101-6.

ELEUTÉRIO J Jr, *et al.* Prognostic markers of high-grade squamous intraepithelial lesions: the role of p16INK4a and high-risk human papillomavirus. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007;86(1):94-8.

EPSTEIN JB, *et al.* Quality of life and oral function following radiotherapy for head and neck cancer. *Head Neck.* 1999 Jan;21(1):1-11.

FERLAY J, *et al.* GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>

FOUNTAIN JW, *et al.* Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(21):10557-61.

FRANCESCHI S, *et al.* Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res.* 1990; 50(20):6502-7.

FRANCESCHI S, *et al.* Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. *Oral Oncol.* 2000; 36(1):106-15.

FRANCO EL, *et al.* Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer.* 1989 Jun 15;43(6):992-1000.

FREGONESI PA, *et al.* p16(INK4A) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. *J Histochem Cytochem.* 2003 Oct;51(10):1291-7.

GARZINO-DEMO P, *et al.* Clinicopathological parameters and outcome of 245 patients operated for oral squamous cell carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg.* 2006 Sep;34(6):344-50. Epub 2006 Jul 21.

GASCO M, CROOK T. The p53 network in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2003; 39(3):222-31.

GAZZERI S, *et al.* Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene.* 1998; 16(4):497-504.

GEISLER SA, *et al.* p16 and p53 Protein expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8(11):3445-53.

GIL Z, FLISS DM. Contemporary management of head and neck cancers. *Isr Med Assoc J.* 2009;11(5):296-300.

GILLISON ML, *et al.* Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(9):709-20.

GOLOGAN O, BARNES EL, HUNT JL. Potential diagnostic use of p16INK4A, a new marker that correlates with dysplasia in oral squamoproliferative lesions. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(6):792-6.

GONZÁLES-MOLES MA, *et al.* p16 Expression in squamous carcinomas of the tongue. *Onkologie.* 2002;25(5):433-6.

GONZALEZ-ZULUETA M, *et al.* Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res.* 1995;55(20):4531-5.

GOODRICH DW, LEE WH. Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1155(1):43-61.

GREER CE, LUND JK, MANOS MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Appl.* 1991;1(1):46-50.

GREER RO JR, *et al.* Is p16(INK4a) protein expression in oral ST lesions a reliable precancerous marker? *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37(9):840-6. Epub 2008 Jul 7.

HAFKAMP HC, *et al.* A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer.* 2003;107(3):394-400.

HAMMARSTEDT L, *et al.* The incidence of tonsillar cancer in Sweden is increasing. *Acta Otolaryngol.* 2007 Sep;127(9):988-92.

HANSSON BG, *et al.* Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol* 2005; 125: 1337-44.

HARDISSON D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2003;260(9):502-8. Epub 2003 May 8.

HERRERO R, *et al.* Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95(23):1772-83.

HIROTA SK, *et al.* Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: a comparative analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008 Apr 1;13(4):E227-31.

HOLLSTEIN M, *et al.* p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991 Jul 5;253(5015):49-53.

IARC . GLOBOCAN 2002. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide (2002 estimates). 2004.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Estimativa 2010 incidência de câncer no brasil. Rio de Janeiro: INCA. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 11 de dezembro de 2009.

JALAL H, *et al.* Detection of human papilloma virus type 16 DNA in oral squames from normal young adults. *J Oral Pathol Med.* 1992; 21(10):465-70.

JAYASURYA R, *et al.* Phenotypic alterations in Rb pathway have more prognostic influence than p53 pathway proteins in oral carcinoma. *Mod Pathol.* 2005; 18(8):1056-66.

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

JOHNSON N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ.* 2001 Apr;65(4):328-39.

JOVANOVIC A, *et al.* Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1993 Nov;22(10):459-62.

KADEMANI D, *et al.* Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Nov;63(11):1599-605.

KADEMANI D. Oral cancer. *Mayo Clin Proc.* 2007 Jul;82(7):878-87.

KAINULAINEN T, *et al.* Altered distribution and synthesis of laminin-5 (kalinin) in oral lichen planus, epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 1997;136(3):331-6.

KAMB A, *et al.* Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet.* 1994;8(1):23-6.

KE LD, *et al.* Expression of human papillomavirus E7 mRNA in human oral and cervical neoplasia and cell lines. *Oral Oncol.* 1999;35(4):415-20.

KHLEIF SN, *et al.* Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(9):4350-4.

KREIMER AR, *et al.* Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. *J Infect Dis.* 2004 Feb 15;189(4):686-98. *Epub* 2004 Feb 2.

KOJIMA A, *et al.* Human papillomavirus type 38 infection in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2002 Sep;38(6):591-6.

KOSCIELNY S, *et al.* The prognostic relevance of p16 inactivation in head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2007;69(1):30-6. Epub 2006 Nov 2.

KOSKINEN WJ, *et al.* Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer.* 2003;107(3):401-6.

KOWALSKI LP, *et al.* Lateness of diagnosis of oral and oropharyngeal carcinoma: factors related to the tumour, the patient and health professionals. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1994 May;30B(3):167-73

KOZOMARA R, *et al.* p53 mutations and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas: correlation with overall survival. *J Craniomaxillofac Surg.* 2005;33(5):342-8.

KREIMER AR, *et al.* HPV16 semiquantitative viral load and serologic biomarkers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer.* 2005;115(2):329-32.

KUDO Y, *et al.* Reduced expression of p27(Kip1) correlates with an early stage of cancer invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2000;151(2):217-22.

KÜFFER R, LOMBARDI T. Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). *Oral Oncol.* 2002;38(2):125-30.

LAI S, EL-NAGGAR AK. Differential expression of key cell cycle genes (p16/cyclin D1/pRb) in head and neck squamous carcinomas. *Lab Invest.* 1999;79(3):255-60.

LACHENMEIER DW, *et al.* Ethyl carbamate analysis in German fruit spirits and Brazilian sugarcane spirits (cachaça): Improved sample cleanup with automated parallel evaporation. *Deut Lebensm Rundsch* 2009, 105:507-512.

LACHENMEIER DW, *et al.* Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira. *BMC Cancer* 2010, 10:266.

LANG JC, *et al.* Frequent mutation of p16 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope.* 1998;108(6):923-8.

LEES J. Incidence of weight loss in head and neck cancer patients on commencing radiotherapy treatment at a regional oncology centre. *Eur J Cancer Care (Engl).* 1999 Sep;8(3):133-6.

LEHMANN U, KREIPE H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods.* 2001;25(4):409-18.

LEVINE AJ, MOMAND J, FINLAY CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature.* 1991;351(6326):453-6.

LI W, *et al.* The expression of key cell cycle markers and presence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tonsil. *Head Neck.* 2004;26(1):1-9.

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

MANNARINI L, *et al.* Human Papilloma Virus (HPV) in head and neck region: review of literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2009;29(3):119-26.

MARUR S, *et al.* HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 2010; 11: 781-789.

MASUMOTO N, *et al.* P16 overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Hum Pathol.* 2003;34(8):778-83.

MAYOI X, *et al.* Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene.* 1993;8(9):2561-6.

MCDOWELL JD. An overview of epidemiology and common risk factors for oral squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am.* 2006 Apr;39(2):277-94.

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

MELLIN H, *et al.* Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer.* 2002;102(2):152-8.

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

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

MUIRHEAD DM, HOFFMAN HT, ROBINSON RA. Correlation of clinicopathological features with immunohistochemical expression of cell cycle regulatory proteins p16 and retinoblastoma: distinct association with keratinisation and differentiation in oral cavity squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol.* 2006;59(7):711-5. Epub 2006 Feb 7.

MÜNGER K. Disruption of oncogene/tumor suppressor networks during human carcinogenesis. *Cancer Invest.* 2002;20(1):71-81.

