

**SYLVIA SANCHES CORTEZZI**

**PAPILOMAVÍRUS HUMANO E POLIMORFISMO  
DO GENE *TP53* NO CARCINOMA  
ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO**

**SYLVIA SANCHES CORTEZZI**

**PAPILOMAVÍRUS HUMANO E POLIMORFISMO DO  
GENE *TP53* NO CARCINOMA ESPINOCELULAR DE  
CABEÇA E PESCOÇO**

**Dissertação apresentada para obtenção do Grau de  
Mestre em Genética**

**Orientadora: Profa. Dra. Paula Rahal**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Eloiza H. Tajara da Silva**

**São José do Rio Preto – SP  
2002**

Cortezzi, Sylvia Sanches.

Papilomavírus humano e polimorfismo do gene *TP53* no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço / Sylvia Sanches Cortezzi. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2002

91 f. ; 30 cm.

Orientador: Paula Rahal

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Vírus do papiloma. 2. Câncer - Aspectos genéticos.. 3. Polimorfismo - (Genética). 4. Câncer de cabeça e pescoço. I. Rahal, Paula. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616-006.6

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), sob orientação da Profa. Dra. Paula Rahal e co-orientação da Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Paula Rahal, pela orientação, amizade, atenção e paciência dispensadas a mim em todos os momentos do trabalho.

À Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, pela co-orientação, amizade, bem como pela confiança depositada em mim desde os tempos de graduação.

À Profa. Dra. Luísa Lina Villa, por fornecer materiais indispensáveis à realização deste trabalho.

Ao Prof. Antônio Cordeiro, pela análise estatística.

Aos médicos e dentistas que cederam gentilmente as amostras utilizadas neste trabalho.

Aos amigos Dani, Delvana, Fátima, Gustavo, Henrique, Lenícy, Nádia, Sofia e Vitória pela amizade, apoio e pelos momentos inesquecíveis em Jaboticabal.

Às amigas Cássia, Karina, Paula, Rita e Ximena, pela convivência diária durante a graduação, dividindo vitórias e derrotas ao longo desses anos.

Aos amigos Alfredo, Ana Paula, Amílcar, Cynthia, Eduardo, Lya, Yoda, e Weber, pelos deliciosos anos que passei com vocês.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular, em especial Alessandra Trovó, Alessandra Vidotto, Ana Cristina, Flávia, Fernanda, Giovana, Janaína, Jucimara, Lucimari, Paola e Ulises, pelo apoio, amizade e almoços mais divertidos.

Ao Rafael, que acompanhou de perto as minhas alegrias e tristezas durante o trabalho e que me ajudou muito na etapa final.

À direção do IBILCE, pela infra-estrutura de ensino e pesquisa.

À FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À toda minha família, especialmente minha mãe Eny, minha irmã Sara e minha avó Enid, que sempre estiveram ao meu lado, incentivando-me a apoiando-me, e que me deram seu amor incondicional.

Ao meu querido pai Sylvio que, apesar de ausente, sempre está nas minhas lembranças e saudades, e com certeza está olhando por mim nesse momento.

Aqueles que não foram aqui citados, mas que também estiveram presentes na minha vida, meu muito obrigado.

A Deus, por tudo.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	07
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Caracterização das amostras.....	27
3.2. Métodos.....	32
3.2.1. Extração de DNA.....	32
3.2.2 Amplificação do DNA pela PCR.....	33
3.2.3 Tipagem dos produtos de PCR.....	35
4. RESULTADOS.....	37
4.1 Dados das amostras estudadas.....	38
4.2 Extração de DNA e análise dos resultados.....	38
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
8. ANEXO.....	79
9. RESUMO.....	87
10. ABSTRACT.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

HPV = Papilomavírus Humano

LCR = *Long Control Region*

E1, E2, E4, E5, E6 e E7 = Genes da região *Early* (Precoce) dos HPVs

L1 e L2 = Genes da região *Late* (Tardia) dos HPVs

EGF = Fator de crescimento epidérmico

pRb = Proteína do Retinoblastoma que atua no controle negativo do ciclo celular

*RB* = Gene que codifica para a proteína pRb

p53 = Proteína de 53kDa pró-apoptótica

*TP53* = Gene que codifica para a proteína p53

E2F = Fator de transcrição E2F

HDAC 1 e 2 = Desacetilases de histona 1 e 2

LXCXE = Motivo existente nas proteínas E7 dos HPVs que permite ligação com a pRb

CDK = Quinase dependente de ciclina

TNM = Tumor Nódulo Metástase

## ***1. Introdução***



## 1. INTRODUÇÃO

Os papilomavírus são um grupo de vírus pertencentes à família *Papillomaviridae*, com capsídeo protéico e ausência de envelope. Possuem cerca de 55 nm de diâmetro, simetria icosaédrica e um genoma circular de DNA dupla fita. São altamente hospedeiro-específicos e tecido-específicos, apresentando tropismo por células epiteliais (Howley, 1996; Cheah et al., 1998; Syrjänen et al., 1999; Menzo et al., 2001). Os papilomavírus humanos (HPVs) são os membros mais estudados dessa família, com mais de 100 tipos identificados até o momento. Todos os tipos são estritamente epiteliotrópicos e, segundo o local de infecção, são subdivididos em cutâneos (quando presentes na camada superficial da pele) ou de mucosas (quando presentes nas mucosas anogenital ou orofaríngea). Infecções causadas pelos HPVs de mucosa podem levar ao desenvolvimento de lesões benignas proliferativas como verrugas comuns, plantares e genitais, essas últimas conhecidas como papiloma venéreo ou condiloma acuminado. Até o início do século XX, acreditava-se que as verrugas genitais eram uma forma de sífilis ou gonorréia. Apenas em 1907 foi estabelecida a natureza viral dessas verrugas, pela inoculação de seus filtrados na pele e indução posterior de papilomas. Além de lesões benignas, certos tipos de HPVs de mucosa são capazes de persistir e levar à progressão de lesões pré-malignas a carcinomas invasivos, especialmente na genitália humana (Reid et al., 1987; McKaig et al., 1998; zur Hausen, 2000; McMurray et al., 2001; Nebesio et al., 2001).

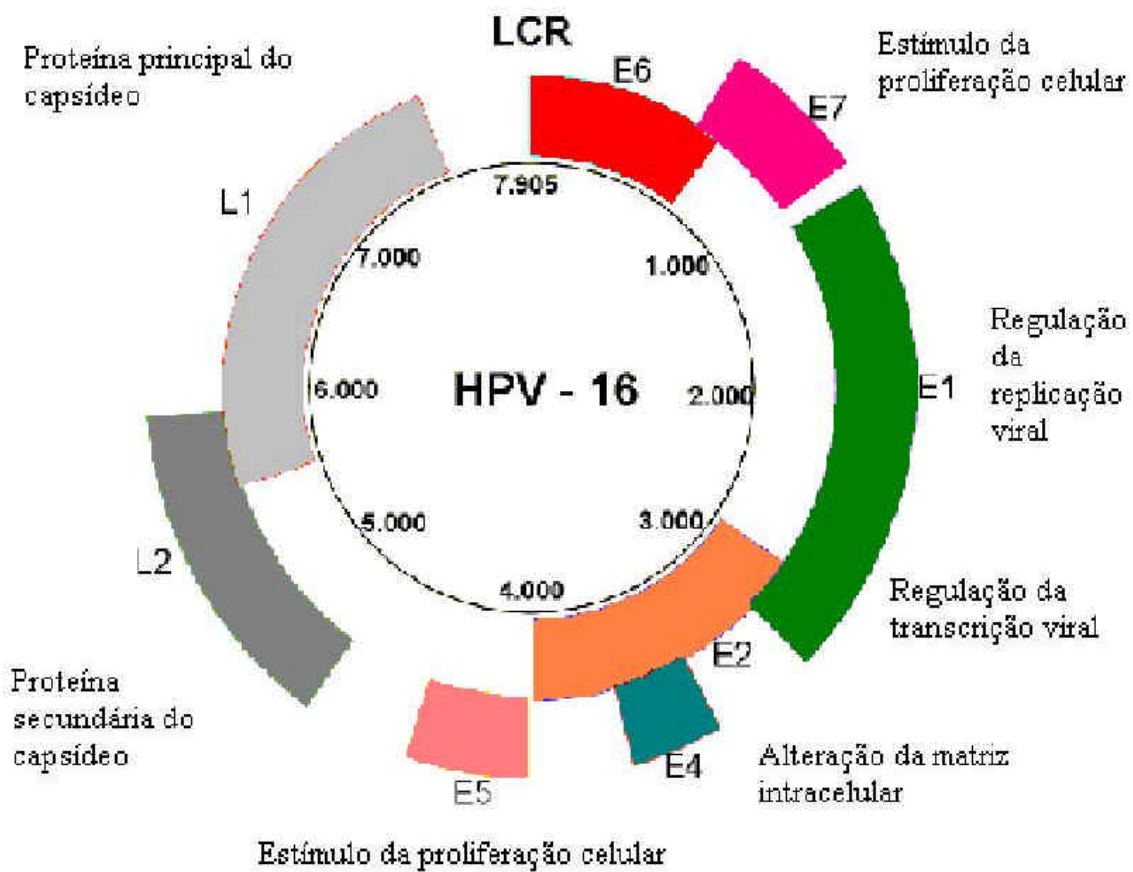
O material genético desses vírus está contido em uma única molécula de DNA circular dupla fita composta por aproximadamente 8000 pares de bases empacotada em um capsídeo protéico. O genoma divide-se em três regiões e contém oito genes que estão presentes na região precoce (*Early*) e na região tardia (*Late*), ambas responsáveis por 40 e 50% de todo o material genético, respectivamente, separadas por uma sequência regulatória não codificadora (*Long Control Region* – LCR) (zur Hausen, 1996; McKaig et al., 1998). Essa última, de apenas 500 a 1000 pares de bases, contém a origem de replicação de DNA e as sequências que regulam a expressão gênica às quais se ligam fatores protéicos transcricionais celulares e virais (Chan et al., 1989; McBride

et al., 1991; Howley, 1991; Nebesio et al., 2001). A região precoce contém seis genes denominados E1, E2 e E4-7, cujos produtos estão envolvidos no controle da transcrição e da replicação do DNA. Os genes da região tardia, L1 e L2, codificam duas proteínas estruturais do capsídeo, de 55 e 70kDa (Figura 1) (Baker et al., 1987; zur Hausen, 1996; Flaitz et al., 1998; McKaig et al., 1998; Syrjänen et al., 1999; Wong et al., 2000).

As proteínas mais estudadas da região *Early* são a E5, a E6 e a E7. A proteína E5 é uma proteína hidrofóbica de 84 aminoácidos, preferencialmente encontrada no complexo de Golgi e na membrana plasmática da célula hospedeira. Forma complexos com uma gama de proteínas transmembrânicas, como o receptor para o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o receptor do fator de crescimento  $\beta$  derivado de plaquetas. Liga-se a proteínas do complexo de junção *gap*, como a proteína ATPase associada à membrana, possui baixa capacidade de transformação e é expressa em infecções produtivas, atuando na expansão inicial de um clone celular infectado (zur Hausen, 2000; McMurray et al., 2001).

A proteína E6 tem 151 aminoácidos e dois domínios do tipo dedo de zinco. Embora pequena, induz muitas modificações importantes na célula hospedeira, apresentando efeito antiapoptótico. Para isso interage e induz a degradação das proteínas pró-apoptóticas Bak e p53. Leva também à alteração da transcrição de genes celulares pela sua ligação com CBP e p300, à ativação da telomerase e à desestabilização cromossômica, além de aumentar a integração de DNA estranho ao genoma celular (zur Hausen, 2000; McMurray et al., 2001).

A proteína E7, que também apresenta atividades transformantes, contém 98 aminoácidos, com sítios de fosforilação para caseína quinase II nos resíduos 31 e 32 e um domínio dedo de zinco entre os aminoácidos 40 e 98. Já foram descritas várias interações entre E7 e proteínas celulares, como fatores que



Fonte (adaptado): [kesler.biology.rhodes.edu/scij/1999/lum.html](http://kesler.biology.rhodes.edu/scij/1999/lum.html)

Figura 1. Organização do genoma do HPV-16 e funções de cada proteína viral.

regulam o crescimento celular, especialmente aqueles que atuam na transição de G1 à fase S da mitose. Sua ligação a proteínas da família Rb (pRb, p107 e p130), a desacetilases de histonas (HDAC), a quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e seus inibidores e a ciclinas E e A induz a proliferação celular, a imortalização e a transformação. A E6 e a E7, em conjunto, são capazes de imortalizar queratinócitos e induzir a síntese de DNA em células quiescentes, sendo necessárias e suficientes à imortalização celular, embora insuficientes ao desenvolvimento do fenótipo maligno (Baker et al., 1987; Munger et al., 1989; Syrjänen et al., 1999; zur Hausen, 2000; McMurray et al., 2001).

Até o momento, já foram descritos mais de 100 tipos de HPVs. A classificação dos diferentes tipos de HPV é feita com base na homologia das seqüências de DNA nos genes L1, E6 e E7. Por definição, qualquer tipo de HPV apresenta menos de 90% de homologia com outros previamente identificados e seqüenciados. Os subtipos, por outro lado, têm 90 a 98% de semelhança entre si e os vírus variantes mostram mais de 98% de homologia. (Bernard et al., 1994; Nebesio et al., 2001). Os HPVs também são classificados como de alto ou de baixo risco de acordo com seu potencial de induzir lesões malignas. Os de baixo risco, comuns em lesões benignas mas raros em malignas, compreendem os tipos 6, 11, 13, 32, 34, 40, 42, 44, 53, 54, 55 e 63 e os de alto risco, que estão associados a vários tumores malignos, incluem os tipos 16, 18, 31, 33 e 35. Os HPVs 39, 45, 51, 52, 56, 59 e 61 também são encontrados em displasias e lesões malignas, porém menos freqüentemente (Bernard et al., 1994; zur Hausen, 1996; McKaig et al., 1998; Muñoz, 2000; Nebesio et al., 2001).

Os HPVs 16 e 18 são ligados ao desenvolvimento de carcinomas cervicais, sendo encontrados em aproximadamente 70% e 9% desses tumores, respectivamente. A prevalência de infecções por HPVs de alto risco é maior entre mulheres com até 30 anos e sexualmente ativas. Ao contrário, a presença dos HPVs 6 e 11 está associada a lesões benignas, como o condiloma acuminado, a papilomatose laríngea e a neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau, que dificilmente progredem para processos malignos (Lorincz et al., 1992; Steenbergen et al., 1995; Chaouki et al., 1998; Wong et al., 2000; Gillison et al., 2000; Nebesio et al., 2001; Chan et al., 2002).

Dado que a divisão em grupos de alto e baixo risco é decorrente dos resultados de estudos em neoplasias cervicais, é possível que essa classificação seja diferente para tumores de outros locais do organismo (McKaig et al., 1998, Josefsson et al., 2000; Zehbe et al., 2001).

Na maioria das infecções virais na espécie humana, o sistema imune gera respostas celulares e humorais com anticorpos específicos e elimina o agente viral. No caso do HPV, as respostas sorológicas são lentas e apenas 50% dos indivíduos infectados desenvolvem anticorpos específicos ao capsídeo, provavelmente devido ao fato das suas proteínas apresentarem baixos níveis de expressão e não serem reconhecidas pelo sistema imune. Nas infecções persistentes, o vírus incorpora-se ao genoma humano, podendo comandar a maquinaria celular do hospedeiro responsável pela regulação da proliferação normal (Flaitz et al., 1998; Bosch et al., 2001).

