



Universidade Católica de Goiás
PROPE – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Mestrado em Genética

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO CÓDON 72 DO GENE *P53*
EM PACIENTES COM CARCINOMA ESCAMOSO DE BASE DA LÍNGUA**

Francisco Pereira Borges Filho

Goiânia ♦ 2009



Universidade Católica de Goiás
PROPE – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Mestrado em Genética

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO CÓDON 72 DO GENE *TP53*
EM PACIENTES COM CARCINOMA ESCAMOSO DE BASE DA LÍNGUA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Genética da Universidade Católica de Goiás, para a obtenção do Título de Mestre em Genética.

Mestrando: Francisco Pereira Borges Filho, *Esp.*

Co-orientador: Prof. Raimundo Lima da Silva Júnior, *M.Sc.*

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, *Ph. D.*

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Renatta que nunca deixou de acreditar no meu sucesso desde o início da nossa formação acadêmica, me levando a almejar cada vez mais sem nunca me acomodar.

Aos meus pais Francisco Pereira Borges e Zilene Paes Landim Borges, pela oportunidade da vida, pelo amor e sábios conselhos, carinho e motivação nos momentos de difíceis;

A toda minha família, em especial a minha irmã Daniela Paes Landim Borges, por me atrair para o meio acadêmico;

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Aparecido D. da Cruz *Ph.D.*, que se mostrou muito mais que um orientador, integrando o hall dos meus amigos

A Prof. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura, pessoa que sempre buscou meu aperfeiçoamento e crescimento intelectual, me orientando quando todos achavam impossível. Agradeço a sua dedicação e interesse por mim devotados nos momentos mais difíceis e críticos desse caminhada;

Ao Prof. Raimundo Lima da Silva Júnior, M.Sc. pela inestimável ajuda na análise estatística e dissertação.

ÍNDICE

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Aspectos Gerais do Câncer.....	10
1.2. Aspectos Epidemiológicos do Câncer de Cavidade Oral.....	11
1.3. Fatores de Risco.....	16
1.4. Polimorfismo Genético.....	18
2. Objetivos.....	24
2.1. Geral.....	24
2.2. Específicos.....	24
3. Materiais e Métodos.....	25
3.1. Delineamento do estudo.....	25
3.2. Grupo amostral.....	25
3.3. Obtenção das amostras.....	26
3.4. Obtenção de DNA das amostras em estudo.....	26
3.5. Genotipagem do polimorfismo do códon 72 de <i>TP53</i> pela reação em cadeia da polimerase (PCR).....	26
3.6 Análise dos produtos de PCR.....	27
3.7 Análise Estatística.....	28
4. Resultados.....	30
5. Discussão.....	37
6. Conclusão.....	43
7. Referências Bibliográficas.....	44
Anexos.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Tabela do TNM para Estadiamento Clínico do Câncer de Cavidade Oral	14
Tabela II: Estadiamento Clínico Baseado no TNM	15
Tabela III: Seqüência dos nucleotídeos iniciadores utilizados na genotipagem do polimorfismo do códon 72, do gene <i>p53</i>	27
Tabela IV: Protocolo de termociclagem para a genotipagem de <i>TP53Arg</i> e <i>TP53Pro</i>	27
Tabela V: Distribuição dos pacientes com CEC de Base da Língua (HAJ), segundo as variáveis sócio-demográficas	30
Tabela VI: Distribuição dos dados sócios demográficos, quanto à idade e sexo, dos pacientes caso e controle	31
Tabela VII: Distribuição das freqüências alélicas entre as populações caso e controle	31
Tabela VIII: Distribuição das freqüências genóticas entre as populações caso e controle	31
Tabela IX: Resultado do teste de <i>Odds Ratio</i> para a variante <i>TP53 códon 72</i> ...	32
Tabela X: Resultado do teste de <i>Odds Ratio</i> para a variante <i>TP53 códon 72</i> , em homens	32
Tabela XI: Resultado do teste de <i>Odds Ratio</i> para a variante <i>TP53 códon 72</i> , em mulheres	32
Tabela XII: Resultado do teste de <i>Odds Ratio</i> para a variante <i>TP53 códon 72</i> , em tabagistas	32
Tabela XIII: Resultado do teste de <i>Odds Ratio</i> para a variante <i>TP53 códon 72</i> , em etilistas	32
Tabela XIV: Resultado do teste de <i>Odds Ratio</i> para a variante <i>TP53 códon 72</i> , em tabagistas e etilistas	33
Tabela XV: Distribuição das freqüências genóticas em relação à idade em intervalos de tempo	33
Tabela XVI: Distribuição das sobrevidas dos pacientes com câncer de base de língua de acordo com o genótipo	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resultado da eletroforese dos produtos de PCR em PAGE 8%	28
Figura 2: Sobrevida relativa geral para o CEC de Base de Língua nos casos analisados	34
Figura 3: Sobrevida relativa por Genótipo para o CEC de Base de Língua nos casos analisados	35
Figura 4: Sobrevida relativa por Estadiamento para o CEC de Base de Língua nos casos analisados	35
Figura 5: Sobrevida relativa por Estilo de Vida para o CEC de Base de Língua nos casos analisados	35
Figura 6: Sobrevida relativa por Sexo para o CEC de Base de Língua nos casos analisados	36
Figura 7: Sobrevida relativa por Etnia para o CEC de Base de Língua nos casos analisados	36
Figura 8: Sobrevida relativa por Faixa Etária para o CEC de Base de Língua nos casos analisados	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
Arg	Arginina
C	Citosina
CEC	Carcinoma de Células Escamosas
CID-0	Classificação Internacional de Doenças em Oncologia
CO	Cavidade Oral
CCO	Câncer de Cavidade Oral
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC	Estadiamento Clínico
G	Guanina
G1	Fase do ciclo celular
HAI	Hospital Araújo Jorge
HGG	Hospital Geral de Goiânia
HPV	Papiloma Vírus Humano
HUGO	Hospital de Urgências de Goiânia
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICV	Índice de Condições de Vida
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NPR	Núcleo de Pesquisas Replicon
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	Proteína p53
<i>p53^P</i>	Alelo Prolina no códon 72
<i>p53^R</i>	Alelo Arginina no códon 72
P	Prolina
R	Arginina
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TNM	Sistema de Estadiamento em Cancer
TP53	Gene supressor tumoral TP53

Resumo

INTRODUÇÃO: O polimorfismo no códon 72, prolina ($p53^P$) ou arginina ($p53^R$) está envolvido na habilidade da p53 em interagir com as proteínas celulares. Vários autores têm demonstrado que a presença do genótipo $p53^{RR}$ confere maior risco de desenvolvimento de tumores. **OBJETIVO:** Avaliar a frequência alélica do polimorfismo genético no códon 72 do gene $p53$ em amostras obtidas de pacientes diagnosticados com Carcinoma Escamoso de Base de Língua atendidos no Hospital Araújo Jorge, da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), entre os anos de 1999 e 2006. Avaliar a predisposição genética do câncer de base da língua relacionada ao polimorfismo de TP53, através da identificação da presença ou não dos alelos $p53^R$ e/ou $p53^P$ nos pacientes com esta patologia. **MATERIAIS E METODOS:** O presente estudo é do tipo caso-controle de caráter retrospectivo, foi realizado no Núcleo de Pesquisas Replicon da Universidade Católica de Goiás em conjunto com o Hospital Araújo Jorge. Foram avaliados 54 pacientes com carcinoma escamoso de base da língua e em 186 indivíduos sem câncer. Estes foram pareados quanto ao sexo, idade e no grupo caso, foram avaliados o estágio clínico e hábitos de etilismo e tabagismo. A genotipagem dos alelos $p53^R$ e $p53^P$ foi determinada por PCR, utilizando-se primers específicos. **RESULTADOS:** As frequências alélicas para $p53^R$ nos casos e controles foram de 75,9% e 74,2%, enquanto que de $p53^P$ foram de 24,1% e 25,8%, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,79$) nas frequências alélicas entre os dois grupos analisados, sugerindo que o polimorfismo do códon 72 de $TP53$ não seja um fator de risco de susceptibilidade ao carcinoma escamoso de base da língua. **CONCLUSÃO:** Não foi observada associação entre a variante $p53^R$ e o desenvolvimento da carcinogênese de CCO de base da língua, segundo o sexo, idade e etnia.

Palavras-Chaves: CEC, $TP53$, Arginina, Prolina e Câncer de Base da Língua.

Abstract

INTRODUCTION: The polymorphism at codon 72, proline ($p53^P$) or arginine ($p53^R$) is involved in the ability of p53 to interact with cellular proteins. Several authors have shown that the presence of genotype $p53^{RR}$ confers greater risk of developing tumors. **OBJETIVE:** To assess the allelic frequency of genetic polymorphism in codon 72 in TP53 gene in samples obtained from patients diagnosed with squamous carcinoma of base of the tongue treated at the Hospital Araújo Jorge and Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG) between 1990 and 2006. Evaluate the genetic predisposition for Base of Tongue Cancer linked of TP53 polimorphism, by identifyin of the presence or absence of the alleles $p53^R$ and/or $p53^P$ alleles in patients with this pathology. **MATERIALS AND METHODS:** This study is a case-control retrospective in nature, was conducted at Núcleo de Pesquisas Replicon of the Universidade Católica de Goiás in conjunction with the Hospital Araújo Jorge. We evaluated 54 patients with squamous carcinoma of the base of the tongue and 186 individuals without cancer. These were matched regarding gender, age, and the group of cases was evaluated clinical stage and smoking, alcohol consumption. The genotypes $p53^R$ and $p53^P$ were determined by PCR, using specific primers. **RESULTS:** The allele frequencies for $p53^R$ in cases and controls were 75.9% and 74.2%, while the $p53^P$ were 24.1% and 25.8% respectively. There was no statistically significant difference ($p = 0.79$) in allele frequencies between the two groups, suggesting that the polymorphism of codon 72 of TP53 is not a risk factor for susceptibility to squamous cell carcinoma of the tongue base. **CONCLUSION:** The study does not find relationship between $p53^R$ and CCO carcinogenesis when compared sex, age and color.

Key words: CEC, TP53, arginine, proline and Base of Tongue Cancer.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais do Câncer

Neoplasia significa literalmente, crescimento novo. O prefixo *neo* é de origem grega e significa novo. O sufixo *plasis* também é de origem grega e significa crescimento. Neste contexto, uma proliferação anormal do tecido, cujas células fogem parcial ou totalmente ao controle do ciclo celular e tendem à autonomia e à perpetuação, com efeitos agressivos sobre o hospedeiro é atualmente a definição mais aceita para o termo neoplasia (COTRAN *et al*, 2000).