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

NAKAHARA Y, *et al.* Alterations of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett.* 2000 Nov 10;160(1):3-8.

NATARAJAN E, *et al.* Co-expression of p16(INK4A) and laminin 5 gamma2 by microinvasive and superficial squamous cell carcinomas in vivo and by migrating wound and senescent keratinocytes in culture. *Am J Pathol.* 2003 Aug;163(2):477-91.

NEMES JA, *et al.* Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Sep;102(3):344-52. Epub 2006 Mar 20.

NEVILLE BW, DAY TA. Oral cancer and precancerous lesions. CA Cancer J Clin. 2002 Jul-Aug;52(4):195-215.

NEVILLE B, *et al.* Oral and Maxillofacial Pathology. 3<sup>a</sup> Ed. Saunders, 2009. 972p.

NÓBREGA ICC, *et al.* Ethyl carbamate in pot still cachaças (Brazilian sugar cane pirlits): Influence of distillation and storage conditions. Food Chem 2009, 117:693-697.

O'REGAN EM, *et al.* p16(INK4A) genetic and epigenetic profiles differ in relation to age and site in head and neck squamous cell carcinomas. Hum Pathol. 2008 Mar;39(3):452-8.

OHTA S, *et al.* Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009 Jan;107(1):81-91.

OSTWALD C, *et al.* Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa. J Oral Pathol Med. 1994 May;23(5):220-5.

OSTWALD C, *et al.* p53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinomas of the lip and the oral cavity. Int J Cancer. 2000 Oct 1;88(1):82-6.

OTTERSON GA, *et al.* CDKN2 gene silencing in lung cancer by DNA hypermethylation and kinetics of p16INK4 protein induction by 5-aza 2'deoxyctidine. Oncogene. 1995 Sep 21;11(6):1211-6.

PANDE P, *et al.* pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. Oral Oncol. 1998 Sep;34(5):396-403.

PAPADIMITRAKOPOULOU V, *et al.* Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. Oncogene. 1997 Apr 17;14(15):1799-803.

PARADISO A, *et al.* Altered p16INK4a and Fhit expression in carcinogenesis and progression of human oral cancer. Int J Oncol. 2004 Feb;24(2):249-55.

PELUCCHI C, *et al.* Alcohol and tobacco use, and cancer risk for upper aerodigestive tract and liver. Eur J Cancer Prev. 2008 Aug;17(4):340-4.

PETTI S. Lifestyle risk factors for oral cancer. Oral Oncol. 2009 Apr-May;45(4-5):340-50. Epub 2008 Jul 31.

POI MJ, *et al.* Somatic INK4a-ARF locus mutations: a significant mechanism of gene inactivation in squamous cell carcinomas of the head and neck. Mol Carcinog. 2001 Jan;30(1):26-36.

POLJAK M, SEME K, GALE N. Rapid extraction of DNA from archival clinical specimens: our experiences. Pflugers Arch. 2000;439(3 Suppl):R42-4.

POPOVIĆ B, *et al.* Cancer genes alterations and HPV infection in oral squamous cell carcinoma. Int J Oral Maxillofac Surg. 2010 Jun 23. [Epub ahead of print]

QUEIROZ C, *et al.* P16(INK4a) expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract.* 2006;202(2):77-83. Epub 2005 Dec 22.

RALHAN R, *et al.* Clinical significance of altered expression of retinoid receptors in oral precancerous and cancerous lesions: relationship with cell cycle regulators. *Int J Cancer.* 2006 Mar 1;118(5):1077-89.

REED AL, *et al.* High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996 Aug 15;56(16):3630-3.

RESNICK RM, *et al.* Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst.* 1990 Sep 19;82(18):1477-84.

RICH AM, RADDEN BG. Squamous cell carcinoma of the oral mucosa: a review of 244 cases in Australia. *J Oral Pathol.* 1984 Oct;13(5):459-71.

ROBINSON KL, MACFARLANE GJ. Oropharyngeal cancer incidence and mortality in Scotland: are rates still increasing? *Oral Oncol.* 2003 Jan;39(1):31-6.

ROBINSON NP, MICKELSON AR. Early diagnosis of oral cavity cancers. *Otolaryngol Clin North Am* 2006; 39: 295-306.

ROCCO JW, SIDRANSKY D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res.* 2001 Mar 10;264(1):42-55.

RODRIGUEZ T, *et al.* Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol.* 2004 Feb;40(2):207-13.

RUESGA MT, *et al.* p16(INK4a) promoter hypermethylation in oral scrapings of oral squamous cell carcinoma risk patients. *Cancer Lett.* 2007 May 18;250(1):140-5. Epub 2006 Nov 17.

RYERSON AB, *et al.* Burden of potentially human papillomavirus-associated cancers of the oropharynx and oral cavity in the US, 1998-2003. *Cancer* 2008; 113: 2901-09.

SAMAMA B, LIPSKER D, BOEHM N. p16 expression in relation to human papillomavirus in anogenital lesions. *Hum Pathol.* 2006 May;37(5):513-9.

SANO T, *et al.* Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia. *Pathol Int.* 2002 May-Jun;52(5-6):375-83.

SARTOR M, *et al.* Role of p16/MTS1, cyclin D1 and RB in primary oral cancer and oral cancer cell lines. *Br J Cancer.* 1999 Apr;80(1-2):79-86.

SCHANTZ SP, YU GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002 Mar;128(3):268-74.

SCHEPMAN KP, *et al.* Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. *Oral Oncol.* 1998 Jul;34(4):270-5.

SCHLECHT NF, *et al.* Effect of type of alcoholic beverage on the risks of upper aerodigestive tract cancers in Brazil. *Cancer Causes Control* 2001, 12:579-587.

SCHWARTZ SM, *et al.* Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Nov 4;90(21):1626-36.

SCULLY C, FIELD JK, TANZAWA H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* 2000a May; 36:256-263.

SCULLY C, FIELD JK, TANZAWA H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 2. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* 2000b May; 36:311-327.

SCULLY C, FIELD JK, TANZAWA H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 3. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* 2000c May; 36:404-413.

SCULLY C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol.* 2002 Apr;38(3):227-34.

SCULLY C, BAGAN JV. Oral Squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Diseases.* 2009; 15: 388-399.

SECRETAN B, *et al.* A review of human carcinogens - Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol* 2009, 10:1033-1034.

SERRANO M, *et al.* Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell.* 1996 Apr 5;85(1):27-37.

SHAH NG, *et al.* Prognostic significance of molecular markers in oral squamous cell carcinoma: a multivariate analysis. *Head Neck.* 2009 Dec;31(12):1544-56.

SHERR CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996 Dec 6;274(5293):1672-7.

SHERR CJ, ROBERTS JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 1995 May 15;9(10):1149-63.

SHIBOSKI CH, SHIBOSKI SC, SILVERMAN S JR. Trends in oral cancer rates in the United States, 1973-1996. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000 Aug;28(4):249-56.

SHIBOSKI CH, SCHMIDT BL, JORDAN RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. *Cancer.* 2005 May 1;103(9):1843-9.

SHIMIZU N, *et al.* A novel RNA splicing mutation in Japanese patients with Wilson disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Dec 5;217(1):16-20.

SHINDOH M, *et al.* Detection of human papillomavirus DNA sequences in tongue squamous-cell carcinoma utilizing the polymerase chain reaction method. *Int J Cancer.* 1992 Jan 21;50(2):167-71.

SHINTANI S, *et al.* p12(DOC-1) is a novel cyclin-dependent kinase 2-associated protein. *Mol Cell Biol.* 2000 Sep;20(17):6300-7.

SHINTANI S, *et al.* Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity. *Oral Oncol.* 2002 Apr;38(3):235-43.

SILVERMAN S Jr, GROSKY M, LOZADA F. Oral leukoplakia and malign transformation: a follow up study of 257 patients. *Cancer* 1984; 53: 563-568.