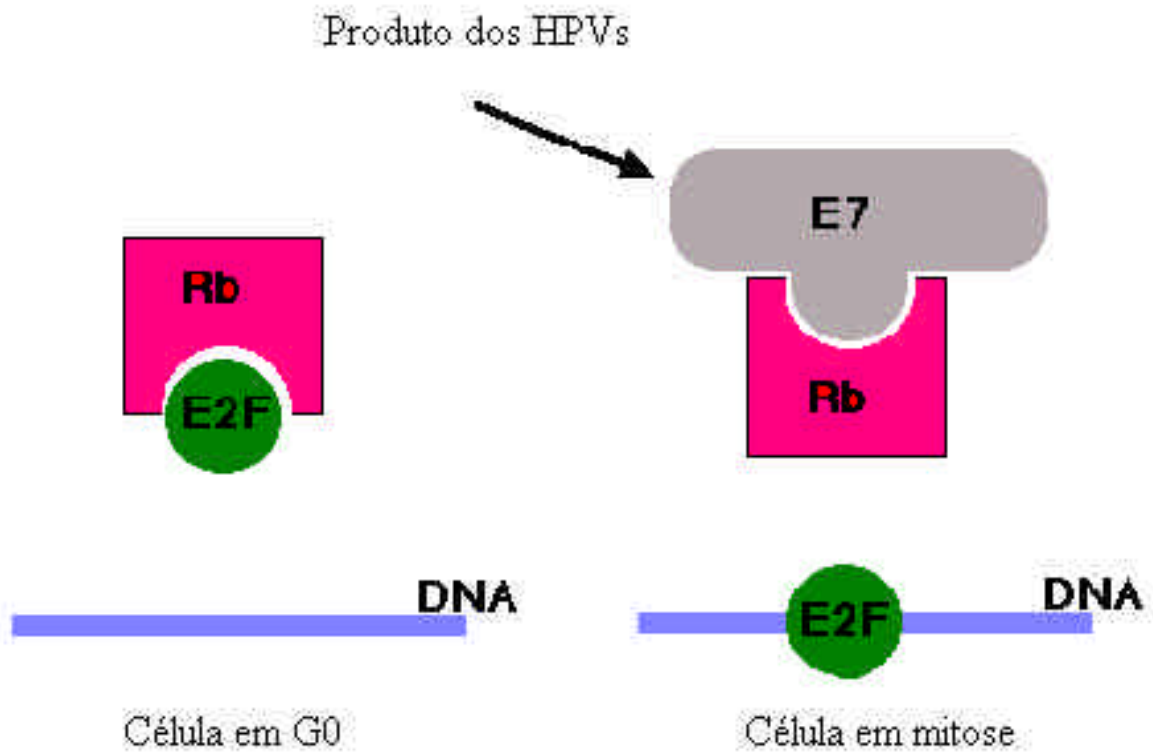
Nas lesões benignas, o DNA viral encontra-se principalmente na forma intranuclear e extracromossomal, ou seja, episomal. Nesse caso, a partícula viral duplica-se sincronicamente com a célula hospedeira. Nas lesões malignas, ao contrário, há persistência e integração do HPV ao material genético da célula. A integração é um evento essencial no processo carcinogênico e é encontrado em até 70% das células metastáticas (Durst et al., 1985; Cheah et al., 1998; Syrjänen et al., 1999; McMurray et al., 2001). Essa integração parece ocorrer ao acaso porém é preferencialmente localizada próxima a protooncogenes, genes supressores e sítios frágeis. Pode ser, portanto, um evento altamente mutagênico se interromper um gene supressor de tumor ou inserir seqüências reguladoras de transcrição viral ao lado de um protooncogene, como o *c-myc* e o *N-myc*, o que já foi observado em carcinomas genitais (Steenbergen et al., 1995; Badaracco et al., 2000). Embora a integração viral não ocorra em nenhum local específico do genoma humano, ela segue um padrão característico, que resulta na expressão descontrolada de E6 e E7, aumentando a instabilidade genômica da célula hospedeira (Sang et al., 1992; McKaig et al., 1998; Wong et al., 2000; Nishikawa et al., 2000; Sisk et al., 2000; Venuti et al., 2000; Ferenczy et al., 2002; Munger, 2002).

Os HPVs de alto risco podem induzir anormalidades pela interação de suas proteínas E6 e E7 com proteínas do circuito regulatório do ciclo celular, como a

p53 e a pRb, respectivamente. (Flaitz et al., 1998; McKaig et al., 1998; zur Hausen, 2000; Bosch et al., 2001). O produto do gene *RB* é um regulador negativo do crescimento celular que, em sua forma hipofosforilada, bloqueia a progressão do ciclo nas fases G0/G1, ligando-se ao fator de transcrição E2F e inibindo, assim, sua função. No final de G1, a pRb é fosforilada principalmente pelos complexos ciclinaD-CDK4 e ciclinaE/CDK2 e libera E2F, permitindo sua atuação na transcrição de genes envolvidos na síntese de DNA. A pRb mantém-se fosforilada até o início da fase M, quando passa novamente para o estado desfosforilado (zur Hausen,2000; McMurray et al., 2001).

As proteínas E7 dos HPVs de alto risco apresentam o motivo LXCXE entre os aminoácidos 22, 24 e 26 e um sítio na região carboxil-terminal, que são necessários para sua interação física com a pRb. Outras proteínas celulares que também se ligam à pRb possuem esse motivo LXCXE ou motivos relacionados, incluindo a ciclina D1, fatores de transcrição da família AP-1, as HDAC1 e 2 e a BRG1. A região LXCXE da E7 liga-se a uma alça hidrofóbica da pRb, altamente conservada entre as proteínas homólogas a pRb, como a p107 e p130, incluindo aquelas de outras espécies. A E7 dos HPVs de alto risco atua de maneira similar aos complexos ciclina D,E/CDK2,4, levando à fosforilação da pRb, com conseqüente liberação de E2F e aumento de atividade proliferativa (Figura 2). A E7 dos HPVs de baixo risco, ao contrário, têm baixa afinidade pela pRb devido a uma troca de aminoácidos no resíduo 20 e, por esse motivo, menor capacidade de transformação (Helin et al., 1993; Munger et al., 1989; Sellers et al., 1997; McKaig et al., 1998; Chan et al.,2001; Dong et al., 2001; McMurray et al., 2001).

As proteínas E6 dos HPVs de alto risco, por outro lado, ativam a telomerase, uma enzima responsável pela regeneração de seqüências cromossômicas teloméricas, processo esse característico de células embrionárias



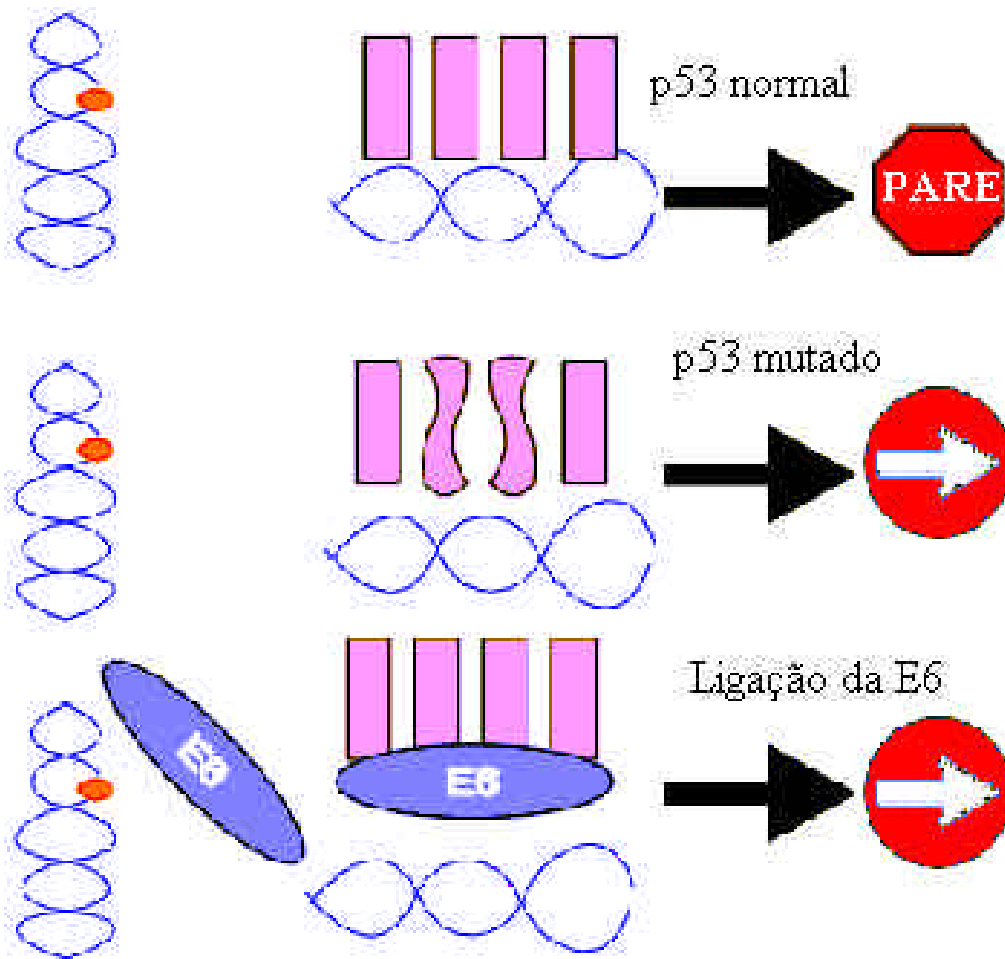
Fonte: [www.ultranet.com/.../T/tumorSuppressorGenes.html](http://www.ultranet.com/.../T/tumorSuppressorGenes.html)

Figura 2. Ligação da E7 dos HPVs de alto risco a pRb, liberando E2F e promovendo a mitose.

ou neoplásicas. Além disso, formam complexos com as proteínas supressoras de tumor Bak e, mais comumente, p53, o que resulta em degradação dessas proteínas pela ubiquitinação, desregulação do ciclo celular e instabilidade genômica. A p53 é expressa em resposta a condições de estresse celular, como radiação UV, hipóxia ou infecção viral, estimulando a expressão de genes envolvidos no controle do ciclo celular, como o inibidor de CDK p21, e conduzindo a célula à apoptose. A E6 pode bloquear o controle celular realizado pela p53 mantendo-a no citoplasma e assim bloqueando sua passagem ao núcleo ou, então, interagir com a p53 e promover sua degradação. A inativação de p53 por um desses mecanismos inibe sua habilidade de estimular ou reprimir a transcrição de genes celulares alvo (Figura 3) (Scheffner et al., 1990; Scheffner et al., 1991; McKaig et al., 1998; Summersgill et al., 2000; zur Hausen, 2000; McMurray et al., 2001).

O seqüestramento da p53 e da pRb e a conseqüente perda de regulação do ciclo celular parecem, então, constituir o ponto central do efeito oncogênico dos HPVs. Assim, é razoável supor que a inativação dos genes *TP53* e *RB* por outros mecanismos, como mutação em ponto e deleções, deve ser necessária nos processos de malignização sem infecção pelo vírus. Realmente, estudos epidemiológicos mostram que há uma relação inversa entre infecção pelo HPV e mutações em *TP53* em carcinomas cervicais. Os tumores HPV negativos apresentam maior número de mutações no gene *TP53* e aqueles tumores com o genoma viral integrado ao genoma celular apresentam *TP53* no estado selvagem (Crook et al., 1991; Jiko et al., 1994). Esses dados indicam que alterações na função do gene *TP53* têm grande participação no processo carcinogênico. Na presença de HPVs de alto risco, a perda da atividade apoptótica de *TP53* ocorre pela formação do complexo com E6, levando à degradação da proteína. Na ausência do vírus, a inativação de *TP53* ocorre por mutação estrutural ou regulatória ou perda alélica. Em tumores com HPVs de risco intermediário, cuja capacidade de transformação é menor que a dos HPVs de alto risco, há uma alta incidência de mutações em *TP53*, provavelmente como um efeito auxiliar na carcinogênese. Portanto, o seqüestramento de p53 por E6 é análogo à inativação





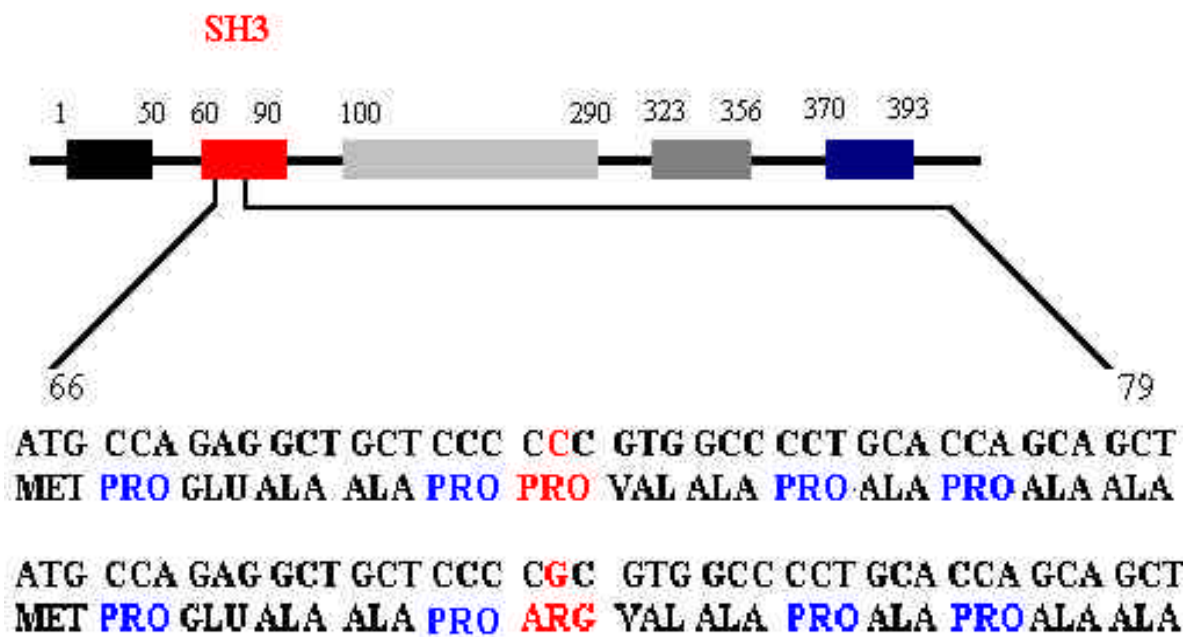
Fonte: [www.baclesses.fr/.../7-carcino-virale/Virale-6.htm](http://www.baclesses.fr/.../7-carcino-virale/Virale-6.htm)

Figura 3. Mecanismos que envolvem a proteína p53 no ciclo celular.

por mutação (Scheffner et al., 1990; Vogelstein et al., 1992; Chen et al., 1994; Greenblatt et al., 1994; Kim et al., 2001).