As neoplasias podem ser classificadas segundo seu comportamento biológico como benignas ou malignas. As neoplasias benignas apresentam crescimento lento, expansivo, encapsulada, de contornos bem delimitados, sua morfologia é semelhante ao tecido de origem com raras figuras de mitoses e não produzem metástases. Já os tumores malignos apresentam crescimento rápido, infiltrativo, não são encapsulados, tem o contorno pouco delimitado, com morfologia diferente do tecido de origem com varias mitoses, e produzem metástases (LINGEN *et al.*, 2005; COTRAN *et al.*, 2000).

Câncer é o termo comum para as neoplasias malignas. A palavra câncer tem origem no latim, cujo significado é caranguejo. Tem esse nome, pois as células doentes atacam e se infiltram nas células sadias como se fossem os tentáculos de um caranguejo.

A palavra de origem grega, *Metastatis*, significa mudanças de lugar ou transferência. As metástases correspondem a regiões tumorais descontínuas em relação ao sitio primário. A célula neoplásica se desprende do tumor primário deslocando-se para o interstício, onde, pela via hematogênica ou linfática, alcança

um sítio distante, onde forma uma nova colônia do clone neoplásico (LINGEN *et al.*, 2005; COTRAN *et al.*, 2000).

1.2. Aspectos Epidemiológicos do Câncer de Cavidade Oral

O câncer da Cavidade Oral (CO) é considerado um problema de saúde pública. Além da alta prevalência, o tumor é responsável por uma grande incidência de óbitos em todo o mundo, constituindo a sexta causa de morte por câncer (WALKER *et al.*, 2003).

O carcinoma de células escamosas (CEC) é o tipo histológico mais comum, correspondendo a 90% dos casos dos carcinomas que ocorrem na CO, seguido de neoplasias das glândulas salivares menores (carcinoma adenóide cístico, mucoepidermóide, células acinares e adenocarcinoma) e tumores de origem mesenquimal, como os sarcomas (HOGAN *et al.*, 2005; ANTUNES *et al.*, 2003).

Tradicionalmente, os relatórios mundiais dos registros de câncer codificam e incluem os tumores da base da língua, úvula e palato mole como parte da topografia da boca, classificando-os como cânceres de boca ou cavidade oral. As localizações topográficas mais comuns das neoplasias de boca são: a língua (30%), principalmente, bordos laterais entre o terço médio e posterior, seguido de lábios (25%), assoalho da boca (15%), gengivas (10%), mucosa bucal (10%) e palato (10%) [DOBROSSY *et al.*, 2005].

Em todo o mundo, o CCO é considerado uma neoplasia de elevada incidência. No Brasil, a incidência do CCO é considerada uma das mais altas do mundo, estando entre os oito mais comuns que atingem o sexo feminino. O Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimou as taxas brutas para o ano de 2008, sugerindo a ocorrência de cerca de 14.160 novos casos de CCO em todo território nacional. As

taxas brutas por sexo foram estimadas em 10.380 e 3.780 para o sexo masculino e feminino, respectivamente. Para o ano de 2008 no Estado de Goiás, levando-se em consideração as taxas de incidências e mortalidade da série histórica compreendida entre 1998 e 2002, segundo os dados do RCPB-ACCG (incidência) e do Sistema de informação sobre mortalidade (óbitos), o INCA estimou a ocorrência de 110 novos casos de CCO em Goiás (INCA, 2008).

Cerca de 2.000 novos casos de câncer bucal são detectados por ano no Reino Unido e as mortes chegam a 900 casos/ano, assim, sua morbidade e mortalidade são comparáveis aos cânceres de mama, cervicais e melanomas (McCANN *et al.*, 2001).

Estudos epidemiológicos indicam que a incidência do câncer de cabeça e pescoço aumenta com a idade. DOBROSSY *et al.* (2005) demonstraram que na Europa 98% dos pacientes têm mais de 40 anos de idade. O CCO raramente ocorre em pacientes jovens, menos de 6% dos casos ocorrem em indivíduos com idade inferior a 40 anos. Porém, IAMARROM *et al.* (2004) demonstraram que a incidência de CEC de CO em populações jovens com idades inferiores a 40 anos tem aumentado gradualmente em diversos países. Um aumento na incidência foi relatado na Europa Central e Oriental, especialmente, entre jovens do sexo masculino (GANDINI *et al.*, 2008).

A Classificação Internacional de Doença em Oncologia (CID-O) vem sendo usada mundialmente, há vários anos, pelos países membros da Organização Mundial de Saúde (OMS), inclusive o Brasil, para definir as doenças oncológicas. A OMS atribui o uso do CID-O ao aumento de estudos epidemiológicos e sua aplicação na pesquisa oncológica, devido a melhor organização dos dados de

pacientes acometidos pelo câncer (NORONHA & DIAS, 1997. GREENBER MS, WHO-FIC 2006 e WHO-FIC 2009).

A CID-O permite a codificação de todas as neoplasias por topografia, histologia ou morfologia e comportamento biológico, como por exemplo, maligno, benigno, *in situ*, incerto se benigno ou maligno e metastático. Contudo, a CID-O não apresenta códigos para outros tipos de informação, como: estadiamento clínico, extensão da doença, lateralidade, método de diagnóstico e tratamento.

O sistema TNM foi adotado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), em 1950, que assumiu a responsabilidade por esse sistema de estadiamento. A classificação TNM (Tabela I) utiliza informações acerca da extensão do tumor primário (T), da ausência ou presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais (N) e de possíveis metástases à distância (M). Atualmente, o estadiamento TNM é a base para a orientação terapêutica e o prognóstico do câncer de cabeça e pescoço (Noronha & Dias, 1997), conforme, a Tabela II.

Tabela I: Classificação do TNM para Estadiamento Clínico de Câncer de CO.

T	Tumor Primário
TX	O tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Não há evidência de tumor primário.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão.
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão.
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão.
T4a	(Lábio) Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca ou pele da face (queixo ou nariz).
T4a	(Cavidade oral) Tumor que invade estruturas adjacentes: a cortical óssea, músculos profundo-extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face.
T4b	(Lábio e cavidade oral): Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigóides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna.
N	Linfonodos Regionais
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais.
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão.
N2	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão.
N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão.
N2b	Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão.
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão.
N3	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão.
M	Metástase à Distância
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada.
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Metástase à distância.

Fonte: INCA, 2006. www.inca.gov.br

Tabela II: Estadiamento Clínico do CCO baseado no TNM

Estádio	Tumor	Nódulo	Metástase
EC I	T1	N0	M0
EC II	T2	N0	M0
EC III	T3	N0	M0
EC IVa	T 1 a 3	N1	M0
	T4a	N0-1	M0
EC IVb	T1-4	N2	M0
	T4b	N qualquer	M0
EC IVc	T qualquer	N qualquer	M1

FONTE: PATEL SG, SHAH JP. TNM – Staging of Cancers of the Head and Neck: Striving for Uniformity Among Diversity. *CA Cancer J Clin* 2005.

Os principais objetivos do tratamento do câncer são erradicar a doença e aumentar a sobrevida dos pacientes. O ideal é que esse princípio seja acompanhado de preservação, tanto quanto possível da fisiologia do órgão e da estética individual, visando melhor qualidade de vida para o paciente. A cirurgia e/ou a radioterapia são, isoladas ou associadas, os métodos terapêuticos mais frequentemente usados no tratamento do CCO (KOWALSKI *et al.*, 2002).

As cirurgias incluem ressecções do tumor primário com margens tridimensionais de pelo menos 1 cm, associadas ao tratamento do pescoço, com freqüente evolução para esvaziamento cervical nos casos de linfonodos comprometidos. Em casos de tumores com alto risco de metastatização, mas sem metástases clinicamente detectáveis, indica-se o tratamento eletivo do pescoço. Nesses casos, utilizam-se os esvaziamentos cervicais seletivos do tipo supraomoióideo (REID *et al.*, 2000).

A radioterapia pós-operatória é indicada para os casos com margens cirúrgicas exíguas ou comprometidas, linfonodos histologicamente positivos, embolização vascular neoplásica, infiltração perineural (KOWALSKI *et al.*, 2002).

Nas lesões iniciais, a radioterapia oferece o mesmo resultado de controle de doença que a cirurgia, porém, apresenta piores efeitos colaterais com complicações importantes a longo prazo, como a xerostomia, a indução de cáries de irradiação e o desenvolvimento de osteoradionecrose (KOWALSKI *et al.*, 2002. FERLITO *et al.*, 2003).

Para o tratamento dos casos avançados, tumores dos estádios clínicos III e IV de CCO, associa-se a radioterapia convencional à quimioterapia sistêmica. Células resistentes à radioterapia podem se tornar sensíveis a ela se esta for associada à quimioterapia, tendo efeito sinérgico nesses casos (PIGNON *et al.*, 2000).

1.3. Fatores de Risco

Os fatores de risco mais bem relacionados com o processo de carcinogênese da boca são o tabagismo e o etilismo crônicos. Álcool e tabaco apresentam efeitos sinérgicos na iniciação, promoção e progressão tumoral. O início em idade precoce do hábito para estes dois fatores e período prolongado de exposição aos agentes genotóxicos derivados da queima do tabaco e/ou agressão direta da mucosa pelo álcool são relatados como os principais fatores de risco para o CCO (YANG *et al.*, 2008; MISRA *et al.*, 2009).

Um estudo realizado por DIKSHIT *et al.* (2000) demonstrou que a interrupção do hábito de fumar reduz o risco de desenvolvimento do CCO. O risco se aproxima ao daqueles pacientes que nunca fumaram. No entanto, a redução observada no risco relativo devido à cessação do hábito ocorre somente depois de decorrido um período de 10 a 20 anos.

Outro estudo, realizado por JITOMIRSKI *et al* (2000), relatou que ocupações envolvendo o consumo de álcool, como garçons, empregados de cervejarias, e atividades laborais sujeitas a exposição individual a asbesto e produtos de fibra mineral têm sido associadas a um maior risco de desenvolver CCO. Por outro lado, exposições à radiação solar, como por exemplo, atividades ocupacionais na pesca e agricultura, principalmente em pessoas de pele clara, aumentam consideravelmente e particularmente o risco de ocorrência do câncer de lábio.