SILVERMAN S JR. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J Am Dent Assoc.* 2001 Nov;132 Suppl:7S-11S.

SMITH EM, *et al.* Prevalence of human papillomavirus in the oral cavity/oropharynx in a large population of children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J.* 2007 Sep;26(9):836-40.

SNIJDERS PJ, *et al.* Analysis of p53 status in tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *J Gen Virol.* 1994 Oct;75 ( Pt 10):2769-75.

SNIJDERS PJ, *et al.* Prevalence of mucosotropic human papillomaviruses in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer.* 1996 May 16;66(4):464-9.

STANLEY MA, PETT MR, COLEMAN N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans.* 2007 Dec;35(Pt 6):1456-60.

SUGERMAN PB, SHILLITOE EJ. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. *Oral Dis.* 1997 Sep;3(3):130-47.

SUMMERGILL KF, *et al.* Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 Jan;91(1):62-9.

SUPIĆ G, *et al.* Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol.* 2009 Dec;45(12):1051-7. Epub 2009 Aug 8.

SUZUKI H, SUGIMURA H, HASHIMOTO K. p16INK4A in oral squamous cell carcinomas--a correlation with biological behaviors: immunohistochemical and FISH analysis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006 Nov;64(11):1617-23.

SYRJÄNEN KJ, *et al.* Human papillomavirus (HPV) involvement in squamous cell lesions of the oral cavity. *Proc Finn Dent Soc.* 1983;79(1):1-8.

SYRJÄNEN KJ, SYRJÄNEN SM. Human papillomavirus (HPV) typing as an adjunct to cervical cancer screening. *Cytopathology.* 1999 Feb;10(1):8-15.

SYRJÄNEN S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol.* 2005 Mar;32 Suppl 1:S59-66.

TAM SW, SHAY JW, PAGANO M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16Ink4. *Cancer Res.* 1994 Nov 15;54(22):5816-20.

TERMINE N, *et al.* HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol.* 2008 Oct;19(10):1681-90. Epub 2008 Jun 16.

TODD R, *et al.* Deleted in oral cancer-1 (doc-1), a novel oral tumor suppressor gene. *FASEB J.* 1995 Oct;9(13):1362-70.

TODD R, *et al.* Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(1):51-61.

TRUNK MJ, *et al.* Morphologic characteristics of p16INK4a-positive cells in cervical cytology samples. *Acta Cytol.* 2004 Nov-Dec;48(6):771-82.

TSAI CH, *et al.* The correlation between alteration of p16 gene and clinical status in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2001 Oct;30(9):527-31.

TSANTOULIS PK, *et al.* Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol.* 2007 Jul;43(6):523-34. Epub 2007 Jan 26.

TYRING SK. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *J Am Acad Dermatol.* 2000 Jul;43(1 Pt 2):S18-26.

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

VAIRAKTARIS E, *et al.* Loss of tumour suppressor p16 expression in initial stages of oral oncogenesis. *Anticancer Res.* 2007 Mar-Apr;27(2):979-84.

VALLECILLO CAPILLA M, *et al.* Factors related to survival from oral cancer in an Andalusian population sample (Spain). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007 Nov 1;12(7):E518-23.

VENUTI A, *et al.* Physical state and expression of human papillomavirus in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa. *J Med Virol.* 2000 Apr;60(4):396-402.

VILLIERS EM, *et al.* Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer.* 1985 Nov 15;36(5):575-8.

WALDRON CA, SHAFER WG. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer.* 1975 Oct;36(4):1386-92.

WANG J, *et al.* Detection of the E7 transform gene of human papilloma virus type 16 in human oral squamous cell carcinoma. *Chin J Dent Res.* 1998 Dec;1(3):35-7.

WARNAKULASURIYA KA, TAVASSOLI M, JOHNSON NW. Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1998 Sep;27(8):376-81.

WATTS SL, BREWER EE, FRY TL. Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991 Jun;71(6):701-7.

WIEST T, *et al.* Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene.* 2002 Feb 28;21(10):1510-7.

WILSON GD, *et al.* p53 status of head and neck cancer: relation to biological characteristics and outcome of radiotherapy. *Br J Cancer.* 1995 Jun;71(6):1248-52.

WONG DT, *et al.* Molecular biology of human oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996;7(4):319-28.

WOODS KV, *et al.* Analysis of human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1993 Mar;22(3):101-8.

XIONG Y, ZHANG H, BEACH D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev.* 1993 Aug;7(8):1572-83.

YOO J, *et al.* Altered expression of G1 regulatory proteins in human soft tissue sarcomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2002 May;126(5):567-73.

Yuen PW, *et al.* Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol.* 2002 Jan;55(1):58-60.

ZHANG SY, *et al.* Higher frequency of alterations in the p16/CDKN2 gene in squamous cell carcinoma cell lines than in primary tumors of the head and neck. *Cancer Res.* 1994 Oct 1;54(19):5050-3.

## **8. ANEXOS**

### **8.1 ANEXO 1: MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO APRESENTADO AOS PACIENTES PARA COLETA DE MATERIAL A SER UTILIZADO COMO CONTROLE NEGATIVO.**

#### **TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO**

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a utilização do fragmento da lesão que será coletado para realização do exame histopatológico para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

LOCAL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ .

\_\_\_\_\_  
NOME DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
NOME DO RESPONSÁVEL

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_

No. \_\_\_\_\_

Pesquisadores:

**Annamaria Ravara Vago.** Telefone: (31) 3409-2783

**Francisco Bernardo Arreguy de Oliveira.** Telefone: (31) 88131361 / (31) 3375-1361.

**8.2 ANEXO2: PROTOCOLO DE PESQUISA SUBMETIDO AO COEP****Protocolo de Pesquisa**

protoc2.doc ou eticprot.897(3)

**I.1. Título do Projeto:**

Comparação da Expressão de Proteínas do Ciclo Celular em Lesões de Carcinoma Bucal de Células Escamosas Associadas ou Não à Infecção pelo Vírus do Papiloma Humano

**I.2. Pesquisador Responsável\***

Nome: Annamaria Ravara Vago

Identidade: M-7459581

CPF:874.345.397-04

Endereço:Rua Estanislau Fernandes, Nº 197, Bairro Ouro Preto, BH, MG.

Correspondência: CEP 31340-130

Telefone: 3409-2783

Correio eletrônico:arvago@icb.ufmg.br

Nome: Francisco Bernardo Arreguy de Oliveira

Identidade: MG-8263618

CPF: 054.962.346.97

Endereço: Rua Profa Maria Coutinho, 378, Bairro João Pinheiro, BH, MG

Correspondência: CEP 30530-600

Telefone: 3375-1361

Correio eletrônico: franciscoarreguy@yahoo.com.br

\* Orientador(a) e Aluno(a) em caso de programas de mestrado ou doutorado. O princípio da co-responsabilidade é válido. Para alunos (as) de graduação, somente o(a) orientador(a).

### I.3. Instituição Responsável:

---

Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG

---

### I.4. Projeto aprovado em

---

Diretor da Unidade

---

Chefe do Departamento

Recebido na Comissão de Ética da  
UFMG em

Para o relator em

Parecer avaliado em reunião de

---

Aprovado: Diligência/pendências:

Não aprovado:

## II. Título do Projeto

Comparação da Expressão de Proteínas do Ciclo Celular em Lesões de Carcinoma Bucal de Células Escamosas Associadas ou Não à Infecção pelo Vírus do Papiloma Humano

---

## II. Sumário do projeto (não exceda o espaço abaixo)

É sabido que dentre os carcinomas que acometem a cavidade oral, o Carcinoma Bucal de Células Escamosas (CBCE) é o que ocorre com maior frequência. Sabe-se também que trata-se de uma doença multifatorial que pode estar relacionada ao tabagismo, ao consumo de álcool, à exposição à luz solar e à infecção pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV).