Nos últimos anos, têm surgido evidências de que determinados polimorfismos genéticos estão relacionados com uma maior susceptibilidade ao câncer. O fato de apenas uma fração das mulheres infectadas pelo HPV manifestar carcinoma cervical indica que o vírus, apesar de ser importante, não é suficiente para a transformação celular e devem existir cofatores na etiologia do tumor. Estudos moleculares revelaram um polimorfismo do gene *TP53* que resulta na presença de uma prolina (p53pro) ou de uma arginina (p53arg) na posição correspondente ao códon 72, no exon 4 (Figura 4) (Matlashewski et al., 1987; Summersgill et al., 2000; Klug et al., 2001). Essas duas variantes polimórficas diferem entre si bioquímica e biologicamente e parecem não ser susceptíveis à degradação mediada por E6 na mesma intensidade. A proteína E6 dos HPVs de alto risco é mais efetiva na degradação de p53arg que p53pro *in vitro*; por outro lado, a E6 dos HPVs de baixo risco é menos eficiente na inibição de p53arg e é inativa com p53pro (Thomas et al., 1999). Por esse motivo, esse polimorfismo vem sendo investigado como marcador genético para o risco de câncer cervical. Embora existam controvérsias, alguns estudos indicam que o risco de desenvolvimento de carcinoma cervical positivo para HPV de alto risco é até sete vezes maior em mulheres homozigotas para o alelo arginina em relação a mulheres heterozigotas (Helland et al., 1998; Josefsson et al., 1998; Minaguchi et al., 1998; Storey et al., 1998; Klaes et al., 1999; Madeleine et al., 1999; Muñoz et al., 1999; Riou et al., 1999; Tachezy et al., 1999; Makni et al., 2000; Nishikawa et al., 2000; Andersson et al., 2001; Gustafsson et al., 2001; Klug et al., 2001; Zehbe et al., 2001; Humbey et al., 2002).

Os dados acima ilustram apenas alguns aspectos dos mecanismos envolvidos no processo tumorigênico relacionado com os HPVs. Extensos estudos epidemiológicos confirmaram o papel crucial desses vírus no carcinoma cervical, assim como nos carcinomas anal, perianal, vulvar e de pênis (Walboomers et al., 1994; Bosch et al., 2000; Nebesio et al., 2001). Também vem sendo observada a



Fonte (adaptado): Matlashewski et al., 1987.

Figura 4. Localização do polimorfismo no códon 72 do gene *TP53*.

relação dos HPVs com lesões benignas e malignas de outros sítios anatômicos, como nos carcinomas espinocelulares de pele, cólon e cabeça e pescoço (Lutzner et al., 1982; Syrjänen et al., 1983a; Syrjänen et al., 1983b; Syrjänen et al., 1983c; Loning et al., 1985; Naghashfar et al., 1985; Pfister et al., 1985; Gogusev et al., 1986, de Villiers et al., 1986a; de Villiers et al., 1986b; Loning et al., 1987; Snijders et al., 1994; Lindel et al., 2001; O'Connor et al., 2001; Sayhan et al., 2001; Giovannelli et al., 2002).

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço é uma das neoplasias mais comuns, com taxas de mortalidade mundiais que atingem até 20/100 mil habitantes e frequência correspondente a 6% dos casos de câncer diagnosticados anualmente no mundo todo. No Brasil, as estimativas recentes disponíveis referem-se apenas ao câncer de boca, com valores superiores a 10.000 novos casos e 3.000 mortes para 2002 (Ministério da Saúde INCA/PRO-ONCO, 2002). Os sítios anatômicos que estão incluídos nesse grupo de tumores constituem a cavidade oral, a nasofaringe, a orofaringe, a hipofaringe e a laringe (Landis et al., 1998; Klussmann et al., 2001; Mork et al., 2001). O seu desenvolvimento, do mesmo modo que em outras neoplasias, é um processo de múltiplos passos, nos quais a exposição a carcinógenos é seguida de mutações genéticas que iniciam alterações histopatológicas epiteliais amplas na mucosa do trato aerodigestivo superior (Califano et al., 1996; Piffkò et al., 1998). Muitas dessas mutações refletem a natureza de adutos e lesões no DNA causados pela atuação de uma substância mutagênica específica (Minamoto et al., 1999).

No grupo de tumores de cabeça e pescoço, os dados epidemiológicos apontam para exposições ambientais como os principais fatores de risco de transformação maligna. O consumo de tabaco, concomitante ou não ao álcool, é o principal fator de risco. Contudo, apesar de um grande número de indivíduos estar exposto a esses fatores, apenas uma parcela desenvolve carcinoma de cabeça e pescoço. Da mesma forma, cerca de 20% dos tumores ocorre em não usuários de tabaco e álcool. Esses dados sugerem a presença de outros fatores de risco. A susceptibilidade genética e as infecções por herpesvírus, papilomavírus e Epstein Barr vírus têm sido referidas como cofatores nesse processo (Gallo et al., 1996; Sorensen et al., 1997; McKaig et al., 1998; Flaitz et al., 1998; Gillison et al., 2001; Lindel et al., 2001; Miller et al., 2001).

Como citado anteriormente, a infecção por HPV de alto risco está associada a cerca de 80% dos casos de tumores de colo de útero (McKaig et al., 1998; Smith et al., 1998). Entre esses, um grande número apresenta o mesmo tipo de HPV na cavidade oral, sugerindo que, após uma infecção genital primária, outras mucosas podem ser infectadas. Além disso, existem relatos de mulheres com carcinomas cervicais e de cabeça e pescoço concomitantes e positivos para o vírus, demonstrando uma possível susceptibilidade sistemática aos efeitos carcinogênicos dos HPVs (Premoli et al., 1998; Gostout et al., 2002).

O fato de haver uma prevalência da infecção viral em estágios pré-malignos e iniciais dos tumores, além de um longo período de persistência entre a infecção e o diagnóstico do carcinoma oral, conta a favor de que o HPV isoladamente não é suficiente para a transformação maligna e modificações celulares adicionais devem ser necessárias (Steenbergen et al., 1995; Badaracco et al., 2000; Wong et al., 2000; Gillison et al., 2000; Sisk et al., 2000; Gillison et al., 2001; Mork et al., 2001; van Houten et al., 2001). A mesma explicação é dada para o fato de muitas mulheres serem positivas para HPV, mas apenas uma minoria delas manifestar o carcinoma cervical. Nesses casos, a atuação de outros fatores, como o uso prolongado de contraceptivos orais, resposta do sistema imunológico, infecções por *Chlamydia* e herpesvírus 2, susceptibilidade genética e exposição a carcinógenos deve ser requerida para a carcinogênese (Chaouki et al., 1998; Ylitalo et al., 1999; Bosch et al., 2000; Kjellberg et al., 2000; Sisk et al., 2000).

Cerca de 40 a 52% dos casos de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço exibem alterações no gene *TP53*, cujo espectro de mutações é semelhante ao de outros tumores com fatores de risco similares, tais como os de esôfago e os de pulmão, refletindo os efeitos da exposição aos mesmos carcinógenos (Olshan et al., 1997; Minamoto et al., 1999; Gillison et al., 2000; van Houten et al., 2001). Em relação ao HPV, 21 a 47% do total de casos de lesões malignas de cabeça e pescoço são infectadas pelo vírus. Em 40 a 90% dessas lesões é encontrado o HPV16, seguido pelo tipo 18, presente em aproximadamente 12% dos tumores. Em uma pequena porcentagem das amostras, há coinfeção pelos tipos 16 e 18 ou por outro tipo (Scholes

et al., 1997; Koh et al., 1998; McKaig et al., 1998; Riethdorf et al., 1998; Badaracco et al., 2000; Gillison et al., 2000; Sisk et al., 2000; van Houten et al., 2000; Venuti et al., 2000; Klussmann et al., 2001, Scully, 2002). A presença do vírus nesse grupo de tumores também está associada a fatores de risco semelhantes àqueles dos carcinomas cervicais, entre eles, início precoce da atividade sexual, múltiplos parceiros sexuais e história de verrugas genitais (Schwartz et al., 1998; Gillison et al., 2000; Mork et al., 2001, Scully, 2002).

A ocorrência do vírus é diferente em cada sítio anatômico. Na cavidade oral, a sua presença varia entre 24% a 72%; já nas lesões de laringe, a variação é de 20 a 48%. Porém, os dados mais expressivos referem-se a carcinomas de orofaringe, que exibem infecção em 45% dos casos, sendo as tonsilas a região preferencialmente infectada, com positividade em 41 a 58% dos casos (Gillison et al., 2000; Smith et al., 2000; Klussmann et al., 2001; Miller et al., 2001; Morshed et al., 2001; Jacob et al., 2002; Nagpal et al., 2002; Strome et al., 2002)

Existem algumas hipóteses para explicar a relação do HPV com a área tonsilar. A infecção viral pode ser facilitada pela estrutura anatômica específica desses órgãos. Realmente, as tonsilas exibem invaginações profundas da superfície, denominadas criptas tonsilares, que poderiam facilitar o acesso às células basais e à estimulação de antígenos. O tecido presente é um epitélio em monocamada, mais sensível a infecções que um epitélio estratificado. Além disso, a presença de tecido linfóide pode afetar a transcrição viral e a transformação celular (Franceschi et al., 2000; Klussmann et al., 2001).

As lesões malignas da orofaringe apresentam mais frequentemente origem basalóide, são indiferenciadas, com pequena taxa de mutação de *TP53* e estão menos associadas ao consumo de tabaco e álcool (Franceschi et al., 2000; Gillison et al., 2000). Foi observado também um aumento de sobrevivência dos pacientes com tumores de orofaringe HPV positivos, a maioria pelo HPV tipo 16. A explicação mais adequada para esse fato é que tumores HPV positivos, por estarem menos associados a exposições a fumo e/ou álcool, tendem a ser localizados em um único foco e o processo de cancerização de campo não ocorre. Por esse motivo, esses pacientes são menos

susceptíveis a tumores sincrônicos em outros locais do trato aerodigestivo superior, o que afeta positivamente a taxa de sobrevivência (Cao et al., 2000; Smith et al., 2000; Friesland et al., 2001; Kaya et al., 2001; Klusmann et al., 2001; Lindel et al., 2001; Schwartz et al., 2001).

Muitos dados da literatura indicam a presença do HPV em amostras de cavidade oral de indivíduos saudáveis. Entretanto, os valores variam muito, atingindo de 0 a 100%, com a maioria das taxas observadas em torno de 5 a 20%. Nas amostras positivas, os HPV mais frequentemente encontrados são os tipos 16 e 18, sugerindo que a infecção persistente é muito comum e precoce no processo neoplásico (Sugerman et al., 1997; McKaig et al., 1998; Terai et al., 1999; Smith et al., 2000; Miller et al., 2001; Mork et al., 2001; Summersgill et al., 2001; Giovannelli et al., 2002; Strome et al., 2002). Uma revisão da literatura indica que a probabilidade de detectar o HPV em carcinomas orais é 4.7 vezes maior que em mucosas orais normais. Do mesmo modo, o risco de infecção é até três vezes superior em lesões pré-cancerosas que em indivíduos normais e as infecções pelos tipos de alto risco ocorrem três vezes mais que aquelas de baixo risco, sendo os tipos 16 e 18 detectados em 30% dos casos (Miller et al., 2001).

Em alguns estudos, a porcentagem de amostras de carcinomas de cabeça e pescoço positivas para o HPV não é expressiva e os valores variam de 3,4 a 12,5% (Takano et al., 1997; Miguel et al., 1998; Lindeberg et al., 1999; Sand et al., 2000). A explicação para esses achados pode estar na sensibilidade do método empregado. A hibridização *in situ* não radioativa tem baixa sensibilidade, sendo capaz de detectar aproximadamente 10 a 20 cópias virais por célula. A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando iniciadores da região L1 dos HPV, detecta uma cópia viral em cada 100 células. Outro tipo de PCR, a *nested* PCR, é muito mais sensível, podendo identificar uma cópia em até 100 mil células (Vowles et al., 1997; Hoffmann et al., 1998; Gillison et al., 2001).

Além da metodologia, outros fatores também parecem estar envolvidos na variação de resultados entre os laboratórios. Por exemplo, alguns trabalhos revelam diferenças de frequências de infecção por HPV em lesões benignas, como papilomas respiratórios, em grupos raciais distintos, o que sugere a participação

de características genéticas na susceptibilidade ao vírus. Os métodos de coleta e a preservação das amostras e o pequeno número amostral podem ser fatores adicionais aos baixos índices de detecção do HPV (Moore et al., 1999; Miller et al., 2001). O estudo de grupos controles parece, então, importante e pode fornecer dados como a prevalência de HPV em tecidos normais em grupos populacionais diferentes e o papel de fatores de risco. Entretanto, os métodos de colheita de mucosa em pessoas saudáveis não têm sido padronizados e os resultados já obtidos permanecem inconsistentes. A explicação para esses achados inclui o tipo de células para análise, ora procedentes das camadas mais superficiais ora da camada basal da mucosa (McKaig et al., 1998).

Em relação ao significado clínico e prognóstico da presença ou ausência do HPV em carcinomas de cabeça e pescoço, os dados da literatura não permitem conclusões definitivas. Os trabalhos não mostram diferenças significativas em relação a tamanho da lesão, comprometimento de linfonodos e grau histológico (Almadori et al., 1996; Portugal et al., 1997; Riethdorf et al., 1998; Badaracco et al., 2000; Sand et al., 2000; Gillison et al., 2000; Sisk et al., 2000; Klusmann et al., 2001; Lindel et al., 2001). Apesar da constatação de maior sobrevida em pacientes com tumores de orofaringe HPV positivos, essa afirmativa não é confirmada em carcinomas de outros sítios de cabeça e pescoço, como da laringe e hipofaringe (Schwartz et al., 2001).



## ***2. Objetivos***

## 2. OBJETIVOS

Em função dos dados divergentes sobre a presença do HPV em tumores de cabeça e pescoço e em indivíduos normais, seu significado clínico e relações com outros fatores como o polimorfismo no exon 4 do gene *TP53*, o presente trabalho teve como objetivos:

1. Investigar a presença de HPVs de alto risco em amostras de DNA de mucosa oral de indivíduos saudáveis fumantes e não fumantes e de pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.

2. Avaliar o significado biológico da infecção viral em lesões de cabeça e pescoço comparando as frequências e tipos de HPVs em tecidos neoplásicos com aqueles de tecidos normais procedentes de indivíduos saudáveis submetidos ou não a fatores de risco.

3. Relacionar a presença de HPVs com o sexo, a idade, o consumo de álcool e fumo e com o genótipo para o polimorfismo no códon 72 do gene *TP53*.

4. Investigar a presença de polimorfismos no códon 72 do gene *TP53* em indivíduos saudáveis e em amostras de tumores e avaliar seu papel no processo neoplásico.

5. Identificar quais os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento dos tumores de cabeça e pescoço.

### ***3. Material e Métodos***

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

O material estudado compreendeu, inicialmente, do DNA de amostras frescas de 67 tumores de cabeça e pescoço e de mucosa oral de 164 indivíduos controles. Entretanto, algumas amostras não obtiveram sucesso na amplificação pelos *primers* do gene *TP53*, sendo excluídas do presente trabalho. Assim, foram analisadas amostras frescas de 50 tumores de cabeça e pescoço e de mucosa oral de 142 indivíduos controles.

##### Amostras frescas de tumores de cabeça e pescoço

As amostras de tumores de cabeça e pescoço utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho, São Paulo, e pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP. Os dados referentes a diagnóstico e estadiamento foram encaminhados pelos médicos responsáveis, além daqueles referentes a sexo, idade e consumo de álcool e fumo (Tabela 1).

##### Amostras de mucosa oral

As amostras de mucosa oral foram obtidas de 60 indivíduos não fumantes e de 82 indivíduos fumantes. Além dos dados referentes a consumo de fumo e álcool, aqueles relativos a sexo, idade, tipo de alimentação, exposição a raio X e história de câncer na família também foram incluídos em questionário respondido pelos participantes. Os dados dos 142 indivíduos controles, fumantes e não fumantes, estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. As amostras foram fornecidas por dentistas da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araçatuba e de clínicas particulares da região. Todos os participantes foram informados sobre os objetivos da pesquisa e assinaram o termo de consentimento aprovado pelo CONEP/MS (Processo n° 25000.049326/2000-74).