McCANN *et al* (2001) apontam uma influência direta na higiene bucal e das condições da dentição na gênese da carcinogênese bucal. A escovação diária foi identificada como um fator protetor, já a irritação crônica mecânica (próteses dentárias mal adaptadas, fraturas e ausência de elementos dentários) ou química (uso de soluções de higiene bucal), além da má higiene oral, tem sido relatado como possíveis fatores de risco para o câncer de boca.

Um estudo realizado no Brasil, conduzido por MACIEL *et al.* (2000), observou uma correlação positiva entre mortalidade por câncer de boca e componentes do índice de desenvolvimento humano (IDH) e índice de condições de vida (ICV) nas capitais brasileiras. A associação entre o câncer (em específico de boca e faringe) e condições socioeconômicas é complexa e não definitivamente estabelecida. Além de diferenciais na exposição aos principais fatores de risco (tabaco, álcool), indivíduos em condições de vida com baixo IDH normalmente, possuem um acesso reduzido às informações e ao serviço de saúde, conseqüentemente, retardando o tempo de diagnóstico e a ausência do tratamento.

Atualmente há evidências suficientes de que alguns tipos de vírus, bactérias e parasitas associados a infecções crônicas estão presentes no processo de

desenvolvimento do câncer, como por exemplo, a *Helicobacter pylori* e o câncer gástrico.

O HPV foi relatado, em vários estudos, como o principal agente biológico associado ao desenvolvimento do CCO (SUMMERGILL *et al.*, 1990; BOUDA *et al.*, 2000; INSERRA *et al.*, 2003). Um estudo multicêntrico conduzido, em 1995, pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), a unidade da Organização Mundial da Saúde (OMS) para pesquisa em câncer realizada em 9 países, inclusive o Brasil, indicou o papel etiológico do HPV na gênese, sobretudo, do câncer de orofaringe, amídalas e laringe (IARC, 1995).

1.4. Polimorfismo Genético

As neoplasias são doenças genéticas e as mutações que lhes dão origem podem ser hereditariamente transmitidas pela linhagem germinativa ou adquiridas nos tecidos somáticos. A grande maioria das mutações em câncer é somática, resultantes da interação de fatores genéticos e ambientais e presente apenas nas células tumorais (COTRAN, 2000).

A contribuição genética herdável de uma neoplasia é avaliada em 5 a 10% de todos os cânceres humanos. Portanto, cerca de 90% dos casos de câncer resultam, de forma esporádica, da associação entre os fatores ambientais e de variáveis que definem uma suscetibilidade genética ao desenvolvimento tumoral (YUSPA, 2000). A modulação dos processos de biotransformação baseia-se na codificação e expressão de diversos genes, sendo esse fator a provável causa das maiores fontes de variabilidade interindividual na suscetibilidade aos agentes carcinogênicos (MASSON *et al.*, 2005; SANTIAGO, 2002).

Genes que participam no processo de oncogênese são, principalmente, os que nas células normais estão envolvidos com o controle do ciclo celular, reparação do DNA danificado e apoptose. A proliferação de células normais é regulada por proto-oncogenes e por genes supressores tumorais. Mutações que potencializam as atividades dos proto-oncogenes os convertem em oncogenes, facilitando o crescimento de células tumorais. Inversamente, lesões genéticas que inativam genes supressores liberam as células da repressão imposta por estes genes, permitindo o crescimento irrestrito de células cancerosas (ZEMLENDUSH *et al.*, 2008; HYAMA *et al.*, 2008).

O *TP53* é um gene supressor de tumor e está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) e codifica para uma proteína nuclear de 53.000 Daltons. Este gene é responsável pela síntese de uma fosfoproteína denominada proteína p53, que controla o ciclo celular durante a fase G1, retardando o processo de divisão celular para que o reparo do DNA seja realizado ou impedindo a divisão celular através da indução da apoptose (HYAMA *et al.*, 2008).

As mutações que envolvem o gene *TP53* são eventos genéticos freqüentemente observados em vários tipos de câncer em humanos. Os clones mutados em *TP53* permitem o aumento de uma população celular com maior instabilidade genética. HYAMA *et al.* (2008) descrevem que as mutações que acometem o gene *TP53* são as mais freqüentemente encontradas em cânceres humanos.

A prevalência de mutações do gene *TP53* nos tecidos neoplásicos varia de acordo com o sítio anatômico do tumor. GREENBLAT *et al.* (1994) relataram que as mutações de *TP53* não foram encontradas em tumores de testículos e da hipófise.

Por outro lado, mutações de TP53 ocorrem em mais de 50% dos tumores de pulmão e de cólon.

Além das mutações no gene *TP53*, o polimorfismo da proteína codificada por este gene também é relatado como evento genético associado ao desenvolvimento de câncer (FRANCHI *et al.*, 2006). O polimorfismo localizado no códon 72 do éxon 4 deste gene é identificado como um SNP (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*), ou seja, as variações na seqüência de DNA estão associadas com alterações de apenas uma base nitrogenada, levando a alterações estruturais da proteína p53. O SNP acarreta mudança na seqüência de aminoácidos da proteína p53, resultando na presença de duas variantes para o resíduo 72 na população. Assim, o códon 72 do éxon 4 pode codificar um aminoácido arginina ($p53^R$) ou uma prolina ($p53^P$) (RIBEIRO JR & SAFATLE-RIBEIRO, 2006).

No caso do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53*, tem-se a substituição de uma Citosina (C) por uma Guanina (G) em uma região rica em prolina no domínio de ligação SH3. A transversão é suficiente para modificar o aminoácido determinado pelo códon, sendo que a trinca de nucleotídeos CCC codifica para o resíduo de prolina (P) e CGC para o resíduo de arginina (R). Desta forma, dois alelos *p53* estão naturalmente presentes nas populações humanas, o $p53^P$ e o $p53^R$. Conseqüentemente, SNP de $p53^{72}$ originam os genótipos $p53^{RR}$, $p53^{RP}$ e $p53^{PP}$ nas populações (BUYRU *et al.*, 2003; LANGEROD *et al.*, 2002)

O polimorfismo no códon 72, prolina (P) ou arginina (R) está envolvido na habilidade da p53 em interagir com as proteínas celulares. Tem sido postulado que a proteína p53 contendo o genótipo homozigoto para arginina no códon 72 é mais eficiente na indução da apoptose do que a variante contendo prolina. A $p53^{RR}$ tem uma capacidade maior de se integrar com MDM2 (PIETSCH *et al.* 2006). Vários

autores têm demonstrado que a ocorrência de homozigose para $p53^{RR}$ confere maior risco de desenvolvimento de tumores, como em cânceres de mama (VIEIRA *et al*, 2008), pulmão (BOLDRINI *et al*, 2008), esôfago (HYAMA *et al*, 2008) entre outros.

Em uma meta-análise, na qual foram revisados mais de 50 artigos, de 1998 a 2002, relacionados ao códon 72 e ao câncer cervical relacionado ao HPV, KOUSHIK *et al*. (2004) verificaram que o genótipo $p53^{RR}$ promove um sutil aumento do risco de carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas. Por outro lado, INSERRA *et al*. (2003), em um estudo com 3.371 mulheres de diferentes etnias, não encontraram nenhuma associação entre o genótipo $p53^{RR}$ com o aumento do risco de câncer cervical relacionado ao HPV. No Brasil, esta associação também se mostrou negativa conforme resultados de BRENNA *et al*. (2004).

As controvérsias não cabem somente aos carcinomas cervicais relacionados ao HPV, mas também outros tumores, como por exemplo, os de cólon retal (SCHNEIDER-STOCK *et al*., 2004), do trato urinário (FURIHATA *et al*., 2002), os da próstata (SUZUKI *et al*., 2003), da mama (BUYRU *et al*., 2003; DUNNING *et al*., 1999), os pulmonares (FAN *et al*., 2000) e os de cabeça e pescoço, incluindo os da cavidade oral (SUMMERGILL *et al*., 1990).

SCHNEIDER-STOCK *et al*. (2004) não encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,83$) nas frequências genótípicas dos pacientes com carcinomas de cólon retal e seu grupo controle saudável, não podendo assim associar o polimorfismo como um fator de risco para o desenvolvimento de tumores que acometem este sítio anatômico. No entanto, um estudo feito com 141 pacientes com neoplasias do trato urinário, FURIHATA *et al*. (2002), verificou que o alelo $p53^R$ aparece preferencialmente mutado nestes tumores em relação ao alelo $p53^P$ ($p = 0,02$).

O trabalho de BUYRU *et al.* (2003) mostrou que a homozigose do alelo $p53^R$ aumenta o risco para o desenvolvimento do câncer de mama em três vezes na população turca. Porém, em um trabalho sistemático de revisão sobre o papel do polimorfismo no risco de câncer de mama, DUNNING *et al.* (1999) sugerem que o alelo $p53^P$ está mais associado ao risco deste tumor do que o alelo $p53^R$. Para os tumores de próstata, SUZUKI *et al.* (2003) também verificaram que o genótipo $p53^{PP}$ tem um papel importante na suscetibilidade deste câncer na população japonesa.

A homozigose para $p53^{PP}$ também foi sugerida como fator de suscetibilidade em carcinomas hepáticos ($p = 0,03$) e adenocarcinomas pulmonares ($p = 0,04$) [ZHU *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 2000].

Contrastando com estes estudos, SOURVINOS *et al.* (2001) sugerem que a homozigose para o alelo $p53^{RR}$ confere ao indivíduo portador uma maior predisposição ao desenvolvimento de lesões pré-malignas da laringe. Adicionalmente, este mesmo grupo de pesquisadores não evidenciou o papel do polimorfismo de $p53$ na susceptibilidade individual às infecções por HPV. SUMMERGILL *et al.* (2000) também não encontraram nenhuma associação deste tipo nos tumores de cavidade oral.

A definição do real papel do polimorfismo do códon 72 do gene supressor de tumor $p53$ na susceptibilidade individual ao carcinoma escamoso de base da língua necessita maior elucidação. Neste contexto, justifica-se a realização do presente estudo sobre as possíveis implicações deste SNP no carcinoma escamoso de base da língua.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

- Avaliar a frequência alélica do polimorfismo genético no códon 72 do gene *p53* em amostras obtidas de pacientes diagnosticados com Carcinoma Escamoso de Base de Língua atendidos no Hospital Araújo Jorge, da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), entre os anos de 1999 e 2006.