Estudos principalmente desenvolvidos em lesões precursoras do Câncer Cervical indicam que quando infectadas por HPVs, principalmente os de alto risco, que expressam ativamente as oncoproteínas E6 e E7, as células hospedeiras sofrem alterações relacionadas ao padrão de expressão das proteínas que controlam o ciclo celular, levando ao aumento da proliferação (indicado pela proteína Ki-67), diminuição da apoptose e aumento da expressão de p16<sup>INK4a</sup>.

Com o objetivo de se verificar se eventos celulares semelhantes estariam envolvidos na patogênese do CBCE, no presente estudo será avaliada a expressão das proteínas do ciclo celular p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67 em biópsias de Carcinomas Bucais de Células Escamosas. Realizaremos também uma comparação da expressão dessas proteínas entre amostras infectadas e não infectadas e analisaremos a viabilidade do uso dessas proteínas como biomarcadores para os dois tipos distintos de lesão

---

Palavras-chave (8 palavras, no máximo):

## Carcinoma Bucal de Células Escamosas, Patogênese, HPV, Expressão de Proteínas do Ciclo Celular

---

Data prevista para o início do projeto:

Agosto de 2009

Data prevista para o encerramento:

Agosto de 2013

Declaração de apoio institucional

Eu confirmo ter lido este protocolo e, se a proposta for financiada, o trabalho será realizado e administrado pelo Departamento/Instituição, de acordo com as condições gerais do edital e das normas do Conselho Nacional de Saúde. Eu também confirmo que o Pesquisador Principal é funcionário desta instituição.

Nome: Data:

Cargo:

## II. Descrição da Pesquisa

IV.1. Objetivos da pesquisa / Hipóteses a testar

IV.2. Antecedentes científicos, relevância e justificativa da pesquisa (explicitando as referências bibliográficas)

IV.3. Descrição detalhada e ordenada do projeto de pesquisa (material e métodos, casuística)

IV.4. Plano de coleta e análise dos dados

IV.5. Análise crítica dos possíveis riscos e benefícios

IV.6. Plano de divulgação dos resultados

IV.7. Explicitação dos critérios para interromper ou suspender a pesquisa

---

IV.1. - Este estudo tem por objetivo, avaliar a expressão de proteínas do ciclo celular (p16<sup>ink4a</sup> e ki-67) em lesões de carcinoma bucal de células escamosas e a viabilidade de seu uso como biomarcador de lesões infectadas ou não pelo vírus do papiloma humano.

IV.2. - Entre as neoplasias bucais, o Carcinoma Bucal de Células Escamosas (CBCE) é a mais comum, representando cerca de 90% dos casos (Jefferies *et al.*, 2001). Esse carcinoma caracteriza-se clinicamente por presença de lesão com apresentação variada incluindo as formas nodular, exofítica (formadora de massa), endofítica (com ulceração), leucoplásica (com presença de placa branca) ou eritroplásica (com presença de placa vermelha) (Neville *et al.*, 2004).

Embora alguns fatores de risco como o consumo de álcool e o tabagismo possam estar envolvidos no desenvolvimento do CBCE, outros fatores como a infecção por alguns subtipos de Vírus do Papiloma Humano (HPV), a exposição à radiação UV e a susceptibilidade genética também podem estar relacionados ao processo carcinogênico (Zang *et al.*, 2004).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, estima-se para 2008 na população brasileira, o surgimento de cerca de 14.160 novos casos de câncer de boca, sendo que deverá haver maior incidência relacionada a homens (10.380 casos) em comparação àquela que deverá ser apresentada por mulheres (3.780 casos).

A transição de uma mucosa normal para um CBCE é um processo lento, complexo e que envolve múltiplos passos (Küffer *et al.*, 2002; Neville *et al.*, 2004). Muitos trabalhos apontam que possivelmente não exista um único fator isolado associado ao CBCE, de forma que efeitos genéticos e ambientais parecem estar implicados no desenvolvimento desta neoplasia.

Como sugerido, a infecção persistente pelo vírus do Papiloma Humano (HPV) pode ser citada como um dos fatores de risco mais relevantes (Scully *et al.*, 2000; Neville *et al.*, 2004; Syrjänen 2005).

Acredita-se que a infecção por certos tipos de HPV oncogênicos seria relevante para o aparecimento de uma lesão precursora, enquanto que o desenvolvimento dessa lesão dependerá de co-fatores que deveriam desencadear anomalias no controle de eventos celulares e do sistema imune.

Alguns trabalhos já demonstraram a presença do HPV em lesões de CBCE (Scully, 2002; Kojima *et al.*, 2002; Dahlstrom *et al.*, 2003 e Herrero *et al.*, 2003). As evidências da associação de HPVs de alto risco com lesões neoplásicas bucais existem, porém se comparada à associação observada em lesões da cérvix uterina (>99,7%) (Doorbar, 2005), essa proporção é menor e varia de 10 a 61,5%. O tipo de vírus mais comumente encontrado nessas lesões é o HPV16 seguido pelo HPV18 (Snidjers *et al.*, 1994; Campisi *et al.*, 2002; Kreimer *et al.*, 2005; Syrjänen, 2005; Doorbar, 2005).

A proteína p16 (p16<sup>INK4a</sup>), um produto do gene CdkN2A, é uma proteína supressora de tumor que inibe quinases dependentes de ciclina (cdk) prevenindo a fosforilação de pRb, e apresentando, conseqüentemente, um importante papel na regulação do ciclo celular em mamíferos (Cairns *et al.*, 1995). A proteína p16 normalmente atua como um regulador de proliferação celular, mas sua ação inibitória não é efetiva no contexto da proliferação de células infectadas pelo HPV. Nesse contexto, a disfunção da proteína pRb através da infecção por HPVs de alto risco pode resultar na progressão anormal do ciclo celular ou na superexpressão de p16<sup>INK4a</sup> (Andersson *et al.*, 2006; Ishikawa *et al.*, 2006).

Alterações na expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup> têm sido descritas em muitos tipos de câncer devido à mutações, às deleções homozigóticas, ou aos eventos de hipermetilação de genes. Evidências de elevados níveis de p16<sup>INK4a</sup> são observadas em células transformadas pelo HPV e carcinomas bucais (Yuen *et al.*, 2002; Fregonesi *et al.*, 2003).

Estudos recentes têm avaliado o papel de p16<sup>INK4a</sup> como um marcador diagnóstico das lesões precursoras e da própria neoplasia cervical e, a maioria desses trabalhos tem mostrado que um aumento da expressão de p16<sup>INK4a</sup> está intimamente associado com a progressão da doença (Andersson *et al.*, 2006; Queiroz *et al.*, 2006; Masumoto *et al.*, 2006; Samama *et al.*, 2006). Um estudo realizado por Cunningham *et al.*, 2006, demonstrou que essa proteína também poderia ser utilizada como marcador de progressão para as lesões cancerosas bucais associadas ao HPV.

O antígeno Ki-67 é expresso durante todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M) de células em proliferação, mas está ausente em células quiescentes. Muitos estudos relatam que Ki-67 é um relevante marcador prognóstico no estudo de tumores humanos, e em relação à patogênese do câncer cervical, a expressão de Ki-67 em esfregaços cervicais ou em tecidos obtidos por biópsias, tem sido sugerida como um marcador alternativo específico de progressão. A imunopositividade para Ki-67 parece refletir a relação entre ação proliferativa, grau da NIC e expressão do HPV (Andersson *et al.*, 2006; Queiroz *et al.*, 2006; Teresa *et al.*, 2007).

## **JUSTIFICATIVA**

É sabido que os HPVs de alto risco estão intimamente relacionados aos carcinomas cervicais e bucais.