Tabela 1. Caracterização das 50 amostras de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço quanto a idade (anos), sexo (M=masculino, F=feminino), etnia (C=caucasóide, N=negro, M=mulato, O=oriental), exposição a tabaco e álcool (P= positivo, N=negativo), sítio primário do tumor e classificação TNM (Tumor, Nódulo, Metástase). ND= não disponível.

Tumor	Idade	Sexo	Etnia	Fumo	Etilismo	Sítio	TNM
T2	69	F	C	P	P	Orofaringe	T4N0M0
T3	68	M	C	P	P	Laringe	T4N3MX
T6	59	M	N	P	N	Língua	T4
T7	59	M	C	P	P	Orofaringe	T4N0MX
T8	72	M	C	P	N	Língua	T2N0M0
T18	60	M	C	P	P	Orofaringe	T4N1M0
T21	75	F	C	P	N	Boca	T2M0N0
T22	45	M	C	P	N	Laringe	T1bN0M0
T23	61	M	C	P	N	Orofaringe	T4N2aMX
T31	80	M	C	P	N	Laringe	T2N0M0
T35	74	M	C	P	P	Laringe	T3N2bM0
T36	53	M	C	P	P	Laringe	T1N0M0
T38	65	F	C	N	N	Boca	T2N0M0
T41	76	F	C	P	P	Boca	T3N0M0
T43	70	F	C	ND	ND	Língua	ND
T52	56	M	C	P	P	Glote	T4M0M0
T53	39	M	C	P	P	Pálato mole	T3N0M0
T58	63	M	C	P	N	Tonsila	T3N0M0
T61	46	M	C	P	N	Seio piriforme	T4N2M0
T62	72	M	C	P	P	Glote	T4N0M0
T63	70	M	M	P	P	Língua	T4N1M0
T64	54	M	C	P	P	Pelve lingual	T4N1M0
T65	51	M	C	P	P	Pálato mole	T3N2M0
T66	55	M	C	P	N	Laringe	T3N0M0
T67	51	M	C	P	P	Tonsila	T4N2BM0
T68	45	M	C	P	P	Língua	T4N0M0
T69	42	M	C	P	P	Supraglote	T4N2AM0
T70	62	M	C	P	N	Língua	T3N0M0
T71	56	M	ND	P	P	Valécula	T4NEAM0
T72	73	M	C	P	P	Laringe	T4N2BM0
T73	61	M	C	P	P	Pelve lingual	T3N0M0
T74	67	F	C	P	N	Pelve lingual	T3N0M0
T75	69	M	C	P	P	Glote	T3N0M0
T76	51	M	N	P	N	Pelve lingual	T3N0M0
T77	56	M	C	P	P	Transglote	T4N0M0
T79	58	F	C	P	P	Laringe	T4N0M0
T80	74	F	C	P	N	Pelve lingual	T4N0M0
T81	52	M	M	P	P	Pelve lingual	T4N20M0
T82	57	M	C	P	P	Língua	T4N3M0
T83	54	M	C	P	P	Valécula	T4N20M0
T84	80	F	C	N	N	Língua	T3N2M0
T85	73	M	O	N	N	Face nasal	T4N0M0
T86	54	M	C	P	P	Pelve lingual	T4N20M0
T87	49	M	C	P	N	Pálato mole	T3N1M0
T88	70	M	C	P	N	Prega vocal	T3N0M0
T89	50	M	C	P	N	Valécula	T4N1M0
T90	63	F	N	ND	ND	Fossa posterior	ND
T91	50	F	C	P	N	Seio piriforme	T2N2BM0
T92	68	M	C	P	P	Pelve lingual	T2N0M0
T93	58	M	C	P	N	Pelve lingual	T2N0M0

Tabela 2. Caracterização dos 82 indivíduos controles fumantes quanto a idade (anos), sexo (M = masculino; F = feminino), exposição ao tabaco (T = tempo em anos e I = intensidade de cigarros/dia) e ao álcool (P = número de porções/semana; A = abstinência; ND = não disponível), frequência de ingestão de frutas, verduras e carne (número de porções/semana), história de câncer na família e raio X no último ano.

Indivíduos	Idade	Sexo	Exposição			Frutas/Verduras		Carne		História	Raio X	
			Tabaco		Álcool	<5	≥5	<5	≥5		Boca	Outros
			T	I	P							
F1	47	M	28	60	04	+		+	+			
F2	55	F	37	40	<1	+		+		+		
F3	33	F	25	40	<1		+	+			+	
F5	59	M	43	40	<1		+	+	+			
F6	61	F	28	10	<1		+	+	+		+	
F7	49	M	22	20	01		+	+			+	
F8	65	M	48	20	<1		+	+	+		+	
F11	54	F	31	10	01		+	+	+	+	+	
F12	60	M	30	20	<1		+	+	+		+	
F13	49	M	34	20	05		+	+	+			
F14	24	F	08	01	03	+		+		+		
F15	49	F	30	20	<1		+	+	+			
F16	58	F	44	20	A		+	+				
F17	47	F	31	20	A		+	+	+		+	
F18	38	F	26	20	A	+		+				
F19	44	F	26	20	04		+	+	+			
F20	45	F	27	06	02		+	+	+		+	
F21	46	M	31	20	20	+		+		+		
F22	51	M	33	30	02		+	+		+		
F25	48	M	32	30	12		+	+				
F26	78	M	64	1	07		+	+				
F27	56	F	25	40	02	+		+		+	+	
F28	57	M	50	06	10		+	+				
F29	56	M	37	40	03		+	+				
F30	88	M	53	20	A		+	+				
F31	56	M	44	10	10		+	+				
F32	65	M	51	40	02		+	+	+	+	+	
F33	69	M	23	80	02		+	+	+			
F34	47	M	11	40	05		+	+	+			
F35	70	M	52	20	20		+	+				
F36	53	M	38	20	A		+	+	+		+	
F37	79	M	67	04	14		+	+				
F38	60	M	30	40	14		+	+	+			
F39	72	M	65	01	07		+	+			+	
F40	48	M	25	10	10		+	+				
F41	54	M	05	04	03		+	+				
F42	60	M	47	10	21	+		+				
F43	77	M	62	01	01	+		+				
F44	60	F	32	20	A		+	+	+		+	
F45	48	F	27	03	A		+	+				
F46	62	F	19	20	02	+		+	+		+	
F47	50	F	24	06	A		+	+		+		
F48	60	M	27	60	03		+	+	+			

F51	53	M	18	10	07	+		+	+	
F52	58	M	20	15	05		+		+	
F55	59	M	01	ND	05		+		+	
F57	39	F	05	10	02		+		+	
F58	32	M	16	4	05	+		+	+	+
F59	20	M	01	3	05	+		+	+	
F60	52	M	30	25	03		+		+	
F61	40	M	20	20	02		+		+	+
F62	52	M	30	10	A	+		+		+
F64	47	M	12	4	A	+		+	+	+
F65	35	M	10	20	A	+		+	+	
F66	39	M	29	20	A	+		+		
F67	48	M	39	40	03	+		+		+
F68	26	M	01	03	10	+		+		+
F69	27	M	09	13	05		+		+	
F70	20	M	04	20	10	+		+		
F71	40	M	17	30	10		+		+	
F72	43	M	30	20	15	+		+		+
F73	31	M	12	20	15		+		+	+
F74	37	M	08	01	05		+	+		+
F75	54	M	14	20	A	+		+		+
F76	36	M	03	15	14		+		+	+
F77	47	M	25	15	30	+		+		+
F78	48	M	20	20	10		+		+	+
F79	34	M	17	60	25		+		+	+
F80	36	M	20	20	10		+		+	
F81	45	M	28	04	ND		+		+	
F82	50	M	10	10	A	+		+		+
F85	77	M	20	03	01	+		+		+
F87	54	F	ND	10	A		+	+		
F89	45	F	02	20	<01		+		+	+
F90	51	M	34	20	10		+		+	
F91	47	M	30	20	25	+		+		+
F92	62	M	45	40	A		+		+	+
F93	52	M	28	20	10		+		+	+
F94	63	M	40	02	A	+		+		
F95	55	M	40	20	15	+		+		
F97	57	M	22	40	03		+		+	+
F99	52	M	13	20	04		+		+	

---

Tabela 3. Caracterização dos 60 indivíduos controles não fumantes quanto a idade (anos), sexo (M = masculino; F = feminino), exposição ao álcool (P = número de porções/semana; A = abstinência; ND = não disponível), frequência de ingestão de frutas, verduras e carnes (número de porções/semana), história de câncer na família e raio X no último ano.

Indivíduos	Idade	Sexo	Alcool P	Frutas/Verduras		Carne		História	Raio X	
				<5	≥5	<5	≥5		Boca	Outros
NF1	29	M	4		+		+			
NF17	28	F	2		+		+	+		
NF20	27	F	2	+		+		+		
NF22	55	F	1		+		+			+
NF24	32	F	< 1	+			+	+		
NF27	25	F	< 1		+	+		+		
NF29	28	M	3	+			+	+		
NF33	75	F	A		+		+	+		
NF34	53	M	2		+		+	+		
NF35	48	F	A		+		+	+		
NF36	54	M	A		+		+	+		
NF37	57	M	7	+			+			
NF38	49	F	A		+	+			+	
NF39	57	M	2		+		+	+		
NF40	77	F	A		+		+	+		+
NF41	52	F	< 1		+		+	+		
NF42	62	M	7		+	+		+		+
NF43	49	M	3		+		+	+	+	
NF44	51	M	< 1		+		+	+		
NF45	67	M	14		+		+	+		+
NF46	55	M	A		+	+			+	
NF47	52	M	1		+	+				+
NF48	71	F	A		+	+				+
NF49	55	F	A		+		+			
NF50	65	F	3		+	+		+		+
NF51	53	F	A		+		+			
NF52	64	F	A		+		+			
NF53	63	F	1		+		+	+		
NF54	55	F	A		+		+			
NF55	66	M	2		+		+	+		
NF56	64	F	A		+	+		+	+	+
NF59	45	M	< 1		+		+	+	+	
NF60	35	M	A		+	+		+		
NF61	30	M	< 1	+			+	+		+
NF62	39	M	A	+			+	+		
NF63	26	F	2	+		+				+
NF64	42	F	A	+			+		+	
NF65	27	M	5	+			+	+		
NF66	39	M	2	+			+			
NF67	31	M	A	+		+				
NF68	60	M	6		+		+			
NF69	47	M	5		+		+			
NF71	20	M	< 1	+			+	+		+
NF72	38	F	< 1		+	+				+
NF73	36	M	10		+		+			
NF74	36	M	6	+			+	+	+	+
NF75	26	M	5		+		+	+	+	
NF76	45	M	8		+		+	+	+	+
NF81	62	F	A		+		+	+		
NF82	52	F	< 1		+		+	+		+
NF83	90	F	< 1		+		+	+		
NF85	46	F	3		+	+		+		+
NF87	73	M	3	+			+			+
NF88	43	F	3	+		+		+	+	
NF89	42	F	A	+		+			+	
NF90	65	F	A	+			+	+		
NF91	76	M	5		+	+		+		
NF92	84	M	10		+		+			+
NF95	54	M	4		+		+			
NF96	52	F	2		+		+			+



## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Extração de DNA**

#### Extração de DNA a partir de tecido sólido fresco

O protocolo de extração de DNA a partir de tecido fresco seguiu a técnica de Sambrook *et al.* (1989) com modificações. O material foi cortado em pequenos pedaços com a ajuda de uma tesoura e colocado em tubo de centrífuga estéril contendo 2 mL de tampão de extração (Tris-HCl pH8.0 10mM, EDTA pH8.0 1mM, NaCl 25mM). O tubo foi agitado por inversão e recebeu 10 µL de proteinase K (concentração final de 200µg/mL) e 100 µL de SDS 20% (concentração final de 0,5%). O material foi homogeneizado e a mistura foi mantida a 37°C em banho-maria durante um período de 24 horas. Foram adicionados, então, 2 mL de fenol (saturado com Tris-HCl pH8.0) e o tubo foi invertido por 5 minutos, para homogeneização. Foram adicionados 2 mL de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1), com posterior homogeneização por mais 5 minutos. O tubo foi centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi realizada nova lavagem do material com clorofórmio : álcool isoamílico. Para a precipitação de DNA, o sobrenadante recebeu 200 µL de acetato de amônio 3M (concentração final 0,3M) e 5 mL de etanol absoluto gelado (concentração final 70%). O material foi homogeneizado e a precipitação ocorreu a -20°C por 24 horas. O tubo foi, então, centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos, com posterior descarte do etanol e secagem do DNA à temperatura ambiente. O material foi ressuscitado em 50 µL de tampão de diluição (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM). O DNA foi, então, guardado a -20°C para posterior amplificação por PCR.

#### Extração de DNA a partir de mucosa oral

O protocolo da extração de DNA a partir de tecido fresco seguiu a técnica de Sambrook *et al.* (1989) com modificações. Os indivíduos selecionados lavaram a boca algumas vezes com água. Em seguida, amostras de células de um ou dois locais diferentes da boca foram colhidas com espátulas previamente esterilizadas e embrulhadas individualmente em papel, que foram imediatamente lavadas em salina 0,9%. O material foi centrifugado a 1.500 rpm por 4 minutos e o sedimento foi colocado em tampão de extração, seguindo o protocolo descrito acima para as amostras frescas de tumor.

### 3.2.2 Amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

#### Polimorfismo do gene TP53

A PCR para análise do polimorfismo do gene *TP53* no códon 72 exon 4 foi realizada utilizando-se dois pares de oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 177 pb do alelo p53pro ou o fragmento de 141 pb do alelo p53arg (Figura 5). Em todos os experimentos foi utilizado um controle negativo, sem DNA, para detecção de possível contaminação, e um controle positivo heterozigoto (arg/pro). Os produtos de reação foram aplicados em gel de poliacrilamida 7,5% e, após eletroforese, os fragmentos foram visualizados por coloração com nitrato de prata (Sanguinetti *et al.*, 1994).