2.2. ESPECÍFICOS

- Analisar as frequências gênicas e genotípicas dos grupos caso e controle;
- Avaliar a predisposição genética do câncer de base da língua relacionada ao polimorfismo de TP53, através da identificação da presença ou não dos alelos $p53^R$ e/ou $p53^P$ nos pacientes com esta patologia;
- Analisar a sobrevida relativa dos pacientes quanto aos genótipos homocigotos ($p53^{RR}$ e $p53^{PP}$) e heterocigotos ($p53^{RP}$) e as variáveis estudadas;
- Identificar possíveis associações entre os genótipos de *p53* e os fatores de risco sócio-demográficos e estilo de vida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento do estudo

O presente estudo é do tipo caso-controle de caráter retrospectivo, realizado no Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) da Universidade Católica de Goiás em conjunto com o Hospital Araújo Jorge (HAJ). Os casos foram obtidos junto ao Serviço de Cabeça e Pescoço do HAJ e os controles obtidos fora do HAJ, como sendo indivíduos da mesma comunidade, preferencialmente do Hospital de Urgências de Goiânia (HUGO), do Hospital Geral de Goiânia (HGG) e da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia. No HAJ foram selecionados os casos de carcinoma escamoso de base de língua por ocasião do diagnóstico, anteriormente ao início do tratamento. O grupo controle foi utilizado na comparação com os dados analisados e seus pacientes não possuíam nenhum diagnóstico de câncer, apesar de serem portadores de outras patologias. Todos os indivíduos dos grupos controle e caso foram entrevistados com respeito à história individual de exposição a fatores ocupacionais, ambientais e hábitos de vida contendo ainda, informações biométricas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da ACCG (Anexo I).

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos da Associação de Combate ao Câncer em Goiás para estudo em tela.



ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS

Goiânia, 30 de junho de 1998.

Ilma Sra.
Dra. Maria Paula Curado
Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge – ACCG
Nesta

Prezada Sra.,

Encaminhamos a V.Sa. relatório do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Vivos, após análise do projeto **“ESTUDO INTERNACIONAL CORRELACIONANDO VIROSES E CÂNCER DE CAVIDADE ORAL E DE LARINGE”**.

Informamos que o referido projeto foi aprovado em reunião do comitê realizado no dia 30/06/98 após ser apresentado aos membros presente.

Colocamo-nos ao seu inteiro dispor para esclarecimentos necessários.

Cordiais Saudações.


Dr. Geraldo Silva Queiroz
Presidente do Comitê de Ética - ACCG

3.2. Grupo amostral

Foram avaliadas no total 240 amostras de DNA, sendo 54 constituídas de pacientes diagnosticados como carcinoma escamoso de base da língua e 186 amostras de pacientes do grupo controle. Foram considerados casos apenas os indivíduos recém diagnosticados com carcinoma de base da língua, definidos através do Código Internacional de Doenças (CID10: C01), que tenham sido histologicamente confirmados pelo Serviço de Patologia/HAJ. Os casos não foram submetidos a nenhuma terapia primária, nem foram previamente tratados com radio e/ou quimioterapia local ou sistêmica previamente à obtenção das amostras biológicas. Foram excluídos do estudo pacientes do grupo controle com história pregressa de neoplasia e história de câncer de cavidade oral na família.

3.3. Obtenção das amostras

Foram coletados 10mL de sangue periférico heparinizado, colhidos em tubos cônicos de 12 mL com tampa de rosca. Posteriormente essas amostras foram processadas a 5000 r.p.m. x *g* por 15 minutos. Em seguida alíquotas foram armazenadas em criotubos, fracionadas em plasma sanguíneo, anel leucocitário e hemácias. As alíquotas rotuladas foram armazenadas em *freezer* a -20°C, compondo um banco de amostras biológicas.

3.4. Obtenção de DNA das amostras em estudo

A extração, purificação e isolamento de DNA genômico das amostras biológicas foram executadas com uso do kit de extração *Wizard[®] Genomic DNA Purifications Kit* (Promega corporation, EUA), de acordo com o protocolo de extração sugerido pelo fabricante. As amostras extraídas foram rotuladas e armazenadas a -20°C para serem utilizadas posteriormente nas reações de PCR.

3.5. Genotipagem do polimorfismo do códon 72 de *p53* pela PCR.

Todas as amostras foram submetidas a duas reações de PCR com os *primers* para genotipagem dos alelos *p53^R* e *p53^P*, seguindo-se a técnica proposta por SOURVINOS *et al.* (2001). Para controle interno da reação, foi amplificada a região *D8S135*. A seqüência de todos os *primers* e o tamanho esperado de seus *amplicons* encontram-se na Tabela III.

Tabela III. Seqüência dos nucleotídeos iniciadores utilizados na genotipagem do polimorfismo do códon 72, do gene *p53*.

Primer*	Sequencia (5' → 3')	Produto Amplificado
p53+F/ArgR	TCC CCC TTG CCG TCC CAA CTG GTG CAG GGG CCA CGC	141
p53Pro+/p53R	GCC AGA GGC TGC TCC CCC CGT GCA AGT CAC AGA CTT	177
D8S135	GGG AGG CTT TAT AAT TAT TTA GC CTG GGC AAC AGA GTG GGA C	92

* Invitrogen Brasil[®].

As condições de PCR para um volume final de 25µL de reação foram: 25 qsp de água Mili-Q, 0.3nmol de *primer* alelo-específico (Invitrogen[®]), 1U de *Taq DNA polimerase* (Promega[®]), 1X de STR[®] *buffer* (Promega[®]) (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 0,2mM dNTPs e 0,5mM de MgCl₂) e ~100ng de DNA genômico total. Para a amplificação dos fragmentos de 141pb (*p53^R*) e de 177pb (*p53^P*) do códon 72 do gene *p53* foi utilizado o protocolo de termociclagem descrito na Tabela IV.

Tabela IV. Protocolo de termociclagem para a genotipagem de *p53^R* e *p53^P*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Ciclos
Desnaturação inicial	94	5	1
Desnaturação	94	30s	
Amplificação	55	45s	35
Extensão	72	1	
Extensão final	72	7	1
Armazenamento	4	∞	∞

3.6 Análise dos produtos de PCR

Os produtos das PCRs foram separados em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8% (PAGE 8%) em TBE 1X mediante aplicação de um campo elétrico constante de 10V/cm por 2 horas. Como marcador de peso molecular, foi utilizada uma escada alélica de 50pb (0,025µg/µL) aplicada nas canaletas iniciais do gel. Para a visualização do DNA amplificado, o gel foi submerso em TBE 1X contendo 5µL/mL de brometo de etídeo (EtBr) por aproximadamente 15 minutos e em seguida as imagens foram capturadas em sistema de vídeo-documentação ImageMasterVDS® (Amersham Pharmacia Biotech, EUA).

A interpretação da eletroforese foi feita da seguinte forma: a presença de uma única banda de 177pb caracteriza um indivíduo homozigoto para $p53^P$; a presença de uma banda de 144pb caracteriza um indivíduo homozigoto para $p53^R$ (A1, A2, A4, A5, A6 e C2+). Duas bandas, uma de 177pb e outra de 144pb caracteriza um indivíduo heterozigoto $p53^{RP}$ (A3 e C1+) [Figura 1].

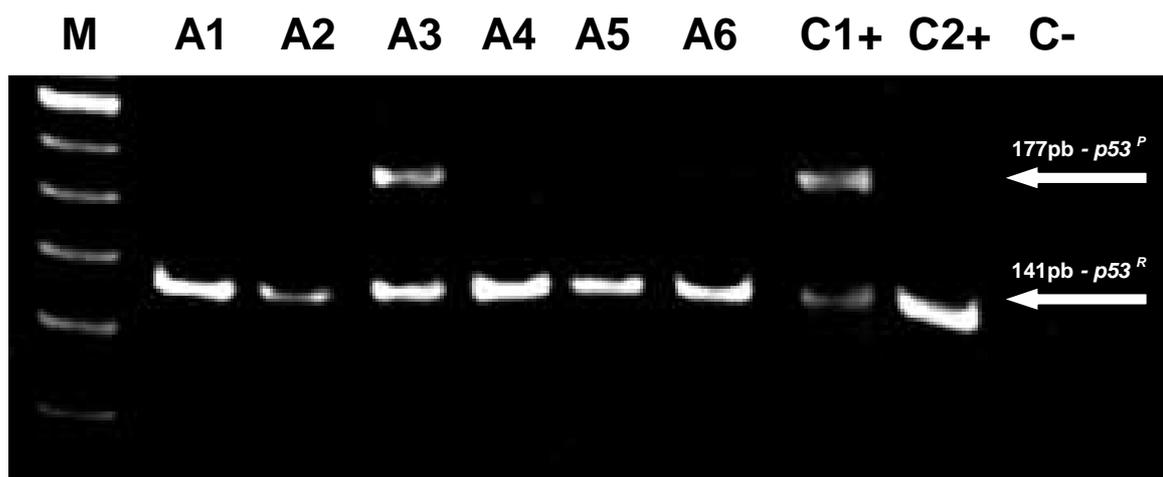


Figura 1. Resultado da eletroforese dos produtos de PCR em PAGE 8%, após migração em campos elétricos constantes de 10V/cm por 2 horas.

3.7 Análise Estatística

Os dados da genotipagem, dos casos e controles, foram tabulados em planilhas do *software* Microsoft Excel[®] (versão 2007). A avaliação das freqüências alélicas e genotípicas das populações casos e controle, o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e a sua diferenciação gênica e genotípica foi testado com o auxílio do *software* BioEstat[®] (versão 5.0). O teste do χ^2 de homogeneidade foi utilizado na comparação entre os dados sócio-demográficos (idade, sexo, hábitos tabagista e etilista). O teste foi realizado em tabelas de contingência 2x2 e 3x2. Adicionalmente, pode-se avaliar o risco relativo entre o polimorfismo de *TP53* para o códon 72 e o câncer de base da língua pelo teste de *Odds Ratio*, com intervalo de confiança de 95%. Para verificar a associação entre o genótipo e a idade do paciente no diagnóstico da doença, foi utilizado um teste de tendência, com o auxílio do *software* BioEstat[®] 5.0. A sobrevida também foi calculada de acordo com os genótipos dos pacientes, para isso foi utilizado o método da Tábua de Vida Atuarial e posteriormente o teste de *logrank* utilizando o *software* *GrahPad Prism*[®] (Versão 4.0).

O teste de *Logrank* é muito útil na comparação de duas curvas de sobrevida, particularmente, quando a razão das funções de risco dos grupos a serem comparados é aproximadamente constante, ou seja, as populações têm as propriedades de risco proporcionais. A estatística deste teste é dada pela diferença entre o número observado de falhas (óbitos, por exemplo) em cada grupo e uma quantidade que, para muitos propósitos, pode ser vista como o correspondente número esperado de falhas sob a hipótese nula (COLOSIMO, 2001).