Estudos principalmente desenvolvidos acerca da patogênese do câncer cervical, apontam que no processo de carcinogênese mediado por HPVs de alto risco, as proteínas E6 e E7 interagem com as proteínas p53 e pRb, aumentando assim a proliferação celular e diminuindo os níveis de apoptose. A interação de E7 com a proteína pRb também ocasiona a liberação de E2F e conseqüentemente contribui para o aumento da proteína p16<sup>INK4a</sup> na célula.

Ki-67 tem sido sugerido como um relevante marcador de proliferação celular no estudo de tumores humanos, onde sua expressão parece refletir a relação entre a ação proliferativa e a expressão do vírus do papiloma humano.

Entretanto, poucos estudos têm sido desenvolvidos acerca da expressão dessas duas proteínas em CBCE.

O propósito do presente estudo é avaliar se, em amostras de Carcinoma Bucal de Células Escamosas, há aumento da expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup>, se esse aumento estaria relacionado à expressão das oncoproteínas do HPV e se há diferença quanto a expressão em amostras positivas e negativas para o HPV.

Será avaliado ainda, em amostras de Carcinoma Bucal de Células Escamosas, se a proteína Ki-67 também sofre aumento de expressão quando relacionada às oncoproteínas virais e se há diferença na expressão desse marcador em lesões positivas e negativas para o HPV.

IV.3. - O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação e aprovação, primeiramente ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular ao qual o aluno está matriculado, à Câmara do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e, será posteriormente analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG), obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS nº 196/96 e 304/00 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

## **METODOLOGIA:**

### **PACIENTES**

Serão avaliadas nesse trabalho 80 amostras de Carcinoma Bucal de Células Escamosas incluídas em parafina provenientes de biópsias realizadas na Clínica de Patologia e

Semiologia Odontológicas II, do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras foram coletadas durante a biópsia incisiva, para obtenção de material da lesão para a realização do exame histopatológico para confirmação do diagnóstico. Tais amostras que correspondem à blocos de parafina) estão armazenadas no Banco de Amostras Patológicas do referido Departamento.

Como critérios de elegibilidade para inclusão de casos no estudo serão analisados os blocos provenientes de pacientes com diagnóstico clínico / histopatológico de carcinoma de células escamosas da cavidade bucal, de ambos os sexos, de qualquer idade, sem distinção do grupo social, que tiveram ou ainda tenham hábito(s) tabagistas e/ou etilistas.

### **CONFECÇÃO DOS CORTES E EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS**

Para a realização da extração do DNA, será necessária a obtenção de cortes em micrótomo que serão usados em etapas posteriores. Os cortes em micrótomo serão realizados no Laboratório de Experimentação do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular. Nesta etapa, as amostras parafinadas serão cortadas em micrótomo (MICROM, HM 335E) sendo obtidos 2 fragmentos pequenos, com cerca de 10µm e transferidas, com o auxílio de um palito estéril, para um tubo de 1,5mL (Eppendorf). No intervalo de cada bloco, o micrótomo será limpo cuidadosamente com xilol e a lâmina será também limpa cuidadosamente com xilol, etanol, solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, nesta ordem, para prevenir a contaminação cruzada (Greer *et al.*, 1991; Wright, 1990; Shimizu, 1995; Burns, 1995). Para a extração do DNA das amostras parafinadas será utilizado o protocolo de extração descritos por Wright, 1990 (modificado). As amostras serão, então, submetidas às etapas seguintes descritas a seguir: para remoção da parafina, por 2 vezes, os cortes serão imersos em 1 mL xilol, centrifugados e o sobrenadante desprezado. Em seguida os cortes serão lavados, por 2 vezes, com álcool etílico absoluto para remoção da mistura xilol + parafina residual, com consecutiva centrifugação e desprezo do sobrenadante (SND). Será realizada a secagem do tecido precipitado cobrindo-se os tubos com Parafilm (American N.C). Por último será realizada a lise do tecido, a 37°C overnight, contendo: 450µL solução de digestão contendo 50mM de Tris-HCl (pH 8,5) (Promega), 1mM de EDTA (Gibco), 0,5% de Tween 20 (Invitrogen) e 200µg/mL proteinase K (SIGMA). Em seguida os tubos serão centrifugados e o sobrenadante (lisado) transferido para outro tubo para ser utilizado nas reações de PCR (FIG. 1) (Protocolo modificado de Wright, 1990).

O paciente e/ou responsável serão esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e será solicitada a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido de todos os pacientes para a participação da pesquisa (Anexo A). O paciente só participará da pesquisa após leitura e assinatura, de livre e espontânea vontade, desse documento.

## **AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE DE $\beta$ -GLOBINA HUMANO**

Para verificação da integridade do DNA extraído de cada amostra, será utilizada a amplificação por PCR com os primers GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') e PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3') e com os primers PC03 (5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3') e PC04 do gene de  $\beta$ -globina Humano, capazes de amplificar um fragmento de 268 e 110 pb, respectivamente, do gene em questão. (Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1986). As reações de PCR serão realizadas no Termociclador MJR PTC-100. Como controle positivo da amplificação do gene de  $\beta$ -globina Humano, serão utilizadas amostras de DNA extraídas de sangue, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Genética Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia. Como controle negativo da reação de PCR, será utilizado o branco do MIX da reação, que consiste em uma mistura de todos componentes da reação (dNTP's, íon magnésio, primers e *Taq* DNA polimerase) sem adição de qualquer amostra de DNA.

## **PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**

Para verificação da prevalência da infecção por HPV nas amostras de CBCE será utilizado como base a avaliação os resultados obtidos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Para determinação da prevalência geral do HPV nas amostras em análise, estas serão submetidas à PCR com os primers genéricos para HPV's – MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') e MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'). Esses iniciadores são capazes de amplificar um fragmento de 450 pb do gene de L1 localizado na região tardia do genoma de diversos tipos de HPV (Manos *et al.*, 1989). Como controle positivo da reação de PCR para HPV será utilizado o DNA extraído de células HeLa, que possuem o DNA do HPV 18 integrado ao seu genoma. Como controle negativo da reação de PCR, será utilizado o branco do MIX.

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade da reação de PCR assim como a chance de detecção do DNA do HPV nas amostras sob análise, será utilizada a técnica de Nested-PCR na qual serão utilizados os primers genéricos MY09 e MY11 numa primeira reação de PCR (reação descrita anteriormente) e os primers GP5 (5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC C- 3') e GP6+ (5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C- 3'), internos ao fragmento amplificado na primeira reação, numa segunda reação de PCR (de Roda Husman, 1995; Husnjak *et al.*, 2000; Zehbe *et al.*, 1996; Fuessel Haws, 2004). Como controle positivo da reação de PCR para HPV será utilizado o DNA pré-amplificado com os primers MY09 e MY11, de células HeLa. Como controle negativo da reação de PCR, será utilizado o branco do MIX da reação.

## ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E COLORAÇÃO PELA PRATA

Os produtos da PCR serão verificados através da eletroforese em gel de poliacrilamida (Maniatis *et al.*, 1982). Serão aplicados 3µl de cada produto juntamente com 1µl de gel loading buffer (GLB) no gel a 6,5%. A corrida será realizada em tampão TBE 1x, a 160V, durante aproximadamente 30 minutos, utilizando-se cuba específica (mini vertical gel electrophoresis unit, Sigma). Posteriormente, cada gel será corado pela prata para verificação e análise do material amplificado, seguindo-se uma adaptação do método descrito por Bassam *et al.* (1991), que consiste na imersão de cada gel em uma série de soluções específicas, numa ordem definida. Após o término do processo, os géis serão secos em papel celofane.