A seqüência de bases dos iniciadores para detecção dos alelos arginina e prolina está descrita a seguir:

Alelo arginina

*Primer* p53+ (5' – 3') TCC CCC TTG CCG TCC CAA

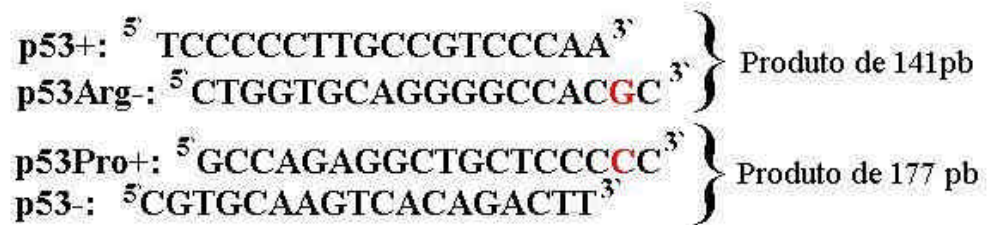
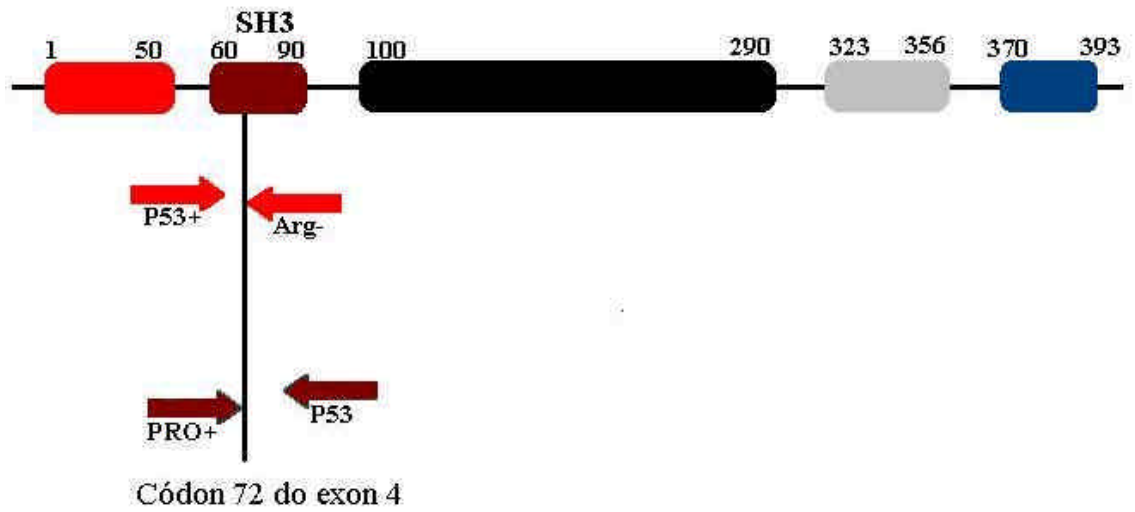
*Primer* p53 Arg (5' – 3') CTG GTG CAG GGG CCA CGC

Alelo prolina

*Primer* p53 Pro+ (5' – 3') GCC AGA GGC TGC TCC CCC

*Primer* p53 - (5' – 3') CGT GCA AGT CAC AGA CTT

A PCR foi desenvolvida em um volume final de 25 µL, contendo tampão PCR Buffer 10x, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2mM, iniciador p53+ ou p53 pro+ 10 pmol, iniciador p53arg ou p53- 10 pmol, 1 unidade de Taq DNA polimerase e DNA (cerca de 300ng). As condições de amplificação compreenderam uma primeira etapa de 5 minutos a 94°C para inativação de possíveis proteases e 24 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação do DNA, 1 minuto a 58°C (*primers* do alelo arginina) ou 55°C (*primers* do alelo prolina) para anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão das cadeias, e um último ciclo com 7 minutos a 72°C para extensão final.



Fonte (adaptado): Storey et al, 1998.

Figura 5. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos alelos Arginina e Prolina do gene *TP53*.

## HPV

Na PCR para identificação do vírus HPV, foram empregados os oligonucleotídeos GP5+/6+, que geram um fragmento de 150 pares de bases (Husman *et al.*, 1995). Em todos os experimentos foi utilizado um controle negativo, sem DNA, para detecção de possível contaminação, e DNA das linhagens celulares Hela, Caski ou Siha, gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Luisa Lina Villa (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, SP), como controle positivo. Os produtos de reação foram aplicados em gel de agarose 2% e os fragmentos foram visualizados por coloração com brometo de etídeo.

A seqüência de bases dos iniciadores GP5+/6+ está descrita a seguir:

*Primer GP5+* (5' - 3') TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC

*Primer GP6+* (5' - 3') GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C

A PCR foi desenvolvida em um volume final de 50 µL, contendo tampão PCR Buffer 10x, MgCl<sub>2</sub> 3,5mM, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2mM, iniciador GP5+ 20 pmol, iniciador GP6+ 20 pmol, 1 unidade de Taq DNA polimerase e DNA (cerca de 300ng). As condições de amplificação compreenderam uma primeira etapa de 4 minutos a 94°C para inativação de possíveis proteases e 39 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação do DNA, 1 minuto e 30 segundos a 40°C para anelamento e 3 minutos a 72°C para extensão das cadeias, e um último ciclo com 4 minutos a 72°C para extensão final.

### **3.2.3 Tipagem dos produtos de PCR**

Para tipagem do vírus, foi utilizado o método de hibridização em pontos (*dot-blot*). Essa etapa do trabalho foi realizada no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, SP, sob coordenação da Profa. Dra. Luísa Lina Villa. O método baseia-se nos princípios gerais de hibridação com a peculiaridade de que o produto amplificado por PCR é aplicado num ponto da membrana de nitrocelulose ou nylon. A hibridação ocorreu com oligonucleotídeos específicos tornados radioativos pela incorporação de P<sup>32</sup> numa reação que envolveu a T4 polinucleotídeoquinase. Foram empregadas 14 sondas, correspondendo a 14 tipos diferentes de HPVs (Husman *et al.*, 1995). Em placas de Elisa, um décimo do volume de reação de PCR foi desnaturado com NaOH 1,6N e EDTA 0,1M. O material foi pipetado sobre uma membrana de nylon ajustada a uma placa de acrílico (*Dot-machine*), submetida a vácuo e colocada sobre um papel de filtro para marcação das posições das amostras. Seguiu-se à fixação do DNA, expondo a membrana à luz UV, por 5 minutos. A membrana foi colocada em uma garrafa contendo solução de hibridação (6X SSC, 10X Denhard'ts, SDS 0,5%, 200µg/mL de esperma de salmão desnaturado) e incubada por 1 a 5 horas a 55°C. Posteriormente, foi adicionada a sonda radioativa à solução de hibridação e o material foi incubado por 12-18 horas a 55°C. As membranas foram, então, lavadas à temperatura ambiente

durante 10 minutos e duas vezes a 56°C por 10 minutos com uma solução de 2X SSC e 0,1% SDS. Ao término desse procedimento, as membranas foram expostas a filmes de raio X por 12 a 24 horas.

As sondas que foram utilizadas no *dot-blot* são específicas para tipos de HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56) e de baixo risco (6, 11, 34, 42, 54).

## ***4. Resultados***

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Dados das amostras estudadas**

#### Amostras frescas de tumores de cabeça e pescoço

Neste estudo, foram analisadas 50 amostras de tumores; destas, 11 foram provenientes de indivíduos do sexo feminino (22%) e 39 de indivíduos do sexo masculino (78%). As idades variaram de 39 a 80 anos, sendo a mediana 59,5 anos e a média 60,7 anos. Quarenta e cinco pacientes referiram consumo de tabaco (93,8%) e, entre eles, 27 (60%) também de álcool. A região mais atingida foi a orofaringe, seguida pela laringe (Tabela 4).

#### Amostras de mucosa oral

No grupo controle, 142 amostras de mucosa oral foram procedentes de 60 indivíduos não fumantes e 82 de fumantes. Desses, 48 eram do sexo feminino (33,8%) e 94 do sexo masculino (66,2%), com idades que variaram de 20 a 90 anos, sendo a mediana 51,5 anos e a média 50,5 anos (Tabela 5). Entre os fumantes, o tempo de consumo de fumo variou de um a 67 anos (média 27 anos), com intensidade de um a 80 cigarros por dia (média de 19,6 cigarros/dia, mediana de 20 cigarros/dia).

### **4.2 Extração de DNA e análise dos resultados**

#### Extração de DNA

O DNA de todas as amostras de tumores e de mucosa oral foi extraído com sucesso, embora com concentração extremamente variada. Essa característica está relacionada com a qualidade e a quantidade de material coletado e com a experiência adquirida durante o processo.

Tabela 4. Dados referentes a sexo, idade, exposição a fumo e álcool e local da lesão de 50 pacientes portadores de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço.

Parâmetros	Grupos	Total de pacientes n (%)
Sexo	Masculino	39 (78%)
	Feminino	11 (22%)
Idade*	≥ 60	25 (50%)
	< 60	25 (50%)
Fumante	Sim	45 (93,8%)
	Não	3 (6,2%)
Etilista	Sim	27 (56,2%)
	Não	21 (43,8%)
Local	Orofaringe	18 (36%)
	Laringe	13 (26%)
	Cavidade oral	11 (22%)
	Outros	8 (16%)

\* Idade média do grupo = 60,7 anos

Tabela 5. Dados referentes a sexo, idade, história de câncer na família, exposição recente a raio X e exposição ao fumo de 142 indivíduos controles.

Parâmetros	Grupos	Total de indivíduos n (%)
Sexo	Masculino	94 (66,2%)
	Feminino	48 (33,8%)
Idade*	≥ 50	76 (53,5%)
	< 50	66 (46,5%)
História de câncer	Sim	70 (49,3%)
	Não	72 (50,7%)
Exposição a raio X	Sim	60 (42,3%)
	Não	82 (57,7%)
Fumo	Sim	82 (57,7%)
	Não	60 (42,3%)

\* Idade média do grupo = 50,5 anos



### Amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Inicialmente, foram processadas 67 amostras de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, com sucesso de amplificação do exon 4 do gene *TP53* em 50 (74,6%) destas, sendo as demais excluídas do trabalho. Para o grupo controle foram processadas 164 amostras de mucosa oral, das quais 142 (86,6%) amplificaram para o mesmo segmento do gene *TP53*, sendo as demais excluídas do trabalho. A numeração das amostras controle e de tumor seguiu a ordem de colheita e/ou recebimento, porém estão apresentados os dados apenas daquelas com sucesso nas reações de PCR.

A análise da frequência de distribuição dos genótipos dos indivíduos estudados revelou 52% Arg/Arg, 32% Arg/Pro e 16% Pro/Pro no grupo dos tumores. Já no grupo dos controles, as frequências foram 50% Arg/Arg, 43% Arg/Pro e 7% Pro/Pro (Tabela 6, Figuras 7 e 8). A frequência do alelo Arg foi 68% no grupo dos tumores e 71,5% no grupo controle (Tabela 7). Quarenta e dois pacientes (84%) e 132 controles (93%) apresentaram pelo menos um alelo Arg, independentemente de serem Arg/Arg ou Arg/Pro. Por outro lado, 24 pacientes (48%) e 68 controles (47,9%) apresentaram pelo menos um alelo Pro, independentemente da condição Pro/Pro ou Arg/Pro (Tabelas 8 e 9, Figura 9).

As análises da presença do HPV utilizando as técnicas de PCR com os *primers* GP5+/6+ (Figura 10) e *dot blot* (Figura 11) mostraram uma prevalência do vírus em 8 (16%) tumores e em 15 (10,6%) controles (Tabela 10 e Figura 12). No *dot blot*, foram consideradas positivas as amostras com sinais que apresentavam uma intensidade semelhante ou maior que os sinais das amostras controles para cada membrana. Entre os tumores positivos para o vírus, 4 casos (50%) eram da laringe, 3 casos (37,5%) eram da orofaringe e 1 caso (12,5%) era da cavidade oral. Todos os casos de tumor foram positivos para o HPV 16. Já no grupo controle, 13 (86,7%) das 15 amostras infectadas pelo HPV foram positivas para o HPV 16. As duas amostras restantes foram positivas para as sondas dos HPVs 6/11 (amostra F72) e dos HPVs 51/45 (amostra NF66). Nesse grupo, 12,2% dos fumantes e 8,34% dos não fumantes apresentaram o HPV.

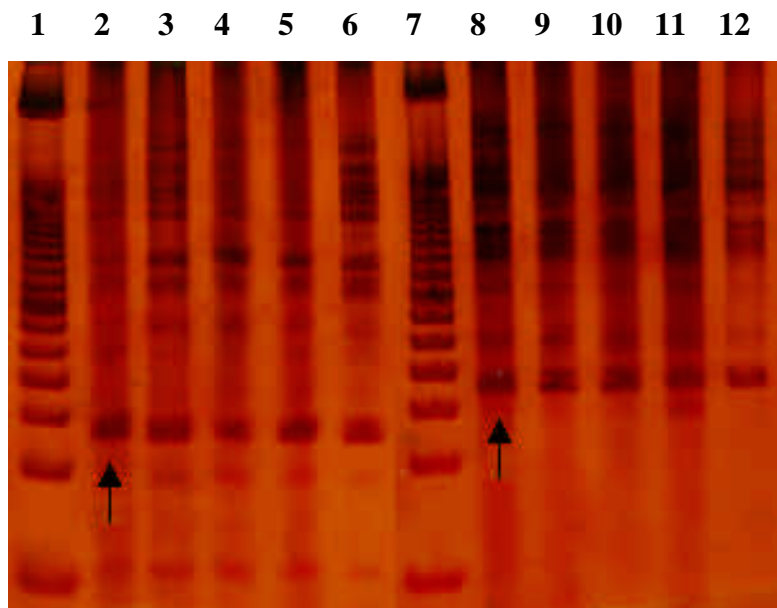


Figura 7. Fotografia do gel de poliacrilamida 7,5% mostrando resultado de amplificação dos alelos Arginina (141 pb) e Prolina (177 pb) para amostras controles e de tumores. Linhas 1 e 7 - marcador de 50pb, linhas 2 a 6 – alelo arginina, linhas 8 a 12 – alelo prolina.

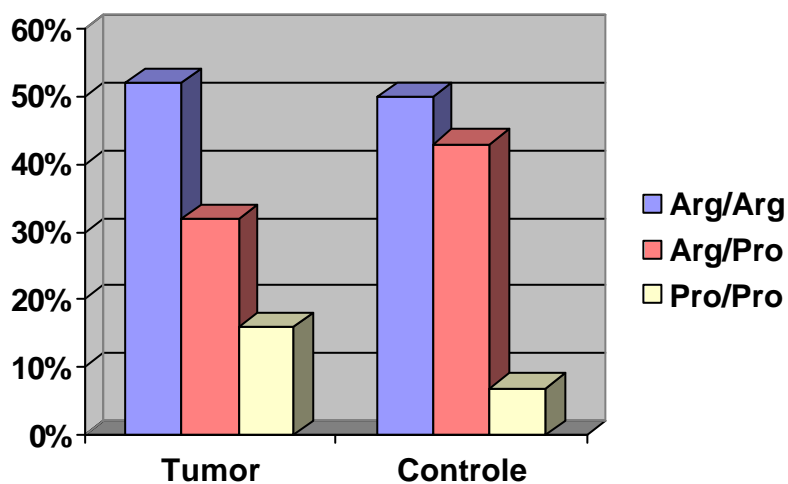


Figura 8. Frequência da distribuição dos genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro em 50 tumores e 142 controles.

Tabela 6. Distribuição dos genótipos em 50 tumores e 142 controles.

	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Total
Tumores	26 (52%)	16 (32%)	8 (16%)	50
Controles	71 (50%)	61 (43%)	10 (7%)	142
Total	97	77	18	192

Tabela 7. Distribuição dos alelos em 50 tumores e 142 controles.

	Arg	Pro	Total
Tumores	34 (68%)	16 (32%)	50
Controles	101,5 (71,5%)	40,5 (28,5%)	142

Tabela 8. Frequência de indivíduos com tumor e controle com pelo menos um alelo arginina (indivíduos Arg/Arg e Arg/Pro).

	Arg	Total
Tumores	42 (84%)	50
Controles	132 (93%)	142

Tabela 9. Frequência de indivíduos com tumor e controle com pelo menos um alelo prolina (indivíduos Pro/Pro e Arg/Pro).