4. RESULTADOS

4.1. Descrição das variáveis sócio-demográficas

Um total de 54 pacientes compôs o grupo de casos. Trinta e oito pacientes (70,4%) do sexo masculino e 16 (29,6%) do sexo feminino. Do grupo de casos, vinte e cinco pacientes (46,3%) declararam possuir a cor de pele branca, sete (13%) negra e 22 (40,7%) pardos. A idade dos pacientes com carcinoma escamoso de base da língua variou entre 38 a 83 anos, sendo a média de 60,5 anos.

Do total de pacientes com CEC de base de língua, quarenta e cinco (83,3%) declararam ser etilistas e cinquenta (92,6%) tabagistas, sendo que 41 indivíduos (75,9%) possuíam os dois hábitos combinados. Quanto ao estadiamento, 13 pacientes (24,1%) apresentavam estágio clínico inicial (I e II) e 41 (75,9%) apresentavam estágio clínico avançado (III e IV). Os dados sócio-demográficos encontram-se relacionados na Tabela V.

Tabela V. Distribuição dos pacientes com CEC de Base da Língua, segundo as variáveis sócio-demográficas.

Variável sócio-demográfica	n	%
Idade		
< 60 anos	25	46,3
> 60 anos	29	53,7
Sexo		
Masculino	38	70,4
Feminino	16	29,6
Etnia		
Branco	25	46,3
Pardo	22	40,7
Negro	7	13,0
Tabagismo		
Sim	50	92,6
Não	4	7,4
Etilismo		
Sim	45	83,3
Não	9	16,7
Estádio		
I – II	13	24,1
III – IV	41	75,9
Total	54	100,0

4.2. Distribuição dos pacientes do grupo caso e controle, segundo as variáveis sexo e idade

As freqüências de homens e mulheres para o grupo caso foi de 16/54 (29,6%) do sexo feminino e de 38/54 (70,4%) para o sexo masculino. Os pacientes do grupo controle apresentaram resultados semelhantes: 35/186 (18,8%) de mulheres e 151/186 (81,2%) de homens, não resultando em diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, quanto ao sexo. Diante disso, é possível inferir que os dados quanto ao sexo encontram-se homogêneos ($p = 0,12$).

Por outro lado, os dados segundo a idade, apresentaram heterogeneidade quanto à distribuição da faixa etária nos dois grupos (caso e controle). Dos 54 pacientes do grupo caso, 25 (46,3%) possuem idade inferior aos 60 anos, sendo a maioria restante, 29 (53,7%) com idade acima ou igual a 60 anos. Porém, dos 186

pacientes do grupo controle, a maioria 124 (66,7%) declarou ter menos de 60 anos, sendo apenas 62 (33,3%) com idade superior ou igual a 60 anos ($p = 0,01$). Os dados referentes à distribuição das variáveis sexo e idade nos grupos caso e controle estão apresentados na Tabela VI.

Tabela VI. Distribuição dos dados sócios demográficos, quanto à idade e sexo, dos pacientes caso e controle.

<i>p53</i>	Caso		Controle		χ^2	GL	<i>p</i>
	n (%)		n (%)				
Sexo							
Feminino	16 (29,6)		35 (18,8)		2,31	1	0,12
Masculino	38 (70,4)		151 (81,2)				
Idade (anos)							
< 60	25 (46,3)		124 (66,7)		7,37	1	0,01
≥ 60	29 (53,7)		62 (33,3)				
Total	54 (100,0)		186 (100,0)				

4.3. Análise das freqüências alélicas e genotípicas do gene *p53* dos grupos caso e controle.

As freqüências alélicas observadas para os pacientes do grupo caso foram de 41/54 (75,9%) e 13/54 (24,1%), para os alelos *p53^R* e *p53^P*, respectivamente. Nos controles, a freqüência observada para o alelo *p53^R* foi de 138/186 (74,2%) e 48/186 (25,8%), para o alelo *p53^P*. Os dados referentes à distribuição das freqüências alélicas dos grupos caso e controle são apresentados na Tabela VII. A partir dos dados obtidos não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,79$) entre as freqüências alélicas entre os grupos caso e controle.

Tabela VII. Distribuição das freqüências alélicas do gene *p53* entre as populações caso e controle.

<i>p53</i>	Caso		Controle		χ^2	GL	<i>p</i>
	n	%	N	%			
<i>p53^R</i>	41	75.9	138	74.2	0,66	1	0,79
<i>p53^P</i>	13	24.1	48	25.8			
Total	54	100	186	100			

De acordo com a estimativa de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, observou-se que as populações não se encontram em equilíbrio para os alelos $p53^R$ e $p53^P$ ($X^2 = 14,18$; $GL = 6$; $p = 0,02$). A distribuição das frequências genóticas observadas e esperadas encontra-se na Tabela VIII.

De acordo com os dados obtidos, as frequências genóticas dos grupos caso e controle para o gene $p53$ estão em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. A análise individual e grupal pelo teste do X^2 apontou uma homogeneidade entre as frequências genóticas dos dois grupos (caso e controle) [$p = 0,02$], indicando que os mesmos foram obtidos de populações em desequilíbrio genético.

Tabela VIII. Distribuição das frequências genóticas entre as populações caso e controle.

Genótipo	Casos		Controles		χ^2	GL	p
	Observados	Esperados	Observados	Esperados			
$p53^{RR}$	35	31,0	115	102,3	14,18	6	0,02
$p53^{RP}$	12	19,7	46	71,2			
$p53^{PP}$	7	3,3	25	12,5			
Total	54		186				

4.4. Análise do Risco Relativo entre os genótipos do grupo caso

O teste de *Odds Ratio* foi utilizado na tentativa de atribuir a presença dos genótipos $p53^{RP}$ e $p53^{RR}$ (genótipo considerado de risco) com o risco do desenvolvimento do câncer de base da língua para o genótipo $p53^{PP}$ (genótipo não considerado de risco) [Tabela IV]. Os dados obtidos permitem inferir que não houve nenhuma relação de risco no desenvolvimento da carcinogênese bucal entre os genótipos nos grupos caso e controle.

Tabela IX. Resultado do teste de *Odds Ratio* para a variante *TP53* códon 72.

Genótipo	Casos		Controles		OR	IC 95%	p
	GR	GNR	GR	GNR			
$p53^{RP}$	12	7	46	25	0,93	0,32 – 2,66	0,89
$p53^{RR}$	35	7	115	25	1,08	0,43 – 2,72	0,95
$(p53^{RP} + p53^{PP})$	47	7	161	25	1,04	0,42 – 2,56	0,89

Legenda: GR = genótipo considerado de risco; GNR = genótipo não considerado de risco.

Adicionalmente, foram investigados os riscos relativos atribuídos aos genótipos, analisando as variáveis: sexo, tabagismo e etilismo (Tabela X). De acordo com o teste de *Odds Ratio* não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos considerados de risco ($p53^{RR}$ e $p53^{RP}$) e de não risco ($p53^{PP}$), para as variáveis: sexo (masculino e feminino) e hábitos de vida (tabagista e etilista).

Por outro lado, a avaliação do risco relativo entre pacientes que possuem o hábito tabagista e etilista combinados, e os pacientes que apresentam apenas um dos hábitos, segundo o genótipo de risco ($p53^{RR}$), apresentou diferença estatisticamente significativa. Pacientes que apresentam as duas cópias do alelo $p53^R$ ($p = 0,001$) apresentaram um risco de 21 vezes, quando comparado ao genótipo $p53^{PP}$, e de nove vezes com pacientes com apenas uma cópia do alelo ($p = 0,01$).

Tabela X. Resultado do teste de *Odds Ratio* para a variante *TP53* códon 72, em homens, mulheres, tabagistas e etilistas.

Variável	Genótipos	OR	IC 95%	p
Masculino	$p53^{RR}$ x $p53^{RP}$	2,06	0,52 – 8,16	0,49
	$p53^{RR}$ x $p53^{PP}$	1,15	0,18 – 7,03	0,75
	$p53^{RP}$ x $p53^{PP}$	0,56	Nd	0,93
Feminino	$p53^{RR}$ x $p53^{RP}$	0,48	0,08 – 1,07	0,49
	$p53^{RR}$ x $p53^{PP}$	0,86	0,14 – 5,26	0,75
	$p53^{RP}$ x $p53^{PP}$	1,78	Nd	0,93
Tabagistas	$p53^{RR}$ x $p53^{RP}$	0,96	Nd	0,56
	$p53^{RR}$ x $p53^{PP}$	0,00	Nd	1,00
	$p53^{RP}$ x $p53^{PP}$	0,00	Nd	0,77
Etilistas	$p53^{RR}$ x $p53^{RP}$	1,20	0,20 – 7,18	0,78
	$p53^{RR}$ x $p53^{PP}$	2,40	0,36 – 15,94	0,71
	$p53^{RP}$ x $p53^{PP}$	2,00	Nd	0,97
Tabagistas e Etilistas	$p53^{RR}$ x $p53^{RP}$	9,00	2,44 – 33,10	0,001
	$p53^{RR}$ x $p53^{PP}$	21,00	3,35 – 131,52	0,0001
	$p53^{RP}$ x $p53^{PP}$	2,33	0,38 – 14,23	0,61

Nd= não definido.

4.5. Análise da associação entre as freqüências genótípicas e a idade dos pacientes com CCO

A associação entre o genótipo e a idade do paciente no momento do diagnóstico, relacionado ao risco do desenvolvimento do carcinoma de base de língua foi verificada, utilizando o Teste de Tendência. A distribuição das freqüências genótípicas em relação à idade em intervalos de tempo e os respectivos valores de A e p podem ser observados na Tabela XI. De acordo com os dados obtidos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos de $TP53$ e a idade dos pacientes no momento do diagnóstico.

Tabela XI. Distribuição das freqüências genótípicas em relação à idade em intervalos de tempo.

Genótipos	Idade (anos)			A	X ²	p
	0 – 40	41 – 60	> 60			
$p53^{RR}$ x $p53^{RP}$	1	16	16	0,25	0,02	0,88
	1	6	7			
$p53^{RR}$ x $p53^{PP}$	1	16	16	-0,67	0,26	0,60
	0	3	4			
$p53^{RP}$ x $p53^{PP}$	1	6	6	-0,85	0,45	0,49
	0	3	4			

4.6. Análise da sobrevida dos pacientes com CCO

Utilizando-se a Tábua de Vida Atuarial foi possível calcular a sobrevida dos pacientes, ao final de 60 meses, de acordo com os respectivos genótipos. Para os pacientes homozigotos $p53^{RR}$ (n=35), $p53^{PP}$ (n=7) e heterozigotos $p53^{RP}$ (n=12) as sobrevidas foram de 31,4%, 42,3% e 25,0%, respectivamente (Tabela XII). A sobrevida global observada para os pacientes com CEC de base de língua foi de 31,5%, em 5 anos.