As amostras que apresentarem amplificação positiva para o DNA do HPV, farão parte do grupo de amostras positivas à infecção pelo HPV, enquanto que as amostras que apresentarem amplificação negativa, serão consideradas negativas à infecção pelo HPV.

## IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

A expressão das proteínas do ciclo celular (p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67) será analisada por meio da técnica de Imunofluorescência Indireta, utilizando um protocolo adaptado àquele desenvolvido no Laboratório do Prof. Gregory Thomas Kitten, do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para análise da expressão das proteínas do ciclo celular (p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67) serão utilizados os seguintes anticorpos seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante: Anticorpos Primários Anti – P16 Human; Clone AB6 e Anti – Ki67; Anticorpos Secundários Anticorpo Anti – Mouse e Anti – Rabbit. A marcação dos núcleos será feita com Iodeto de Propídeo. Os cortes de tecidos serão desparafinizados em 3 banhos com xilol por 20 minutos e reidratados através de uma série graduada de etanol (100-70%). Os cortes posteriormente passarão por uma etapa de bloqueio com PBS (Phosphate-Bufferes Saline), BSA (Bovine Serum Albumine) e Tween 20-0,1% durante 60 minutos à temperatura ambiente. Os cortes serão então incubados “overnight” a 4°C com o anticorpo primário. Após a lavagem em PBS, os cortes serão incubados por 60 minutos com o anticorpo secundário em temperatura ambiente. Realiza-se novamente a lavagem das lâminas em PBS e finalmente a montagem das lâminas em solução de glicerina 90%/TRIS 1M 10% pH 9,0. Os resultados serão analisados através de Microscopia Confocal (Zeiss LSM 510 Meta) utilizando-se os programas Carl Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510 (versão 3.2) e Jasc Paint Shop Pro (versão 7.01).

IV.4. - Já relatado no item II.3.

II.5. O presente projeto não levará a riscos para os participantes do trabalho, visto que o material a ser utilizado consistirá de material arquivado, ou seja, tecido incluído em blocos de parafina previamente obtidos durante a biópsia, necessária para a aquisição de

material do tumor para o exame histopatológico, importante para o estabelecimento do diagnóstico. Quanto aos benefícios, este trabalho poderá contribuir para o melhor entendimento quanto ao mecanismo de carcinogênese do carcinoma de células escamosas da cavidade bucal e posteriormente desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para esta lesão.

II.6. Os resultados serão divulgados, à medida que forem sendo obtidos, em Congressos Nacionais e Internacionais, bem como em artigos científicos publicados em revistas internacionais.

II.7. A pesquisa poderá ser suspensa temporariamente na eventualidade de algum equipamento necessitar de reparos ou na falta de algum tipo de material de consumo.

Utilize, no máximo, 5 páginas, numerando-as 3a.,3b. etc

---

IV.8. Local da pesquisa (detalhar as instalações dos serviços, centros, comunidades e instituições nas quais se processarão as várias etapas da pesquisa; Demonstrativo da existência de infraestrutura necessária ao desenvolvimento da pesquisa e para atender os eventuais problemas dela resultantes):

A coleta das amostras será realizada na Clínica de Patologia e Semiologia Odontológicas II, do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Após as amostras serem coletadas, elas serão processadas no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG. A análise genética e molecular será executada no Laboratório de Biologia das Interações Celulares II, do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, que apresenta toda a estrutura necessária (equipamentos e reagentes) para a realização deste trabalho.

IV.9. Orçamento financeiro detalhado (recursos, fontes e destinação, bem como a forma e o valor da remuneração do pesquisador) - preencher as folhas específicas

O presente Projeto será financiado com recursos do CNPq (Bolsa de Mestrado do aluno) e Verba PROF - CAPES.

IV.10. Explicação de existência ou não de acordo preexistente quanto à propriedade das informações geradas (demonstrando a inexistência de qualquer cláusula restritiva quanto à divulgação pública dos resultados, a menos que se trate de caso de obtenção de patenteamento; neste caso, os resultados devem se tornar públicos tão logo se encerre a etapa de patenteamento).

Se houver acordo ou contrato, incluí-lo.

Declaro que, o presente projeto de pesquisa não apresenta nenhum tipo de acordo que possa restringir a publicação dos resultados que serão obtidos.

---

Profa. Annamaria Ravara Vago (Orientadora) Francisco B. Arreguy de Oliveira  
(Pesquisador)

IV.12. Declaração que os resultados da pesquisa serão tornados públicos, sejam eles favoráveis ou não.

Declaro que, os resultados desta pesquisa, sendo favoráveis ou não à expectativa dos pesquisadores, serão tornados públicos, nas formas de divulgação próprias em pesquisa.

---

Profa. Annamaria Ravara Vago (Orientadora) Francisco B. Arreguy de Oliveira  
(Pesquisador)

Declaro que as amostras coletadas servirão única e exclusivamente para esta pesquisa, excetuando-se o uso em consultas individuais, sendo que a sua divulgação poderá identificar grupos populacionais, sendo preservada a identificação individual.

---

Profa. Annamaria Ravara Vago (Orientadora) Francisco B. Arreguy de Oliveira  
(Pesquisador)

IV.13. Declaração sobre o uso e destinação do material e/ou dados coletados

Declaro que as amostras coletadas servirão única e exclusivamente para esta pesquisa, excetuando-se o uso em consultas individuais, sendo que a sua divulgação poderá identificar grupos populacionais, sendo preservada a identificação individual.

---

Profa. Annamaria Ravara Vago (Orientadora) Francisco B. Arreguy de Oliveira  
(Pesquisador)

## II. Informações relativas aos sujeitos da pesquisa

V.1. Descrição das características da população a estudar (tamanho, faixa etária, sexo, cor (classificação do IBGE), estado geral de saúde, classes e grupos sociais, etc. Caso se trate de pesquisa em grupos vulneráveis, justificar as razões para o envolvimento destes grupos).

As amostras (blocos de parafina) analisadas no presente estudo serão provenientes de pacientes com carcinoma de células escamosas na cavidade bucal, que foram atendidos na clínica de Semiologia e Patologia Bucal do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, durante os últimos 5 anos (2005-2009). Como critérios de elegibilidade para inclusão de casos no estudo, serão analisadas amostras de pacientes com diagnóstico clínico/histopatológico de carcinoma de células escamosas da cavidade bucal, de ambos os sexos, de qualquer idade, sem distinção do grupo social, que tiveram ou ainda tenham hábito(s) tabagistas e/ou etilistas, serão incluídos neste estudo.

#### V.2. Descrição dos métodos que possam afetar diretamente os sujeitos da pesquisa

A maior parte desse estudo será de caráter retrospectivo, a partir da análise de material arquivado. As amostras serão coletadas durante a biópsia incisional, onde é coletado o material para a realização do exame histopatológico de rotina, necessário para a confirmação do diagnóstico.

Porém para a utilização de amostras que ainda serão coletadas, o paciente terá conhecimento da utilização do material a ser coletado para fins de pesquisa assim como do objetivo do estudo a partir da leitura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A).

V.3. Identificação das fontes de material para a pesquisa (tais como espécimens, registros e dados a serem obtidos de seres humanos), com indicações se esse material será usado especificamente para os propósitos da pesquisa ou se será usado para outros fins

Uma amostra do tumor será coletada durante a biópsia da lesão. O material será usado única e exclusivamente para o desenvolvimento do projeto, não sendo o paciente em hipótese alguma identificado pelo nome.

#### V.4. Descrição do plano de recrutamento de indivíduos e os procedimentos a serem seguidos

A maior parte desse estudo será de caráter retrospectivo, a partir da análise de material arquivado. Porém para a utilização de amostras que ainda serão coletadas, os pacientes serão recrutados na clínica de Semiologia e Patologia da Faculdade de odontologia da UFMG, por ordem de chegada. Os pacientes serão então perguntados sobre a possibilidade de seu ingresso no trabalho, mediante a apresentação de um termo de consentimento de livre e esclarecido, onde todas as dúvidas do candidato serão esclarecidas.