	Pro	Total
Tumores	24 (48%)	50
Controles	68 (47,9%)	142

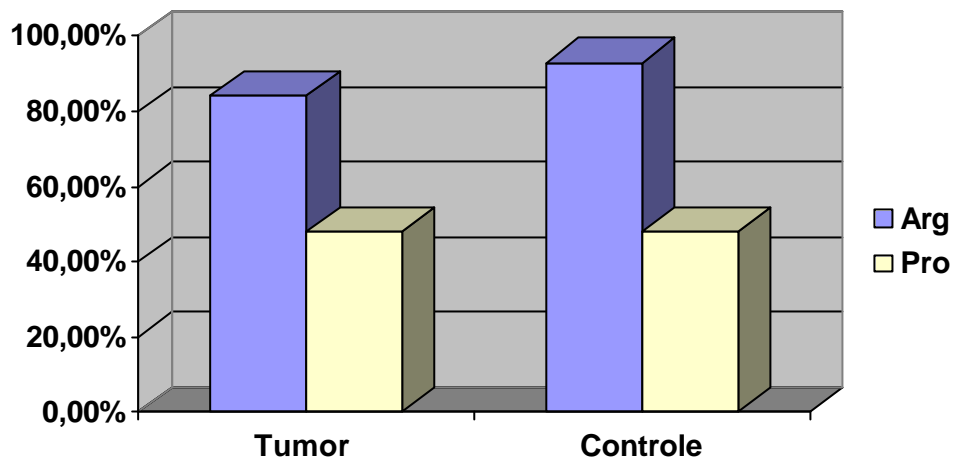


Figura 9. Frequência de indivíduos com os alelos Arg e Pro em 50 tumores e 142 controles.

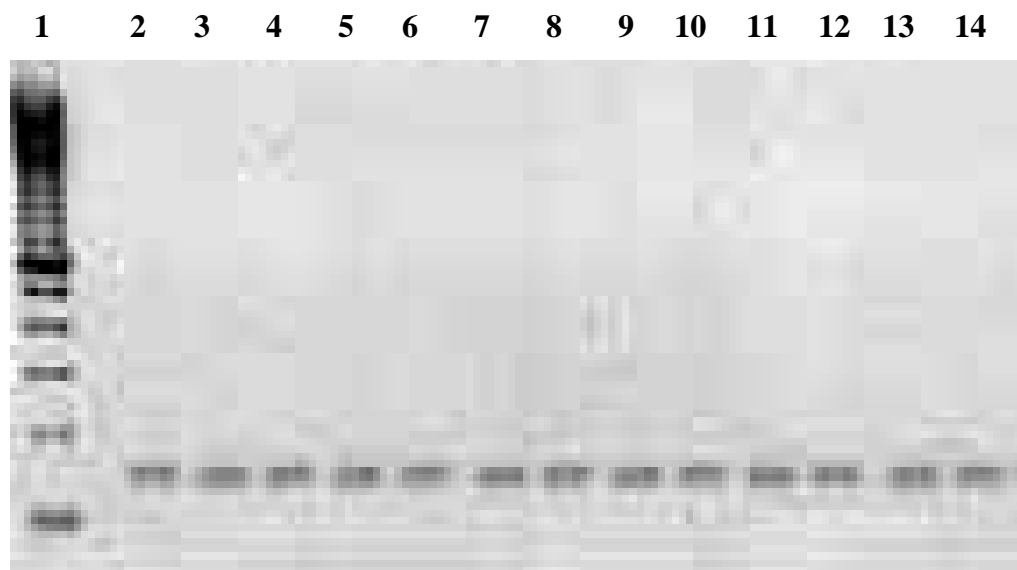


Figura 10. Fotografia do gel de agarose 2% mostrando resultado de amplificação da região L1 dos HPVs (150 pb) para amostras controles. Linha 1 – marcador 100bp, linhas 2 a 14 – HPV.

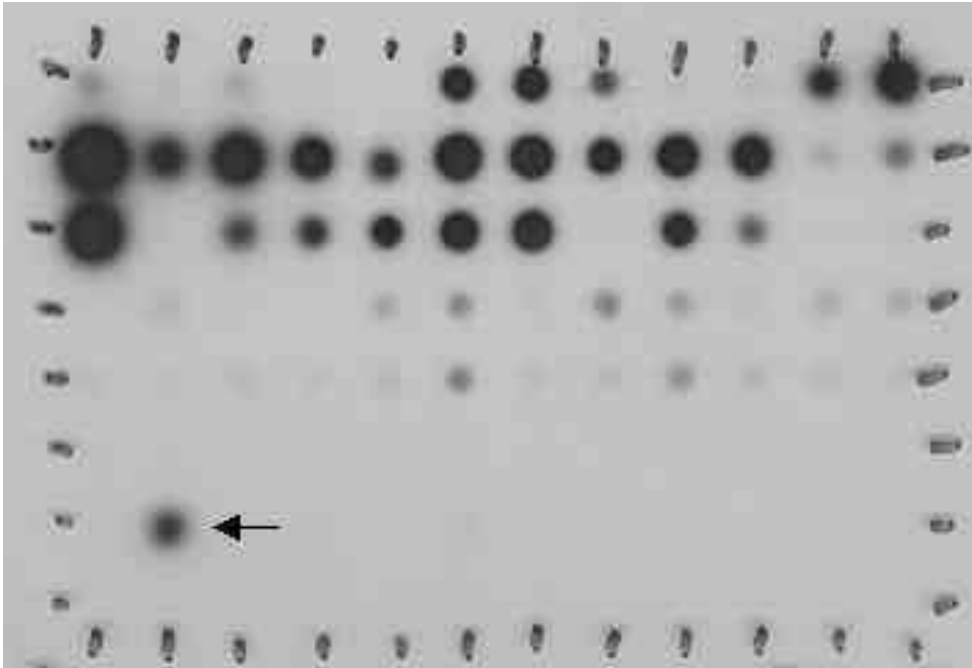


Figura 11. Autoradiograma da membrana após hibridização com sonda radioativa para HPV 16. A seta indica o controle positivo.

Tabela 10. Positividade para o DNA do HPV em 50 tumores e 142 controles.

HPV	
Tumores	8 (16%)
Controles	15 (10,6%)
Total	23

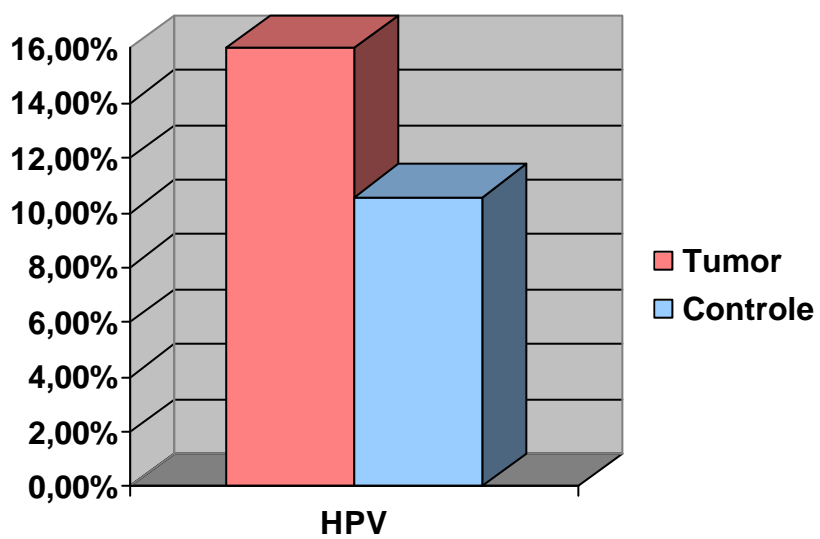


Figura 12. Frequência de amplificação para o vírus HPV em pacientes com tumores e indivíduos controles.

### Análise estatística

Para a análise dos resultados, foram utilizados tabelas de contingência e Testes de Qui-Quadrado, Teste de Fischer, Teste T e Teste de Proporção, com intervalo de confiança de 95% e Regressão Logística. Os valores de p foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

A primeira hipótese a ser testada foi a possível diferença entre as frequências genotípicas e alélicas entre os tumores e os controles. Entretanto, os grupos não mostraram diferença significativa quanto à frequência dos genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro ( $\chi^2 = 4,302$ ,  $p = 0,116$ ). Quando comparada a frequência de indivíduos de cada um dos grupos que apresentaram pelo menos um alelo Arg ou um alelo Pro, não houve evidências de que qualquer um dos dois alelos fosse mais frequente no grupo dos tumores ( $p = 0,945$  e  $p = 0,495$ , 95% IC).

Em relação às frequências de positividade para o HPV em pacientes e indivíduos controle, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p = 0,174$ , 95% IC). Na análise dos tipos de HPV encontrados, como o tipo 16 foi observado em 100% dos tumores positivos para o vírus e em 86,7% dos controles positivos, não houve diferença significativa entre esses achados ( $p = 0,121$ , 95% IC). Para avaliar quais fatores estão associados à presença do HPV, foram feitas análises considerando a totalidade dos indivíduos ( $n = 192$ ), independentemente de serem portadores de carcinomas ou controles. Nesse caso, não foi possível demonstrar qualquer relação da presença do HPV com idade ( $p = 0,30$ ), sexo ( $p = 0,607$ ), consumo de fumo ( $p = 0,215$ ) ou de álcool ( $p = 0,356$ ). A Tabela 11 mostra as frequências observadas para cada um desses fatores entre os indivíduos HPV negativos e os HPV positivos.

Os resultados acima mostram que não há diferença significativa entre o grupo dos tumores e o grupo dos controles quanto à frequência de genótipos, alelos, presença do HPV ou de um tipo específico do vírus. A presença do HPV, por sua vez, não foi associada à idade, sexo, consumo de tabaco ou álcool. Em função desses achados, as análises seguintes não separaram os pacientes dos controles.

Na análise entre as amostras HPV positivas e HPV negativas quanto à frequência genotípica, não houve diferença significativa quanto à frequência dos genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro ( $\chi^2 = 2,852$ ,  $p = 0,240$ ), apesar de não terem sido observados indivíduos tanto HPV positivos como Pro/Pro (Tabela 12 e Figura 13). Devido a esse fato, foi realizada a Análise de Dependência, que toma por cálculo as diferenças nas frequências de cada genótipo entre amostras HPV positivas e negativas. Como pode ser observado na Figura 14, os indivíduos Pro/Pro estão positivamente associados à ausência do HPV, com valor de p igual a 0,0097. Quando foi observada a distribuição dos alelos Arg e Pro entre as amostras HPV positivas e negativas, não houve diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,136$  e  $p = 0,504$ , 95% IC) (Tabelas 13, 14 e 15, Figura 15).

Esses resultados mostram que a presença do HPV não está associada a nenhum genótipo ou alelo, mas que a ausência do HPV está relacionada ao genótipo Pro/Pro.

Para calcular quais os fatores de risco para o desenvolvimento dos carcinomas de cabeça e pescoço, foram avaliados a idade, o sexo (sendo o sexo masculino o parâmetro escolhido, devido à maior prevalência de pacientes deste sexo), consumo de fumo, consumo de álcool, presença do HPV e o polimorfismo do códon 72 do gene *TP53*.

A análise de risco para tumor, considerando o genótipo Arg/Arg como referência, mostrou que a idade ( $p < 0,05$ , OR 1,07, 95% IC) e o fumo ( $p < 0,05$ , OR 16,16, 95% IC) são fatores importantes no processo neoplásico, especialmente o fumo, que apresenta um risco de até 16 vezes maior ao desenvolvimento dos carcinomas de cabeça e pescoço. Nenhum genótipo indicou valor significativo para risco ao tumor. O sexo masculino, apesar de ser mais freqüente nos pacientes, não apresentou risco ao seu desenvolvimento ( $p = 0,335$ ), assim como o HPV ( $p = 0,239$ ). O álcool mostrou um valor significativo para proteção ao tumor ( $p < 0,05$ , OR 0,29, 95% IC), ao contrário do esperado (Tabela 16) Devido ao inusitado fato da proteção do fator álcool, foi feita a mesma análise considerando-se os mesmos fatores acima mencionados, porém sem a presença do álcool. A idade ( $p < 0,05$ , OR 1,07, 95% IC) e o fumo ( $p < 0,05$ , OR 15,07, 95% IC) continuaram sendo fatores de risco e o genótipo Pro/Pro, por sua vez, mostrou uma tendência para risco maior de tumor, porém o valor observado não foi significativo ( $p = 0,072$ ). O sexo ( $p = 0,801$ ) e o HPV ( $p = 0,417$ ) continuaram com valores não significativos (Tabela 17).



Tabela 11. Ausência ou presença do HPV e sua relação com idade, sexo (F = feminino, M = masculino), consumo de fumo e álcool (N = negativo, P= positivo) nos indivíduos estudados.

HPV	Idade média (anos)	Sexo		Fumo		Álcool	
		F	M	N	P	N	P
HPV -	52,8	31,4%	68,6%	34,7%	62,3%	31,1%	68,9%
HPV +	55,6	26%	74%	21,7%	78,6%	21,7%	78,3%

Tabela 12. Distribuição dos genótipos na ausência ou presença do HPV nas amostras estudadas.

Genótipos HPV	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Total
HPV -	85 (50,3%)	66 (39%)	18 (10,7%)	169
HPV +	12 (52,2%)	11 (47,8%)	0	23
Total	97	77	18	192

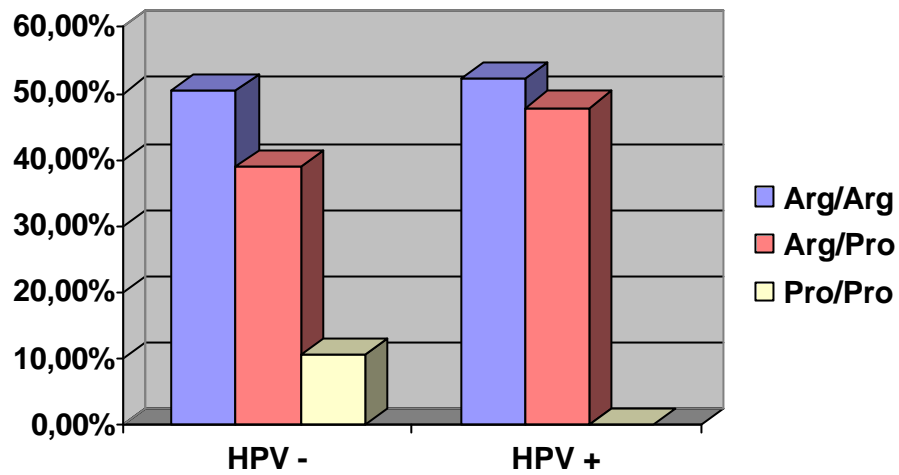


Figura 13. Frequência da distribuição dos genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro em 169 indivíduos HPV negativos e 23 indivíduos HPV positivos.

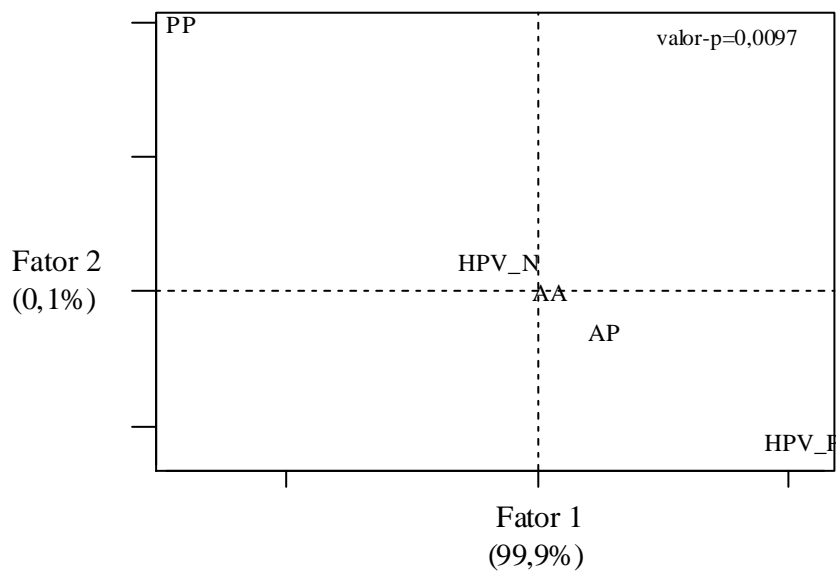


Figura 14. Gráfico da Análise de Dependência entre presença ou ausência do HPV (HPV\_P = HPV positivo, HPV\_N = HPV negativo) e genótipos (AA = Arg/Arg, AP = Arg/Pro, PP = Pro/Pro).