Tabela XII. Distribuição das sobrevidas dos pacientes com câncer de base de língua de acordo com o genótipo.

Genótipos	Nº de pacientes	Sobrevida (%)
<i>P53^{RR}</i>	35	31,4
<i>P53^{RP}</i>	12	25,0
<i>P53^{PP}</i>	7	42,3

As sobrevidas dos pacientes de acordo com os genótipos estão apresentadas na Figura 2. Ao aplicar o teste de *Logrank* entre os diferentes genótipos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a sobrevida relativa segundo o genótipo ($X^2 = 1,01$, $p = 0,60$) [B]; estadiamento ($X^2 = 0,37$, $p = 0,54$) [C]; sexo ($X^2 = 0,24$, $p = 0,61$) [E] e idade ($X^2 = 0,11$, $p = 0,73$) [F]. Por outro lado, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes que fumam e bebem, quando comparados aos pacientes que possuíam apenas um dos hábitos ($X^2 = 4,02$, $p = 0,04$) [D].

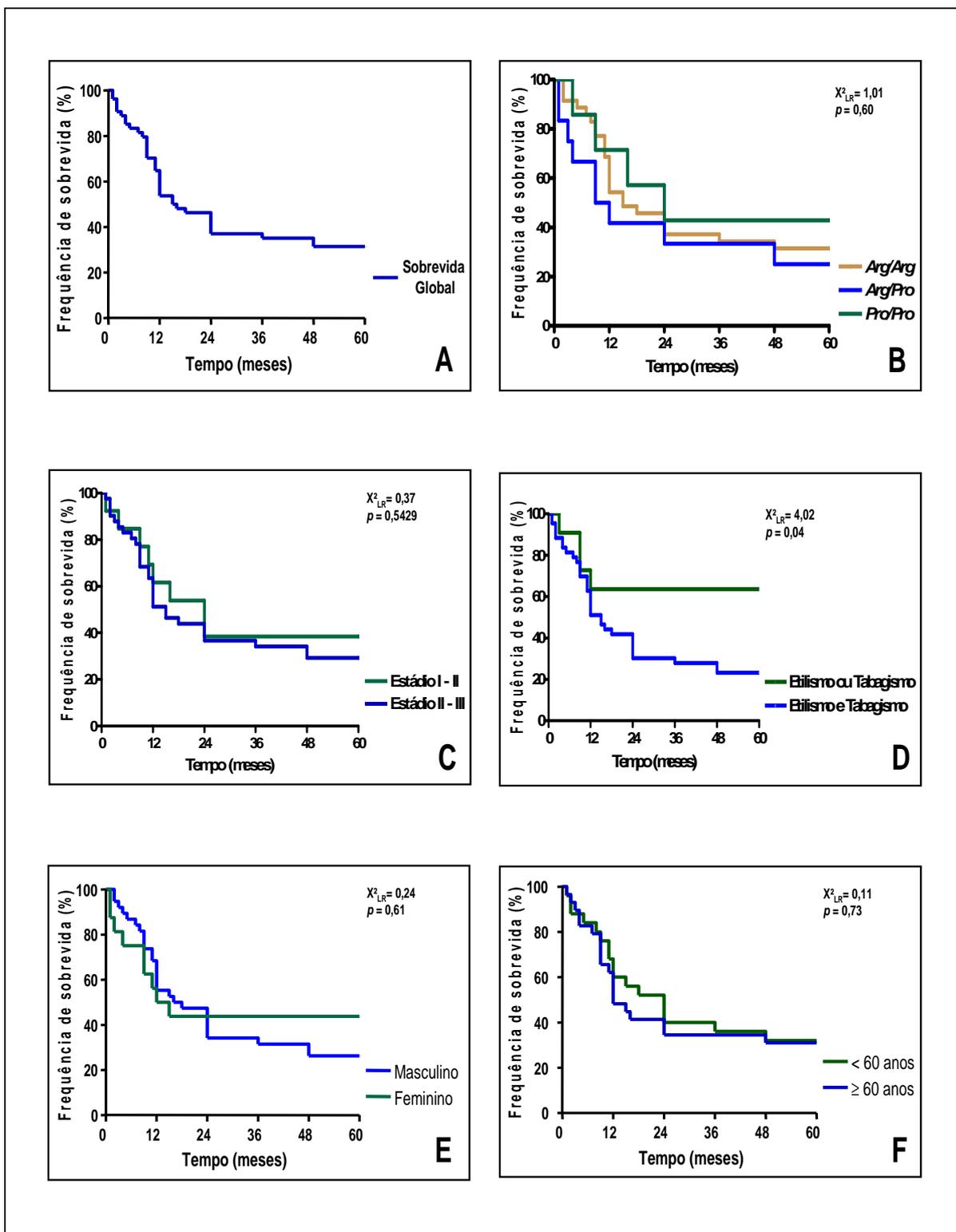


Figura 2. Painel indicando as análises de sobrevida global (A), genótipos $p53^{RR}$, $p53^{RP}$ e $p53^{PP}$ (B), estadiamentos I-II e III-IV (C), hábitos de vida: tabagista e etilista (D), sexo feminino e masculino (E) e idade (<60 anos e ≥ 60 anos) (F), pelo teste de Logrank.

5. DISCUSSÃO

O CCO é considerado um problema de saúde pública. O CEC é o tipo histológico mais comum, correspondendo a 90% dos casos dos carcinomas que ocorrem na CO. (HOGAN *et al.*, 2005; ANTUNES *et al.*, 2003). No presente estudo, um total de 54 amostras de pacientes com CEC de CO foram analisadas quanto à frequência alélicas e genóticas do gene *TP53*. Trinta e oito pacientes (70,4%) são do sexo masculino e 16 (29,6%) do sexo feminino, com uma razão de homens para mulheres de 2,3:1, menor do que o observado por SARINI (2001) que foi de 7:1.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma significativa influência do tabaco e do consumo de álcool no desenvolvimento do câncer oral. A exposição a substâncias carcinogênicas químicas é um mecanismo importante no desenvolvimento do CCO (DOBROSSY *et al.*, 2005; GANDINI *et al.*, 2008). Um estudo realizado por DAY *et al.* (1993) aponta que o risco de desenvolvimento de CEC da cavidade oral em fumantes de cigarro industrializado é 6,3 vezes maior do que em não-fumantes. Os autores inferem ainda, que o efeito simultâneo do álcool e do tabaco pode aumentar em até 100 vezes o risco de se desenvolver um câncer de cavidade oral.

No presente estudo foi observado uma relação de risco positivo entre o genótipo $p53^{RR}$ e $p53^{RP}$ em pacientes que declaravam ser tabagistas e etilistas, quando comparados ao genótipo $p53^{PP}$ no grupo de pacientes diagnosticados com CCO. O risco calculado, para pacientes que apresentam as duas cópias do alelo $p53^R$ ($p= 0,001$) foi de 21 vezes, quando comparado ao genótipo $p53^{PP}$, e de nove vezes com pacientes com apenas uma cópia do alelo ($p= 0,01$). O polimorfismo de *p53*, tão controversamente sugerido como fator de risco para diversas neoplasias, neste estudo apresentou relação de risco elevado quanto ao estilo de vida dos

pacientes com CCO. É importante salientar que no presente estudo, a informação sobre os hábitos de tabagismo e etilismo do grupo controle não estava disponível, ficando assim impossibilitada a análise neste grupo.

Quanto à etnia 46,3% dos pacientes com carcinoma escamoso de base de língua eram brancos, 13,0% negros e 40,7% pardos. Esses dados devem ser avaliados com cuidado, pois foram obtidos retrospectivamente através do prontuário médico e, portanto, foram escritos pelo médico responsável pelo primeiro atendimento ou enfermeira que realizou a primeira entrevista na admissão do paciente ao hospital. Na literatura há resultados discordantes, pois ocorreram relatos do predomínio da raça negra, contrapondo-se com outro, onde a raça branca predominou (JI *et al*, 2008). O Brasil é um país de difícil determinação genética racial devido a grande miscigenação ocorrida na nossa população o que pode explicar a diferença entre os dados obtidos.

A definição de um limite de idade para caracterização da população idosa ainda é controversa na literatura. Optou-se pela aplicação do critério da OMS que indica a idade de 60 anos como o início da velhice nos países em desenvolvimento apesar de vários autores utilizarem limites mais amplos (SARINI *et al*, 2001).

Quanto à idade, os pacientes apresentaram uma frequência de 53,7% a partir da 6ª década de vida. Este resultado assemelha-se aos achados da literatura que mostra uma maior incidência nos pacientes portadores de carcinoma escamoso de base de língua numa faixa etária em torno da 5ª e 6ª décadas de vida (JI *et al*, 2008). A ocorrência de câncer da cavidade oral em jovens é rara, no estudo não houve casos com idade abaixo de 35 anos e apenas um paciente com menos de 40 anos.

O carcinoma escamoso de base de língua apresenta-se com mais frequência em estadio avançado ao diagnóstico, sendo que a maioria destes casos apresenta um prognóstico reservado (PERLMUTTER *et al*, 2002). No presente estudo, 75,9% dos pacientes com CCO apresentavam lesões avançadas (estadio III e IV), corroborando com os dados da literatura.

Campanhas preventivas contra o tabagismo e o etilismo, auto-exames e o incentivo a exames clínico-laboratoriais periódicos a partir da quarta década de vida, são necessários para a prevenção e o diagnóstico precoce do CEC de base de língua. Adicionalmente, uma investigação multidisciplinar envolvendo o odontólogo, o fonoaudiólogo e o otorrinolaringologista pode ser utilizada como ferramenta na prevenção e controle eficazes para o CCO.

Apesar das populações caso e controle não estarem em equilíbrio de Hardy-Weinberg, ambas tiveram o genótipo $p53^R$ como o mais prevalente. Estes dados corroboram os relatos de INSERRA *et al*. (2003), que também encontraram uma maior prevalência do alelo $p53^R$ e de seu genótipo homozigoto em diferentes grupos étnicos da América como brancos não-espânicos, mexicanos, afro-americanos, asio-americanos e americanos nativos.