V.5. Anexar o formulário de consentimento livre e esclarecido (de acordo com o item IV da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde), específico para a pesquisa, para a apresentação do Comitê de Ética em Pesquisa, com informações sobre as circunstâncias nas quais o consentimento será obtido, quem irá tratar de obtê-lo e a natureza das informações a serem fornecidas aos sujeitos da pesquisa.

#### Anexo A

#### V.6. Descrição de quaisquer riscos, com avaliação de sua possibilidade e gravidade

O presente trabalho não oferece risco algum para os pacientes voluntários.

V.7. Descrição das medidas para proteção ou minimização de quaisquer riscos eventuais (quando apropriado, descrever as medidas para assegurar os necessários cuidados à saúde, no caso de danos aos indivíduos; e os procedimentos para monitoramento de coleta de dados para prover a segurança dos indivíduos, incluindo as medidas de proteção a confidencialidade das informações obtidas)

Não se aplica

V.8. Explicitar se há previsão de ressarcimento de gastos (quais) aos sujeitos da pesquisa (a importância referente não poderá ser de tal monta que possa interferir na decisão do indivíduo ou responsável de participar ou não da pesquisa)

Não se aplica

## Termo de Compromisso

Termo de Compromisso do pesquisador responsável em cumprir os termos da Resolução 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde (Escrever o termo, sendo assinado por todos os pesquisadores envolvidos na pesquisa).

Declaro que conheço e cumprirei, nesta pesquisa, os termos da Resolução 196, CNS, bem como me responsabilizo por atos e atitudes relativas a esta resolução, por parte dos outros pesquisadores.

---

Profª. Annamaria Ravara Vago (Orientadora) Francisco B. Arreguy de Oliveira  
(Pesquisador)

## II. Qualificação dos Pesquisadores

*Curriculum vitae* simplificado (modelo Lattes) do pesquisador responsável e de cada um dos demais participantes

Todos os pesquisadores envolvidos estão cadastrados na Plataforma Lattes do CNPq.

Profª. Annamaria Ravara Vago (Orientadora)

Francisco B. Arreguy de Oliveira (Aluno de Mestrado / Pesquisador)







**A**

*Ficha nº* \_\_\_\_\_  
**NEXO A**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa “Comparação da Expressão de Proteínas do Ciclo Celular em Lesões de Carcinoma Bucal de Células Escamosas Associadas ou não à Infecção pelo Vírus do Papiloma Humano”. Muitos trabalhos indicam que o cigarro e o álcool são as principais causas do câncer de boca, e que a infecção pelo HPV (Vírus do Papiloma Humano) também poderia contribuir ao desenvolvimento desse tipo de câncer. As proteínas produzidas por esses vírus são capazes de causar alterações celulares que transformam células normais em células tumorais. No presente estudo, pretendemos estudar a associação entre a infecção pelo HPV, a expressão de proteínas do ciclo celular e a patogênese do câncer de boca (denominado de Carcinoma Bucal de Células Escamosas).

Para esse estudo, precisamos utilizar parte do material que será coletado durante o procedimento de biópsia que é necessária para o diagnóstico do tumor. Esse material será fixado em solução adequada (formalina tamponada), incluído em um bloco de parafina do qual serão obtidos cortes para realização do exame histopatológico. Necessitamos da sua autorização para utilizar parte desse material incluído em parafina, após a utilização do mesmo para o exame histopatológico que será realizado no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da UFMG. Informamos que após a utilização do material para fins de pesquisa, o material restante ficará devidamente guardado (armazenado) no referido Laboratório.

Este estudo não é necessário para o diagnóstico, mas é de fundamental importância para a realização desta pesquisa. Além disso, não oferecerá riscos

adicionais à sua saúde. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor essa patologia e isso será muito importante para que num futuro próximo possamos tratá-la melhor.

Mesmo não concordando em participar desta pesquisa, o seu tratamento odontológico será realizado normalmente. Se houver algum problema durante o mesmo, você deve seguir os procedimentos normais da clínica, ou seja, ligar para o profissional que o atender.

### **TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO**

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a utilização do fragmento da lesão que será coletado para realização do exame histopatológico para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

LOCAL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /  
\_\_\_\_\_ .

NOME DO PACIENTE NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PACIENTE ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_  
No. \_\_\_\_\_

Pesquisadores:

**Annamaria Ravara Vago.** Telefone: (31) 3409-2783

**Francisco Bernardo Arreguy de Oliveira.** Telefone: (31) 88131361 / (31) 3375-1361.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (**COEP**).

COEP: Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil, 31270-901

[coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br)

Em caso de dúvida, você pode ligar para o **COEP** através do número (31) 3409-4592

**ORÇAMENTO DETALHADO DO PROJETO**

VALOR TOTAL DO PROJETO: R\$ 38.850,00

DESCRIÇÃO	VALOR UNITÁRIO	Nº	TOTAL
<b>MATERIAL PERMANENTE NACIONAL</b>	<b>R\$</b>		<b>R\$</b>
Termociclador automático para amplificação do DNA com bloco de aquecimento sem gradiente para 96 amostras de 0.2 ml e 77 amostras de 0.5 ml – Modelo: PTC -100; Marca: MJ 96+ Research.	15.000,00	01	15.000,00
Conjunto de 4 Micropipetas de <u>Volume Regulável</u> [P20 (0,2-20µl), P100 (10-100µl), P200 (20-200µl), e P1000 (100-1000µl),]	2.000,00	01	2.000,00
<b>SUBTOTAL</b>			<b>17.000,00</b>
<b>MATERIAL DE CONSUMO NACIONAL</b>			<b>R\$</b>
<b>1) Material de Coleta</b>			
Lâminas e filtro para citologia em meio líquido (Duogene)	3,75	400	1.500,00
<b>SUBTOTAL</b>			<b>1.500,00</b>
<b>2) Material para Reação de PCR e Eletroforese</b>			
<b>Material descartável</b>			
Microtubos eppendorff de 0,5 ml (MCT-050) Marca Axygen (pacote c/ 1000)	150,00	10	1.500,00
Microtubos eppendorff de 0,6 ml (MCT-060) Marca Axygen (pacote c/ 1000)	100,00	10	1.000,00
Ponteiras com filtro (0-20ul)/(TRF-300) Marca Axygen (pacote c/ 1000)	250,00	4	1.000,00
Ponteiras descartáveis (0,5-10ul), (0-100ul) e (100-1000ul)			1.000,00

<b>SUBTOTAL</b>			<b>4.500,00</b>
<b>Reagentes</b>			
Enzima Taq DNA Polimerase (tubo c /2.000 UI)	560,00	4	2.240,00
Desóxiribonucleotídeos Trifosfato, (dNTP's: dATP, dTTP, dGTP, dCTP) 25uMol, Gibco (set c/ 4 dNTP's)	1.300,00	01	1.300,00
Primers (iniciadores) para PCR			2.000,00
Marcador de Peso Molecular (1Kb Ladder) Gibco – BRL / 250ug			600,00
SYBR Green PCR Master (Applied Biosystems)	600,00	01	1.160,00
<b>SUBTOTAL</b>			<b>7.300,00</b>
<b>3) Material para imunocitoquímica e imunohistoquímica</b>			
Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, clone MIB-1; DAKO; Código: M7240-1	2.000,00	01	2.000,00
Anticorpo Anti – E7 / HPV 16 e 18; Clone C1P5	1.200,00	01	1.200,00
Kit Citológico CINtec™ p16 <sup>INK4A</sup> DAKO, n. K5339	1.500,00	01	1.500,00
Kit de revelação para imunohistoquímica – Dako – Envision System	2.000,00	01	2.000,00
<b>SUBTOTAL</b>			<b>6.700,00</b>
<b>TOTAL MATERIAL NACIONAL</b>			<b>37.000,00</b>
<b>(Permanente e Consumo)</b>			
<b>TAXA DE ADMINISTRAÇÃO (5% do valor recomendado)</b>			<b>1.850,00</b>
<b>TOTAL</b>			<b>38.850,00</b>

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersson S, Wangsa D, Flores-Staino C, Safari H, Mints M, Hjerpe A, Hagmar B, Johansson B. Expression of p16<sup>INK4a</sup> in relation to histopathology and viral load of 'high-risk' HPV types in cervical neoplastic lesions. *Eur J Cancer* 2006 ; 42(16):2815-2820.

Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005; 32S:S1-S6.

Brasileiro Filho, G. *Patologia Geral*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Bossis I, Roden RB, Gambhira R, *et al.* Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *J Virol* 2005; 79:6723-6731.

Campisi G, Giovanelli L, Lama A, *et al.* Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *J Infect Dis* 2002; 185:833-836.

Campisi G, Giovanelli L, Calvino F, *et al.* HPV infection in relation to OSCC histological grading and TNM stage. Evaluation by traditional statistics and fuzzy logic model. *Oral Oncology* 2006; 42:638-645.

Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, *et al.* Human papillomavirus: its identikit and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *International Journal of Oncology* 2007; 30:813-823.

Cartwright NH, Sant Cassia LJ, Morris AG. Detection of human papillomavirus in vulval carcinoma using semi-nested PCR and restriction enzyme typing: a rapid and sensitive technique. *J. C. Pathol.* 1996; 49:236-239.

[Cairns P](#), [Polascik TJ](#), [Eby Y](#), [Tokino K](#), [Califano J](#), [Merlo A](#), [Mao L](#), [Herath J](#), [Jenkins R](#), [Westra W](#), *et al.* Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. [Nat Genet.](#) 1995; 11(2):210-2.

Cotran RS, Kumar V, Collins TC. Cabeça e Pescoço. Patologia Estrutural e Funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

Crum CP. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the vírus, the host and the stem cell. *Mod. Pathol.* 2000; 13:243-251.

Culp TD, Christensen ND. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* 2004; 319:152-161.

Cunningham LL, Pagano GM, Li M, *et al.* Overspersion of p16<sup>ink4</sup> is a reliable marker of human papillomavirus-induced oral high-grade squamous dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102:77-81.

Dahlstrom KR, Adler-Storthz K, Etzel CJ, *et al.* Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2620-2626.

Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 2003; 307:1-11.

de Roda Husman AM, *et al.* The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology* 1995; 76:1057-1062.

[Doorbar J](#). The papillomavirus life cycle. [J Clin Virol.](#) 2005; 32 Suppl 1:S7-15.

Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 2006; 110:525-541.

Evander M, Frazer IH, Mei Qi Y, *et al.* Identification of the  $\alpha 6$  integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 1997; 71:2449-2456.

Fregonesi P, Teresa DB, Duarte RA, Neto CB, *et al.* p16<sup>ink4a</sup> immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. *J Histochem Cytochem* 2003; 51:1291-1297.

Fuessel Haws AL, *et al.* Nested pcr with the pgmy09/11 and gp5/6 primer sets improves detection of hpv dna in cervical samples. *Journal of virological methods* 2004; 122:87-93.

Giroglou T, Florin L, Schafer F, *et al.* Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 2001; 75:1565-1570.

Greer *et al.* PCR Amplification from Paraffin-Embedded Tissues. *AJCP* 1991; 95:117-124.

Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, *et al.* Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1772-1783.

Husnjak K, *et al.* Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *Journal of virological methods* 2000; 88:125-134.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Estimativa 2008: incidência de câncer no brasil. Rio de Janeiro: INCA. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 05 ago. 2008.

[Ishikawa M](#), [Fujii T](#), [Saito M](#), [Nindl I](#), [Ono A](#), [Kubushiro K](#), [Tsukazaki K](#), [Mukai M](#), [Nozawa S](#). Overexpression of p16 INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. [Int J Gynecol Cancer](#). 2006; 16(1):347-53.

Jefferies S, Foulkes WD. Genetics mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology* 2001; 37:115-126.

Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, *et al*. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interact with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 1999; 274:5810-5822.

Kojima A, Maeda H, Sugita Y, *et al*. Human papillomavirus type 38 infection in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2002; 38:591-596.

Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14:467-475.

Küffer R, Lombardi T. Premalignant lesions of the oral mucosa: a discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). *Oral Oncology* 2002; 38:125-130.

Manos MM, *et al*. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer cell* 1989; 7:209-214.

[Masumoto N](#), [Fujii T](#), [Ishikawa M](#), [Saito M](#), [Iwata T](#), [Fukuchi T](#), [Susumu N](#), [Mukai M](#), [Kubushiro K](#), [Tsukazaki K](#), [Nozawa S](#). P16 overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. [Hum Pathol](#). 2003; 34(8):778-83.

McMillan NA, Payne E, Frazer IH, Evander M. Expression of the  $\alpha 6$  integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology* 1999; 261:271-279.

Neville *et al.* Patologia Oral e Maxilofacial. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

[Queiroz C](#), [Silva TC](#), [Alves VA](#), [Villa LL](#), [Costa MC](#), [Travassos AG](#), [Filho JB](#), [Studart E](#), [Cheto T](#), [de Freitas LA](#). Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions. [Pathol Res Pract](#). 2006; 202(10):731-7.

Rivoire WA, Capp E, Corleta HVE, Silva ISI. Bases Moleculares da oncogênese cervical. Rev. Bras. Cancerologia 2001; 47:179-184.

Saiki RK, *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230:1350 – 1354.

Saiki RK, *et al.* Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and hla-dq $\alpha$  DNA with allele-specific oligonucleotide probes. Nature 1986; 324:163 – 166.

[Samama B](#), [Lipsker D](#), [Boehm N](#). p16 expression in relation to human papillomavirus in anogenital lesions. [Hum Pathol](#). 2006; 37(5):513-9.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. Oral oncology 2000; 36:311-327.

Scully C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. Oral Oncology 2002; 38:227-234.

Selinka HC, Giroglou T, Sapp M. Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. Virology 2002; 299:279-287.

Shimizu H.; Burns J C. Extraction of nucleic acids: sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: innis, m. A.; gelfand, d. H.; sninsky, j. J. Pcr estrategies. San diego, ca, academic press, inc., 1995, p 32-38.

Snijders PJF, van der Brule AJC, Meijer CJLM, *et al.* Papillomaviruses and cancer of the upper digestive and respiratory tract. *Cur Top Microbiol Immunolol.* 1994; 186:177-198.

Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions* 2007; 35:1456-1460.

Syrjänen S. Human Papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Journal of Clinical Virology* 2005; 32S:S59-S66.

Teresa DB, Neves KA, Neto CB, *et al.* Cumputer-assisted analysis of cell proliferation markers in oral lesions. *Acta Histochem.* 2007; 10:1-11.

Thomison III J, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Human Pathology* 2008; 39:154-166.

Yuen PW, Man M, Lam KY, Kwong YL. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2002; 55:58-60.

[Villa LL](#). Human papillomaviruses and cervical cancer. [Adv Cancer Res.](#) 1997;71:321-41.

Wright D. K.; Manos M. M. Sample Preparation from Paraffin-Embedded Tissues. In: INNIS *et al.* (eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego, CA, Academic Press, Inc., 1990, p 153-158.

Zang Z, Sdek P, Cao W, Chen W. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33:71.

Zehbe I, Wilander E. Two consensus primer systems and nested polymerase chain reaction for human papillomavirus detection in cervical biopsies: a study of sensitivity. *Human pathology* 1996; 27:812-815.