Tabela 13. Distribuição dos alelos arginina e prolina na ausência ou presença do HPV nas amostras estudadas.

	Arginina	Prolina	Total
HPV -	118 (69,8%)	51 (30,2%)	169
HPV +	17,5 (76%)	5,5 (24%)	23

Tabela 14. Frequência de indivíduos com pelo menos um alelo arginina (indivíduos Arg/Arg e Arg/Pro) na ausência ou presença do HPV nas amostras estudadas.

	Arginina	Total
HPV -	151 (89,3%)	169
HPV +	23 (100%)	23

Tabela 15. Frequência de indivíduos com pelo menos um alelo prolina (indivíduos Pro/Pro e Arg/Pro) na ausência ou presença do HPV nas amostras estudadas.

	Prolina	Total
HPV -	81 (47,9%)	169
HPV +	11 (47,8%)	23

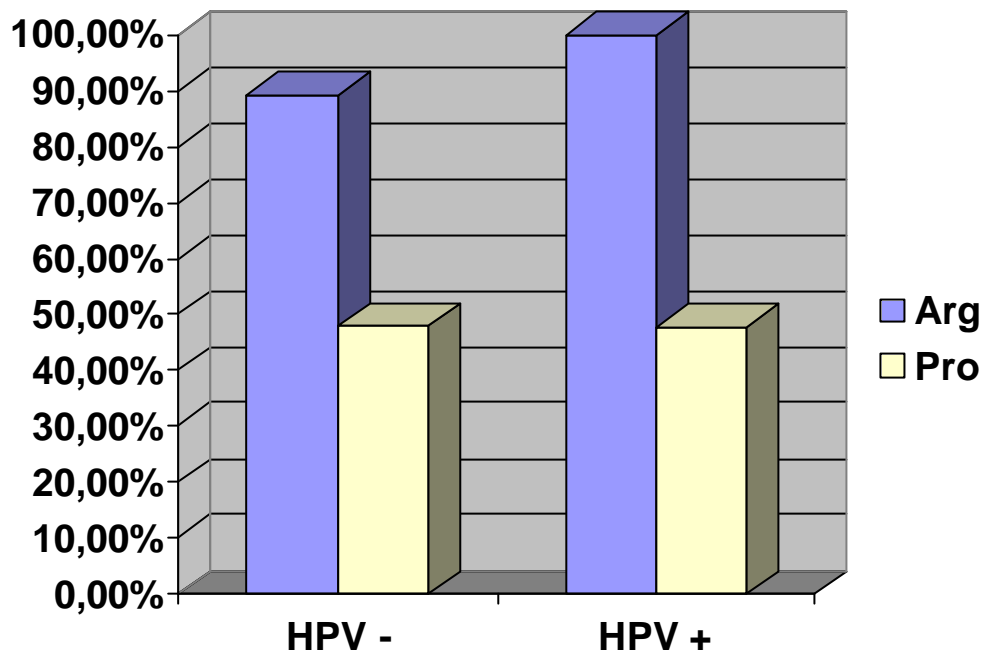


Figura 15. Frequência de indivíduos com os alelos Arg e Pro em 169 indivíduos HPV negativos e 23 indivíduos HPV positivos.

Com a finalidade de analisar o possível risco associado ao genótipo Pro/Pro em conjunto com os outros fatores, foi feita a avaliação do risco de tumor utilizando os parâmetros idade, sexo, fumo e genótipo, tendo o genótipo Pro/Pro como referência. Nesse caso, foi retirado o fator HPV pelo fato deste não contribuir para a predisposição ao carcinoma, como demonstrado acima. A idade ( $p < 0,05$ , OR 1,07, 95% IC) e o fumo ( $p < 0,05$ , OR 15,58, 95% IC) continuaram tendo valores significativos. O genótipo Arg/Pro mostrou-se um fator de proteção ao tumor ( $p < 0,05$ , OR 0,17, 95% IC) da mesma forma que o genótipo Arg/Arg revelou uma tendência, porém não significativa, de proteção ao carcinoma de cabeça e pescoço ( $p = 0,085$ , OR 0,32, 95% IC) (Tabela 18). A avaliação exclusiva da relação com a presença de tumor, sem o efeito dos outros fatores, também demonstrou o efeito protetor da heterozigose no códon 72 do gene *TP53* ( $p = 0,043$ , OR 0,33, 95% IC) (Tabela 19).

Para avaliar o efeito protetor do alelo Arginina, foi analisado o risco para o desenvolvimento do tumor considerando os fatores idade, sexo, consumo de fumo e alelo arginina. A idade ( $p < 0,05$ , OR 1,07, 95% IC) e o fumo ( $p < 0,05$ , OR 14,03, 95% IC) mostraram ser fatores de risco e o alelo arginina mostrou ser um fator de proteção ao tumor ( $p < 0,05$ , OR 0,25, 95% IC) (Tabela 20).

Os dados revelaram, portanto, que a idade e o fumo são fatores de risco para os carcinomas estudados, independentemente dos fatores analisados em conjunto. Por outro lado, o genótipo Arg/Pro, em relação aos indivíduos Pro/Pro, e o alelo arginina são fatores de proteção ao processo de tumorigênese de cabeça e pescoço.

Tabela 16. *Odds Ratio* (OR) dos fatores idade, sexo masculino, hábito tabagista, hábito etilista, presença do HPV e genótipo (AA = Arg/Arg, AP = Arg/Pro, PP= Pro/Pro) para desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço.

<b>Fatores</b>	<b>p</b>	<b>Odds Ratio (OR)</b>	<b>95% IC</b>
Idade	p < 0,05*	1,07	(1,03 - 1,11)
Sexo	p = 0,335	1,68	(0,59 - 4,78)
Fumo	p < 0,05*	16,16	(4,13 – 63,30)
Álcool	p < 0,05*	0,29	(0,12- 0,70)
HPV	p = 0,239	1,94	(0,64 - 5,83)
Genótipo AA		1,00 (referência)	
Genótipo AP	p = 0,096	0,48	(0,20 - 1,14)
Genótipo PP	p = 0,107	3,02	(0,79 - 11,54)

\* estatisticamente significativo

Tabela 17. *Odds Ratio* (OR) dos fatores idade, sexo masculino, hábito tabagista, presença do HPV e genótipo (AA = Arg/Arg, AP = Arg/Pro, PP= Pro/Pro) para desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço.

<b>Fatores</b>	<b>P</b>	<b>Odds Ratio (OR)</b>	<b>95% IC</b>
Idade	p < 0,05*	1,07	(1,04 - 1,11)
Sexo	p = 0,801	1,13	(0,43 – 3,01)
Fumo	p < 0,05*	15,07	(3,90 – 58,16)
HPV	p = 0,417	1,58	(0,52 - 4,75)
Genótipo AA		1,00 (referência)	
Genótipo AP	p = 0,118	0,51	(0,22 - 1,18)
Genótipo PP	p = 0,072	3,27	(0,90 - 11,87)

\* estatisticamente significativo

Tabela 18. *Odds Ratio* (OR) dos fatores idade, sexo masculino, hábito tabagista, e genótipo (AA = Arg/Arg, AP = Arg/Pro, PP= Pro/Pro) para desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço.

<b>Fatores</b>	<b>P</b>	<b>Odds Ratio (OR)</b>	<b>95% IC</b>
Idade	p < 0,05*	1,07	(1,04 - 1,11)
Sexo	p = 0,805	1,13	(0,43 – 2,99)
Fumo	p < 0,05*	15,58	(4,03 – 60,22)
Genótipo PP		1,00 (referência)	
Genótipo AP	p < 0,05*	0,17	(0,04 - 0,66)
Genótipo AA	p = 0,085	0,32	(0,09 - 1,17)

\* estatisticamente significativo

Tabela 19. *Odds Ratio* (OR) do fator genótipo (AA = Arg/Arg, AP = Arg/Pro, PP= Pro/Pro) para desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço.

<b>Fator</b>	<b>p</b>	<b>Odds Ratio (OR)</b>	<b>95% IC</b>
Genótipo PP		1,00 (referência)	
Genótipo AP	p < 0,05*	0,33	(0,11 - 0,97)
Genótipo AA	p = 0,138	0,46	(0,16 - 1,29)

\* estatisticamente significativo

Tabela 20. *Odds Ratio* (OR) dos fatores idade, sexo masculino, hábito tabagista, e alelo arginina para desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço.

<b>Fatores</b>	<b>p</b>	<b>Odds Ratio (OR)</b>	<b>95% IC</b>
Idade	p < 0,05*	1,07	(1,04 - 1,11)
Sexo	p = 0,643	1,25	(0,48 – 3,26)
Fumo	p < 0,05*	14,03	(3,64 – 54,07)
Alelo Arginina	p < 0,05*	0,25	(0,07 – 0,86)

• estatisticamente significativo

## ***5. Discussão***



## 5. DISCUSSÃO

O papilomavírus humano (HPV) é considerado o agente etiológico das neoplasias anogenitais, especialmente os carcinomas cervicais. Os HPVs 16 e 18 são observados em até 80% desses tumores e são capazes de induzir a transformação maligna da mucosa devido à interação de duas oncoproteínas virais (E6 e E7) a proteínas regulatórias do ciclo celular do hospedeiro. A proteína E7 interage fisicamente com a pRb levando à sua fosforilação e conseqüente liberação do fator de transcrição E2F. Já a proteína E6 é capaz de promover a degradação da p53, levando à ausência de inibição do ciclo celular (Scheffner et al., 1990; Nebesio et al., 2001). Existem também evidências de uma relação entre HPVs e carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço. A transmissão do vírus para essa região anatômica ocorre, provavelmente, via trato genital materno durante o nascimento, por auto-inoculação a partir da região genital ou por contato das mucosas oral e genital entre parceiros sexuais. O HPV penetra via lesões da mucosa e infecta inicialmente os queratinócitos basais, porém sua replicação é restrita à camada superior do epitélio (Sugerman et al., 1997; Chan et al., 2002).

O presente estudo investigou a presença do DNA do HPV e o polimorfismo no códon 72 do exon 4 do gene *TP53* em tumores malignos de cabeça e pescoço e também em mucosa oral de indivíduos presumidamente saudáveis, tanto fumantes como não fumantes.

Neste trabalho, foram analisados 50 casos de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, sendo os homens mais afetados por lesões malignas. Esse achado deve refletir o fato do abuso do fumo e do álcool ser mais comum no sexo masculino (Califano et al., 1996). Nesse grupo, foi detectada uma freqüência de 16% de HPV. Os valores encontrados estão de acordo com aqueles observados na maioria dos trabalhos, que citam a presença do vírus em 3,4% a 47% das lesões malignas de cabeça e pescoço. O HPV 16 é o tipo mais freqüente, identificado em até 90% dos casos (Scholes et al., 1997; Takano et al., 1997; Koh et al., 1998; McKaig et al., 1998; Miguel et al., 1998; Riethdorf et al., 1998; Lindeberg et al., 1999; Badaracco et al., 2000; Gillison et al., 2000; Sand et al., 2000; Sisk et al., 2000; van Houten et al., 2000; Venuti et al., 2000; Klussmann et al., 2001, Scully, 2002, Strome et al., 2002). No presente trabalho, o HPV 16 foi encontrado em todos os tumores infectados. Esse fato deve-se, provavelmente, ao pequeno número de amostras tumorais positivas para o HPV (n = 8; 16%), o que

poderia estar subestimando a presença de outros tipos virais. Todos os pacientes positivos para o vírus referiram consumo de tabaco e apenas um destes não referiu consumo de álcool. A região mais afetada pela infecção viral foi a laringe (50%), seguida pela orofaringe (37,5%). Esses valores estão próximos aos citados pela literatura, já que a ocorrência do HPV na orofaringe é de até 45%, e na laringe, entre 20 e 48% (Gillison et al., 2000; Smith et al., 2000; Klusmann et al., 2001; Miller et al., 2001; Morshed et al., 2001; Jacob et al., 2002; Nagpal et al., 2002; Strome et al., 2002). Porém, o HPV não foi encontrado nas amostras de tonsila, que, segundo dados recentes, é o local preferencial da infecção na orofaringe. Isto pode ser reflexo do pequeno número de amostras de carcinomas tonsilares ( $n = 2$ ), além da baixa taxa de HPV encontrada nos tumores estudados.

Entre os indivíduos controle, 10,6% apresentaram HPV. Os dados da literatura para grupo controle variam muito, com taxas mais frequentes entre 5 e 20%. O HPV 16 foi encontrado em 86,7% das amostras de controles positivas. Apenas duas amostras apresentaram outros tipos de HPV, sendo uma infectada por HPVs de alto risco (HPV 51/45) e outra por HPVs de baixo risco (HPV 6/11). Os trabalhos indicam uma prevalência dos HPVs dos tipos 16 e 18 nas amostras de indivíduos saudáveis, porém outros tipos também são encontrados (Sugerman et al., 1997; McKaig et al., 1998; Terai et al., 1999; Smith et al., 2000; Miller et al., 2001; Mork et al., 2001; Summersgill et al., 2001; Giovannelli et al., 2002; Strome et al., 2002).

As análises estatísticas não mostraram diferença significativa entre amostras tumorais e controles quanto à frequência do HPV, independentemente do tipo ( $p = 0,174$ , 95% IC). Assim como Badaracco et al. (2000), não foi encontrada associação entre a presença do HPV e a idade, o sexo, o consumo de fumo e o de álcool. No presente estudo, o principal fator de risco foi o fumo, com um risco estimado em até 15 vezes, valor esse superior ao encontrado para a presença de HPV. Esse achado sugere que os carcinógenos químicos encontrados no cigarro são mais importantes que a infecção pelo HPV na tumorigênese de cabeça e pescoço (Badaracco et al., 2000).

O gene *TP53* apresenta pelo menos 10 polimorfismos distintos, localizados nas suas regiões codificadoras (códon 21, 36, 47, 72, 213) e não codificadoras (intron 1, 3, 6, 7) (Weston et al., 1997). O códon 72 está localizado na região amino-terminal, mais especificamente no domínio SH3, que é rico em prolina. A substituição de uma citosina por uma guanina promove a troca do

aminoácido prolina pela arginina, o que altera estruturalmente a proteína, porém não altera sua atividade biológica (Matlashewski et al., 1987). Estudos em diferentes grupos étnicos relataram maior frequência do alelo prolina em negros e do alelo arginina em caucasóides, ou seja, a prevalência do alelo prolina está relacionada à latitude e aumenta na aproximação com o Equador (Beckman et al., 1994; Humbey et al., 2002).