Vários estudos sugerem que fatores inerentes ao próprio indivíduo, incluindo os polimorfismos genéticos podem conferir diferenças individuais na ocorrência do CCO, tornando a investigação de polimorfismos em proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular muito importante (HARRIS & WARNAKULASURIYA, 2004; PETITJEAN *et al*.,2007; YANG *et al*.,2008).

As tentativas de associação entre polimorfismos de TP53 e câncer se acentuaram a partir do relato de THOMAS *et al*. (1999) que verificaram diferenças bioquímicas e biológicas nas isoformas $p53^R$ e $p53^P$. Apesar da intensidade e

diversidade das propostas de estudo, as pesquisas realizadas têm demonstrado resultados controversos.

SCHNEIDER-STOCK *et al.* (2004) não encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p= 0,83$) nas freqüências genóticas dos pacientes com carcinomas de cólon retal e seu grupo controle saudável, não podendo assim associar o polimorfismo como um fator de risco para o desenvolvimento de tumores que acometem este sítio anatômico.

Por outro lado, um estudo feito com 141 pacientes com neoplasias do trato urinário, FURIHATA *et al.* (2002) verificaram que o alelo $p53^R$ aparece preferencialmente mutado nestes tumores do que o alelo $p53^P$ ($p = 0,02$). BUYRU *et al.* (2003) mostraram que a homozigose do alelo $p53^R$ aumenta o risco para o desenvolvimento do câncer de mama em três vezes na população turca. Porém, em um trabalho sistemático de revisão sobre o papel do polimorfismo no risco de câncer de mama, DUNNING *et al.* (1999) sugerem que o alelo $p53^P$ ($p = 0,03$) está mais associado ao risco deste tumor do que o alelo $p53^R$. Para os tumores de próstata, SUZUKI *et al.* (2003) também verificaram que o genótipo $p53^{PP}$ tem um papel importante na suscetibilidade deste câncer na população japonesa ($p = 0,04$).

Adicionalmente, o estudo realizado por KOUSHIK *et al.* (2004) verificou que o genótipo $p53^{RR}$ promove um sutil aumento do risco de carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas. Vários autores demonstraram que a presença de $p53^{RR}$ está relacionada a um risco aumentado no desenvolvimento de tumores, como em cânceres de mama (VIEIRA *et al.*, 2008), pulmão (BOLDRINI *et al.*, 2008), esôfago (HIYAMA *et al.*, 2007) entre outros. Por outro lado, INSERRA *et al.* (2003) em um estudo com 3.371 mulheres de diferentes etnias não encontraram nenhuma associação entre o genótipo $p53^{RR}$ com o aumento do risco de câncer cervical

relacionado ao HPV. No Brasil, esta associação também se mostrou negativa conforme resultados de BRENNAN *et al.* (2004).

No presente estudo não foram observadas diferenças estatísticas significantes ($p=0,79$) entre as frequências alélicas e genótípicas em pacientes com CEC da base de língua e pacientes controle.

Apesar da isoforma $p53^R$ possuir um melhor poder apoptótico conforme demonstrado por diversos estudos (BERGAMASCHI *et al.*, 2003; THOMAS *et al.*, 1999) o que poderia garantir ao paciente um melhor prognóstico da doença, no presente trabalho nenhuma conclusão a respeito foi evidenciada. Isso é justificado pelo fato de que as sobrevidas dos pacientes homocigotos $p53^{RR}$ (31,4%), $p53^{PP}$ (42,3%) e $p53^{RP}$ (25%) foram relativamente próximas e sem nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os genótipos ($p=0,60$). Segundo Kowalski *et al.* (2000), o fator que afeta a sobrevida dos pacientes com CEC de língua é de fato o estadiamento tumoral que compromete de maneira considerável o tratamento da doença.

6. CONCLUSÃO

Através deste estudo podemos concluir:

- Não foi observada associação entre a variante $p53^R$ e o desenvolvimento da carcinogênese de CCO da Base de Língua, segundo o sexo, idade e etnia;
- Pacientes tabagistas e etilistas que apresentam duas cópias do alelo $p53^R$ apresentaram um risco de até 21 vezes para o desenvolvimento do CEC de base de língua, quando comparado ao genótipo $p53^P$;
- O polimorfismo do códon 72 do gene $p53$ não pode ser considerado o único fator preditivo no prognóstico do câncer de base de língua;
- Estudos futuros com maior casuística, combinados com outras topografias do CEC de cabeça e pescoço devem ser realizados na tentativa de elucidar o papel da predisposição genética para o desenvolvimento do CEC da base de língua;
- A presente tentativa de identificar associação entre o polimorfismo genético do códon 72 do $p53$ e o CEC de base da língua apresentou resultados importantes para a tomada de decisões quanto ao estilo de vida e o diagnóstico precoce da doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, A.A.; TAKANO, J.H.; QUEIROZ, T.C.; VIDAL, A.K.L. Perfil epidemiológico do câncer bucal no CEON/HUOC/UPE e HCP. **Odontologia Clin Cientif.** 2003; vol. 2, nº 3, págs:181-6.
- BERGAMASCHI, D.; GASCO, M.; HILLER, L.; SULLIVAN, A.; SYED, N.; TRIGIANTE, G.; YULUNG, I.; MERLANO, M.; NUMICO, G.; COMINO, A.; ATTARD, M.; REELFS, O.; GUSTERSON, B.; BELL, A.K.; HEATH, V.; TAASSOLI, M.; FARELL, P.J.; SMITH, P.; LU, X.; CROOK, T. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. **Cancer Cell** 2003 Apr; vol. 3, nº 4, págs: 387-402.
- BOLDRINI, L.; GISFREDI, S.; URSINO, S.; LUCCHI, M.; GRECO, G.; MUSSI, A.; FONTANINI, G. Prognostic impact of p53 Pro72 homozygous genotype in non-small cell lung cancer patients. **Oncol Rep** 2008 Mar; vol. 19, nº 3, págs: 771-3.
- BOUDA, M.; VASSILIS, G.G.; KASTRINAKIS, N.G.; GIANOUDIS, A.; TSOULI, E.; DESPINA, D.; FOUKAS, P.; KYROUDI, A.; LASKARIS, G.; HERRINGTON, C.S.; KITTAS, C. "High Risk" HPV Types are frequently detected in potentially malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. **Modern Pathology** 2000; vol. 13, nº 6, págs: 644-53.
- BRENNA, S.M.; SILA, I.D.; ZEFERINO, L.C.; PEREIRA, J.S.; MARTINEZ, E.Z.; SYRJANEN, K.J. Prognostic value of P53 codon 72 polymorphism in invasive cervical cancer in Brazil. **Gynecol Oncol.** 2004 May; vol. 93, nº 2, págs: 374-80.
- BUYRU, N.; TIGLI, H.; DALAY, N. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. **Oncol Rep.** 2003 May-Jun; vol. 10; nº 3, págs: 711-4.
- COLOSIMO, E. A. Análise de sobrevivência aplicada. 46ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria e 9º Simpósio de Estatística Aplicada à Experimentação Agrônômica, São Paulo; ESALQ/USP; 2001; págs: 15 - 35.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Neoplasia. In: Robbins. Patologia estrutural e funcional. 6.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan** 2000; Cap.8: págs: 233-295.

DAY, G.L.; BLOT, W.J.; AUSTIN, D.F.; BERNSTEIN, L.; GREENBERG, R.S.; PRESTON-MARTIN, S.; SCHOENBERG, J.B.; WINN, D.M.; MCLAUGHLIN, J.K.; FRAUMENI JUNIOR, J.E. Racial differences in risk of oral and pharyngeal cancer: alcohol, tobacco and other determinants. **J Natl Cancer Inst** 1993; vol. 85, págs: 465-473.

DIKSHIT, R.P. & KANHERE, S. Tobacco habits and risk of lung, oropharyngeal and oral cavity cancer: a population-based case-control study in Bhopal, India. **International Journal of Epidemiology** 2000; vol. 29, págs: 609-614.

DOBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer and Metastasis Rev** 2005; vol. 24, págs: 9-17.

DUNNING, A.M.; HEALEY, C.S.; PHAROAH, C.P.D.; TEARE, M.D.; PONDER, B.A.; EASTON, D.F. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1999 Oct ; vol. 8, nº 10, págs: 843-54.

FAN, R.; WU, M.T.; MILLER, D.; WAIN, J.C.; KELSEY, K.T.; WIENCKE, J.K.; CHRISTIANI, D.C. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2000 Oct; vol. 9, nº 10, págs: 1037-42.

FERLITO, A.; RINALDO, A.; ROBBINS, K.; LEEMANS, C.; Shah, J.; Andersen, P.; KOWALSKI, L.; PELLITTERI, P.; CLAYMAN, G.; ROGERS, S.; MEDINA, J.; BYERS, R. Changing concepts in the surgical management of the cervical node metastasis. **Oral Oncology** 2003; vol. 39, págs: 429-35.

FRANCHI A, MASSI D, GALLO O, SANTUCCI M, PORFIRIO B. Radiation-induced cutaneous carcinoma of the head and neck: is there an early role for p53 mutations? **Clin Exp Dermatol**. 2006 Nov;31(6):793-8. Epub 2006 Jul 4.

FURIHATA M, TAMOTSU T, MANABU M, ATSUSHI K, YUJI O, NAOTAMI T, MORINASA K, TARO S. p53 Mutation Arising in Arg72 Allele in the Tumorigenesis and Development of Carcinoma of the Urinary Tract. **Clinical Cancer Research**. Vol. 8, 1192–1195, May 2002

GANDINI, S.; BOTTERI, E.; IODICE, S.; BONIOL, M.; LOWENFELS, A.B.; MAISONNEUVE, P.; BOYLE, P. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. **International Journal of Cancer**. 2008 Jan ; vol. 122, nº 1, págs: 155-64

GREENBERG MS. WHO-FIC Education Committee: A Status Report 2005-2006. Meeting of WHO Collaborating Centres for the Family of International Classifications. Tunis, Tunisia, 29 Oct. – 4 Nov. 2006.

GREENBERG MS. WHO-FIC Education Committee: A Status Report 2008 – 2009. Seoul, Republic of Korea, 10 – 16 Oct. 2009.

GREENBLATT, M.S.; BENNETT, W.P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res.** 1994 Sep; vol. 54, nº 18, págs: 4855-78

HARRIS, N.; BRILL E, SHOHAT O, PROKOCIMER M, WOLF D, ARAI N, ROTTER V. Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. **Mol Cell Biol.** 1986 Dec;6(12),págs:4650-6

HARRIS, C. K.; WARNAKULASURIYA, A. E. Prevalence of oral mucosal lesions in a alcohol misures in south London. **J Oral Pathol** 2004; v. 33, págs. 253-259.

HIYAMA, T.; YOSHIHARA, M.; TANAKA, S.; CHAYAMA, K. Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk (Review). **Int J Oncol.** 2008 May; vol. 32, nº 5, págs: 945-73.

HOGAN, L.C.; HALL, G.M.; CHAMBERS, I.G. Oral cancer at a Tasmanian tertiary referral clinic, the Royal Hobart Hospital 1996-2002. **Aust Dent J.** 2005; vol. 50, nº 1, págs: 31-6.

IAMARROM, A.; PATTANAPORN, K.; PONGSIRIWET, S.; WANACHANTARARAK, S.W.; PRAPAYASATOK, S.; JITTIDECHARAKS, S. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. **Int J Oral Maxillofacial Surgery** 2004; vol. 33, págs: 84-8.

IARC: IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 64. Human papillomaviruses. Lyon (France): **International Agency for Research on Cancer**; 1995.

INSERRA, P.; ABRAHAMSEN, M.; PAPPENFUSS, M.; GIULIANO, A.R. Ethnic variation of the P53 codon 72 polymorphism, HPV persistence, and cervical cancer risk. **Int J STD AIDS.** 2003 Dec; vol. 14, nº 12, págs: 800-4.

- JI, X.; NEUMANN, A.S.; STURGIS, E.M.; ADLER-STORTHZ, K.; DAHLSTROM, K.R.; SCHILLER, J.T.; WEI, Q.; LI, G. p53 codon 72 polymorphism associated with risk of human papillomavirus-associated squamous cell carcinoma of the oropharynx in never-smokers. **Carcinogenesis** 2008 Apr; vol. 29, nº 4, págs: 875-9.
- JITOMIRSKI, F. Câncer bucal. In: Saúde Bucal Coletiva. **São Paulo: Editora Santos**. 2000; págs: 445-456.
- JOHANSEN, L.V.; GRAU, C.; OVERGAARD, J. Squamous Cell Carcinoma of the oropharynx, an analysis of treatment results in 289 consecutive patients. **Acta Oncol** 2000; vol. 39, págs: 985-93.
- KUOSHIK, A.; PLATT, R.W.; FRANCO, E.L. p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2004 Jan; vol. 13, nº1, págs: 11-22.
- KOWALSKI, L.P.; CARVALHO, A.L. Natural history of untreated head and neck cancer. **Eur J Cancer** 2000; vol. 36, págs: 1032-7.
- KOWALSKI, L.P.; CARVALHO, A.L. Feasibility of supraomohyoid neck dissection in N1 and N2a oral cancer patients. **Head Neck** 2002; vol. 24, págs: 921-4.
- LANGEROD, A.; BUKHOLM, I.R.; BREGARD, A.; LONNING, P.E.; ANDERSEN, T.I.; ROGNUM, T.O.; MELING, G.I.; LOTHE, R.A.; BORRESEN, A.L. The TP53 codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2002; vol. 11, págs: 1684-8.
- LINGEN, M.W.; KUMAR, V. Cabeça e pescoço. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. Cap. 16; p. 820.
- MACIEL, S.; LESSA, F.; RODRIGUES, C.S. Mortalidade por câncer bucal e desigualdades sociais em capitais brasileiras nos anos de 1980 e 1991. **Revista Brasileira de Odontologia em Saúde Coletiva** 2000; vol. 1, págs: 51-61.
- MASSON, L.F.; SHARP, L.; COTTON, S.C.; LITTLE, J. Cytochrome P-450 1A1 Gene Polymorphisms and Risk of Breast Cancer: A HuGE Review. **Am. J. Epidemiol**. 2005; vol. 161, págs: 901-915.

- MATSUMOTO, M.; FURIHATA, M.; KURABAYASHI, A.; ARAKI, K.; SASAGURI, S.; OHTSUKI, Y. Association between inducible nitric oxide synthase expression and p53 status in human esophageal squamous cell carcinoma. **Oncology**. 2003; vol. 64, nº 1, págs: 90-6.
- McCANN, M.F.; MACPHERSON, L.M.; GIBSON, J. The role of the general dental practitioner in detection and prevention of oral cancer: a review of the literature. **New England Journal of Medicine**. 2001 Mar; vol. 344, nº 11, págs: 841-2.
- Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Câncer no Brasil – Dados dos Registros de Base Populacional. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/regpop/2003/>, dezembro de 2008.
- MISRA, C.; MAJUMDER, M.; BAJAJ, S.; GHOSH, S.; ROY, B.; ROYCHOUDHURY, S. Polymorphisms at p53, p73, and MDM2 loci modulate the risk of tobacco associated leukoplakia and oral cancer. **Mol Carcinog**. 2009 Feb 9.
- NORONHA, M.J.R. & DIAS, F.L. Câncer da laringe: uma abordagem multidisciplinar. **Rio de Janeiro: Revinter** 1997.
- PATEL SG, SHAH JP. TNM – Staging of Cancers of the Head and Neck: Striving for Uniformity Among Diversity. *CA Cancer J Clin* 2005; 55; 242-258. DOI:10.3322/canjclin.55.4.242.
- PERLMUTTER, M.A.; JOHNSONS, J.T.; SNYDERMAN, C.H.; CANO, E.R.; MYERS, E.N. Functional outcomes after treatment of squamous cell carcinoma of the base of tongue. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2002; vol. 128, págs: 887-91.
- PETITJEAN, A.; MATHE, E.; KATO, S.; ISHIOKA, C.; TAVTIGIAN, S.V.; HAINAUT, P.; OLIVIER, M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Human Mutation**. 2007 Jun; vol. 28, nº6, págs: 622-9.
- PIETSCH, E.C.; HUMBEY, O.; MURPHY, M.E. Polymorphisms in the p53 pathway. **Oncogene**. 2006 Mar 13; vol. 25, nº 11, págs: 1602-11.
- PIGNON, J.P.; BOURHIS, J.; DOMENGE, C.; DESIGNÉ, L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. **The Lancet**. 2000 Aug 26; vol. 356, nº 9231, págs: 767-8.

- REID, B.C.; WINN, D.M.; MORSE, D.E. *et al.* Head and neck in situ carcinoma: incidence, trends and survival. **Oral Oncol** 2000; vol. 36, págs: 414-20.
- RIBEIRO Jr. ; SAFATLE-RIBEIRO, p53 in clinical contexts: yes or not?] **Arquivos Gastroenterologia**. 2006 Jan-Mar; vol. 43, nº 1, págs: 6-7.
- SANTIAGO, C.; BANDRÉS, F.; GÓMEZ-GALLEGO, F. Polimorfismos de citocromo P450: papel como marcador biológico. **Medicina del Trabajo** 2002; vol. 11, nº 3, págs: 130-140.
- SARINI, J.; FOURNIER, C.; LEVEBFRE, J.L.; BONAFOS, G.; VAN JT, COCHE-DEQUEANT, B. Head and neck squamous cell carcinoma in elderly patients:a long term retrospective review of 273 cases. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2001; vol. 127, págs: 1089-92.
- SCHECKENBACH, K.; LIEVEN, O.; GOTTE, K.; BOCKMUHL, U.; ZOTZ, R.; BIER, H. & BALZ, V. p53 codon 72 polymorphic variants, loss of allele-specific transcription, and human papilloma virus 16 and/or 18 E6 messenger RNA expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention** 2004; vol. 13, págs: 1805-1809.
- SCHENEIDER-STOCK, R.; BOLTZE, C.; PETERS, B.; SZIBOR, R.; LANDT, O.; MEYER, F.; ROESSNER, A. Selective loss of codon 72 proline p53 and frequent mutational inactivation of the retained arginine allele in colorectal cancer. **Neoplasia**. 2004; vol. 6, págs: 529-35.
- STOREY, A.; THOMAS, M.; KALITA, A.; HARWOOD, C.; GARDIOL, D.; MANTOVANI, F.; BREUER, J.; LEIGH, I.M.; MATLASHEWSKI, G.; BANKS, L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature**. 1998 May 21; vol. 393, nº 6682, págs: 229-34.
- SUMMERGILL, K.F.; SMITH, E.M.; KIRCHNER, H.L.; HAUGEN, T.H.; TUREK, L.P. p53 polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity, and oral cancer. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics** 2000; vol. 3, p. 334 – 339.
- SUSUKI, K.; MATSUI, H.; OHTAKE, N.; NAKATA, S.; TAKEI, T.; NAKAZATO, H.; OKUGI, H.; KOIKE, H.; ONO, Y.; ITO, K.; KUROKAWA, K.; YAMANAKA, H. A p53 codon 72 polymorphism associated with prostate cancer development and progression in Japanese. **J Biomed Sci**. 2003 Jul-Aug; vol. 10, nº 4, págs: 430-5.

- TENTI, P.; VESENTINI, N.; RONDO SPAUDO, M.; ZAPPATORE, R.; MIGLIORA, P.; CARNEVALI, L.; RANZANI, G.N. p53 codon 72 polymorphism does not affect the risk of cervical cancer in patients from northern Italy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2000 Apr; vol. 9, n° 4, págs: 435-8.
- THOMAS, M.; KALITA, A.; LABRECQUE, S.; PIM, D.; BANKS, L.; MATLASHEWSKI, G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. **Mol Cell Biol.** 1999; vol. 19, págs: 1325-8.
- VIEIRA, J.O.; DA SILVA, I.D.; HIGO, P.E.; NOGUEIRA DE SOUZA, N.C.; GEBRIM, L.H. Study of p53 codon 72 polymorphism in patients with breast cancer. **European Journal Gynaecology Oncology.** 2008; vol. 29, n° 4, págs: 364-7.
- WALKER, D.M.; BOEY, G.; McDONALD, L.A. The pathology of oral cancer. **Pathology** 2003; vol. 35, págs: 376-83.
- YANG, A.K.; LIU, T.R.; CHEN, F.J.; MA, X.F.; GUO, Z.M.; SONG, M.; Li, Q.L.; ZENG, Z.Y. Survival analysis of 229 patients with advanced squamous cell carcinoma of the oral tongue. **Chinese Journal of Cancer** 2008 Dec; vol. 27, n° 12, págs: 1315-20.
- YOUSPA, S.H. Overview of carcinogenesis: past, present and future. **Carcinogenesis** 2000; 21: 341-344.