Storey et al. (1998) relataram que a variante arginina é mais susceptível à degradação pela interação com a proteína E6 dos HPVs de alto risco e que mulheres portadoras do genótipo Arg/Arg têm um risco sete vezes maior de desenvolver o carcinoma cervical associado ao HPV que as heterozigotas ou homozigotas para prolina. Outros autores encontraram essa relação entre mulheres Arg/Arg e maior risco para carcinomas cervicais, porém esse risco não foi tão alto quanto aquele encontrado por Storey et al. (1998) (Agorastos et al., 2000; Makni et al., 2000; Zehbe et al., 2001). Entretanto, vários trabalhos foram publicados com resultados contrários em diversas populações compostas por grupos étnicos distintos, o que não permite uma conclusão definitiva sobre o valor do risco em homozigotos para arginina (Helland et al., 1998; Josefsson et al., 1998; Minaguchi et al., 1998; Klaes et al., 1999; Madeleine et al., 1999; Muñoz et al., 1999; Riou et al., 1999; Nishikawa et al., 2000; Gustafsson et al., 2001; Klug et al., 2001).

Em tumores de cabeça e pescoço, os dados são escassos e conflitantes, com trabalhos que relatam desde a não associação desse polimorfismo e do HPV com a tumorigênese (Summersgill et al., 2000), até trabalhos que mostram associação positiva de homozigotos arginina à infecção pelo HPV e ao processo neoplásico em carcinomas orais (Nagpal et al., 2002).

Na população de estudo do presente trabalho, não houve diferença estatística na frequência dos genótipos ( $p = 0,116$ ) ou dos alelos Arg e Pro ( $p = 0,945$  e  $p = 0,495$ ) entre os pacientes com tumor e os indivíduos controles, indicando que nenhum dos três genótipos e nenhum dos dois alelos é mais frequente em um dos grupos. O mesmo foi citado em alguns trabalhos sobre carcinomas cervicais e também sobre carcinomas orais (Minaguchi et al., 1998; Nishikawa et al., 2000; Summersgill et al., 2000; Gustafsson et al., 2001; Humbey et al., 2002).

Na análise de risco ao desenvolvimento dos tumores de cabeça e pescoço, a idade e o fumo mostraram ser características que predizem a tumorigênese na presença de quaisquer fatores analisados em conjunto. O valor de

risco para o fumo variou de 14,03 a 16,16, dependendo das variáveis analisadas no momento. A proteção significativa ao tumor relativa ao consumo de álcool pode ser explicada pelo alto número de indivíduos controle que confirmou o hábito etilista, ao contrário do grupo dos pacientes com tumor. Porém, deve ser salientado que o número de doses semanais consumidas pelos indivíduos controle foi baixo (em torno de 10 doses/semana). Nos portadores de tumor, quando ocorreu o consumo, a quantidade de álcool ingerida diariamente foi muito superior aos valores semanais do grupo controle (dados não demonstrados). Quanto aos genótipos, os indivíduos Arg/Pro apresentaram um efeito protetor em relação àqueles Pro/Pro, independentemente de estarem em conjunto com outros fatores (OR 0,17) ou sozinhos (OR 0,33). O genótipo Arg/Arg, em relação a Pro/Pro, tende a ser um fator de proteção, ao contrário de Pro/Pro em relação a Arg/Arg que tende a indicar um risco maior ao tumor. Esses achados estão de acordo com estudos recentes em carcinomas nasofaríngeos e de estômago, que encontraram um maior risco de tumor em portadores do genótipo Pro/Pro em relação a Arg/Pro e Arg/Arg (Hiyama et al., 2002; Tsai et al., 2002; Zhang et al., 2002). O estudo do alelo arginina em associação com outros fatores mostrou o efeito protetor do alelo, com *odds ratio* de 0,25. A possível proteção do alelo arginina também foi encontrada em um estudo de tumores de pulmão (Biros et al., 2001). O resultado não significativo de proteção do genótipo Arg/Arg, encontrado neste trabalho, pode estar relacionado ao pequeno número de tumores homocigotos para a arginina.

Na comparação dos indivíduos HPV positivos com negativos em relação às frequências dos alelos Arg e Pro, não foi observada diferença significativa entre dos grupos ( $p = 0,136$  e  $p = 0,504$ ). Portanto, a presença do vírus não está positivamente associada a nenhum dos dois alelos nos indivíduos estudados. Na análise dos genótipos, a presença do HPV não foi relacionada a nenhum dos genótipos do códon 72 do gene *TP53* ( $p = 0,240$ ), o que está de acordo com os dados de Summersgill et al. (2000) e Humbey et al. (2002). A perda de heterozigosidade (LOH) no gene *TP53* poderia ser uma justificativa para explicar a ausência de associação do polimorfismo do códon 72 com a presença do HPV, mas Humbey et al. (2002) alertam para o fato de que a perda de heterozigosidade do gene *TP53* não interfere na ausência de associação do polimorfismo com o HPV, pois a mistura de células normais e tumorais na peça cirúrgica permite a detecção de ambos os alelos do genótipo de *TP53*.

Um dado muito interessante deste trabalho é que a ausência do HPV está positivamente relacionada aos indivíduos Pro/Pro ( $p = 0,0097$ ). Assim, os homozigotos para prolina estariam relativamente em menor risco de infecção pelo HPV em relação aos heterozigotos Arg/Pro e homozigotos Arg/Arg.

Em conclusão, os dados do presente trabalho indicam que a homozigose para o alelo prolina, ao contrário da homozigose para arginina, tende a ser um fator de risco ao desenvolvimento dos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço. O genótipo Arg/Pro e o alelo arginina, por sua vez, são fatores de proteção significativos. A infecção pelo HPV não representa um fator de risco, ao contrário da idade e do fumo, que apresenta um risco extremamente alto. Os indivíduos Pro/Pro, apesar de estarem associados a maior risco para tumores, estão significativamente menos associados à presença do HPV.

## ***6. Conclusões***

## 6. CONCLUSÕES

### Em relação à casuística:

A frequência de fumantes entre os portadores de carcinomas de cabeça e pescoço foi maior que a de etilistas neste mesmo grupo. A frequência de fumantes entre os portadores de carcinomas de cabeça e pescoço foi maior que entre os indivíduos controle. Esses achados reforçam a idéia bem estabelecida de que o fumo, mais do que o álcool, aumenta o risco de malignização do trato aerodigestivo superior.

Os homens foram mais frequentemente afetados pelos carcinomas de cabeça e pescoço, indicando que o sexo masculino está mais exposto aos agentes que levam ao processo neoplásico.

### Em relação à presença do HPV:

A frequência do HPV em portadores de carcinomas de cabeça e pescoço é semelhante à frequência encontrada em indivíduos controle, independentemente do HPV ser de alto ou baixo risco.

A presença do HPV independe da idade, do sexo, do consumo de fumo ou de álcool em quaisquer indivíduos.

### Em relação ao polimorfismo no códon 72 do gene *TP53*:

A frequência dos genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro é semelhante entre os portadores de carcinomas de cabeça e pescoço e indivíduos controle.

A frequência dos alelos arginina e prolina é semelhante entre os portadores de carcinomas de cabeça e pescoço e indivíduos controle.

As frequências dos genótipos Arg/Arg e Arg/Pro é semelhante entre os indivíduos positivos para o HPV e os indivíduos negativos para o HPV.

As frequências dos alelos arginina e prolina é semelhante entre os indivíduos positivos para o HPV e os indivíduos negativos para o HPV.

Os indivíduos Pro/Pro estão positivamente associados à ausência do HPV.

### Em relação ao risco para o desenvolvimento dos carcinomas de cabeça e pescoço:

A idade e o tabagismo são fatores de risco ao desenvolvimento dos carcinomas de cabeça e pescoço.

O sexo masculino, apesar de ser frequentemente afetado, e a presença do HPV não são fatores de risco aos carcinomas de cabeça e pescoço.

Os indivíduos Pro/Pro apresentam uma tendência a risco ao desenvolvimento dos carcinomas de cabeça e pescoço.

Os indivíduos Arg/Arg apresentam uma tendência a proteção ao desenvolvimento dos carcinomas de cabeça e pescoço.

Os indivíduos Arg/Pro apresentam um efeito protetor ao desenvolvimento dos carcinomas de cabeça e pescoço.

O alelo arginina, somado aos outros fatores de risco, apresenta um efeito protetor ao desenvolvimento dos carcinomas de cabeça e pescoço.



## ***7.Referências bibliográficas***

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGELOPOULOU, E. P.; SKARLOS, D.; PAPADIMITRIOU, C.; KITTAS, C.; TROUNGOS, C. Human papilloma virus DNA detection in oral lesions in Greek population. *Anticancer Res.*, v. 19, p. 1391-5, 1999.
- AGORASTOS, T.; LAMBROPOULOS, A. F.; CONSTANTINIDIS, T. C.; KOTSIS, A.; BONTIS, J. N. p53 codon 72 polymorphism and risk of intra-epithelial and invasive cervical neoplasia in Greek women. *Eur J Cancer Prev*, v. 9, no. 2, p. 113-8, 2000.
- ALMADORI, G.; CADONI, G.; CATTANI, P.; POSTERARO, P.; SCARANO, E.; OTTAVIANI, F.; PALUDETTI, G.; MAURIZI, M. Detection of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinoma by polymerase chain reaction. *Eur J Cancer*, v. 32A, no. 5, p. 783-8, 1996.
- ANDERSSON, S.; RYLANDER, E.; LARSSON, B.; STRAND, A.; SILFVERSVÄRD, C.; WILANDER, E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *Euro J Cancer*, v. 37, p.246-50, 2001.
- ANDERSSON, S.; RYLANDER, E.; STRAND, A.; SALLSTROM, J.; WILANDER, E. The significance of p53 codon 72 polymorphism for the development of cervical adenocarcinomas. *Br J Cancer*, v. 85, no. 8, p. 1153-6, 2001.
- BAKER, C. C.; HOWLEY, P. M. Differential promoter utilization by the papillomavirus in transformed cells and productively infected warts tissues. *Embo J.*, v. 6, p. 1027-35, 1987
- BADARACCO, G.; VENUTI, A.; MORELLO, R.; MULLER, A.; MARCANTE, M. L. Human Papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. *Anticancer Research*, v. 20, no. 28, p. 1301-05, 2000.
- BECKMAN, G.; BIRGANDER, R.; SJALANDER, A.; SAHA, N.; HOLMBERG, P. A.; KIVELA, A.; BECKMAN, L. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered*, v. 44, no. 5, p. 266-70, 1994.
- BERNARD, H. U.; CHAN, S. Y.; MANOS, M. M.; ONG, C. K.; VILLA, L. L.; DELIUS, H.; PEYTON, C. L.; BAUER, H. M.; WHEELER, C. M. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, as phylogenetic algorithms. *J Infect Dis.*, v. 170, p. 1077-85, 1994.
- BIROS, E; KALINA, I.; BIROS, I.; KOHUT, A.; BOGYIOVA, E.; SALAGOVIC, J.; STUBNA, J. Polymorphism of the p53 gene within the codon 72 in lung cancer patients. *Neoplasma*, v. 48, no. 5, p. 407-11, 2001.
- BOSCH, F. X.; ROHAN, T.; SCHNEIDER, A.; FRAZER, I.; PFISTER, H.; CASTELLSAGUE, X.; DE SANJOSE, S.; MORENO, V.; PUIG-TINTORE, L. M.; SMITH, P. G.; MUNOZ, N.; ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *J Clin Pathol.*, v. 54, p. 163-75,2001.
- CALIFANO, J.; VAN DER RIET, P.; WESTRA, W.; NAWROZ, H.; CLAYMAN, G.; PIANTADOSI, S.; CORIO, R.; LEE, D.; GREENBERG, B.; KOCH, W.; SIDRANSKY, D.

- Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.*, v. 56, no. 11, p. 2488-92, 1996.
- CAO, J.; ZHANG, Z. Y.; ZHANG, Y. X.; CHEN, W. T. Human papillomavirus infection and p53 alteration in oral squamous cell carcinoma. *Chin J Dent Res.*, v. 3, no. 3, p. 44-9, 2000.
- CHAN, W. K.; KLOCK, G.; BERNARD, H. V. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol*, v. 63, p. 3261-9, 1989.
- CHAN, H. M.; SMITH, L.; LA THANGUE, N. B. Role of LXCXE motif-dependent interactions in the activity of the retinoblastoma protein. *Oncogene*, v. 20, p. 6152-63, 2001.
- CHAN, P. K.; CHANG, A. R.; CHEUNG, J. L.; CHAN, D. P.; XU, L. Y.; TANG, N. L.; CHENG, A. F. Determinants of cervical human papillomavirus infection: differences between high- and low-oncogenic risk types. *J Infect Dis.*, v. 185, no. 1, p.28-35, 2002.
- CHAOUKI, N.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N.; MEYER, C. J. L. M.; GUEDDARI, B. E.; GHAZI, A. E.; DEACON, J.; CATELLSAGUÉ, X.; WALBOOMERS, J. M. M. The viral origin of cervical cancer in Rabat, Morocco. *Int J Cancer*, v. 75, p. 546-54, 1998.
- CHEAH, P. L.; LOOI, L. M. Biology and pathological associations of the human papillomaviruses: a review. *Malays J Pathol.*, v. 20, no. 1, p.1-10, 1998.
- CHEN, C. A.; CHEN, T. M.; WU, C. C.; CHANG, C. F.; HSIEH, C. Y. Human papillomavirus DNA and p53 status in stage IB bulky cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, v. 120, no. 11, p. 678-82, 1994.
- CROOK, T.; WREDE, D.; VOUSDEN, K. H. p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene*, v. 6, p. 873-75, 1991
- DONG, W. L.; CALDEIRA, S.; SEHR, P.; PAWLITA, M.; TOMMASINO, M. Determination of the binding affinity of different human papillomavirus E7 proteins for the tumour suppressor pRb by a plate-binding assay. *J Virol Methods*, v. 98, no. 1, p. 91-8, 2001.
- DURST, M.; KLEINHEINZ, A.; HOLTZ, M.; GISSMAN, L. The physical state of human papillomavirus type 16 in benign and malignant genital tumors. *J Gen Virol.*, v. 66, p. 1515-22, 1985.
- ELAMIN, F.; STEINGRIMSDOTTIR, H.; WANAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N.; TAVASSOLI, M. Prevalence of human papillomavirus infection in premalignant and malignant lesions of the oral cavity in U.K. subjects: a novel method of detection. *Oral Oncol.*, v. 34, p. 191-7, 1998.
- FERENCZY, A.; FRANCO, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *The Lancet*, v. 3, p. 11-16, 2002.
- FLAITZ, C. M.; HICKS, M. J. Molecular piracy: the viral link to carcinogenesis. *Oral Oncol.*, v. 34, p. 448-53, 1998.
- FRANCESCHI, S.; MUÑOZ, N.; SNIJDERS, P. J. How strong and how wide is the link between HPV and oropharyngeal cancer? *Lancet*, v. 356, no. 9233, p. 871-2, 2000.

FRIESLAND, S.; MELLIN, H.; MUNCK-WIKLAND, E.; NILSSON, A.; LINDHOLM, J.; DALIANIS, T.; LEWENSOHN, R. Human papilloma virus (HPV) and p53 immunostaining in advanced tonsillar carcinoma--relation to radiotherapy response and survival. *Anticancer Res.*, v. 21, no. 1B, p. 529-34, 2001.

GALLO, O.; SANTORO, R.; LENZI, S.; BODDI, V.; GIOVANNUCCI-UZIELLI, M. L. Increased mutagen-induced chromosome damage in patients with transformed laryngeal pre-cancerosis. *Int. J. Cancer*, v. 68, p. 700-3, 1996.

GILLISON, M. L.; KOCH, W. M.; CAPONE, R. B.; SPAFFORD, M.; WESTRA, W. H.; WU, L.; ZAHURAK, M. L.; DANIEL, R. W.; VIGLIONE, M.; SYMER, D. E.; SHAH, K. V.; SIDRANSKY, D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Nat Cancer Institute*, v. 92, no. 9, p. 709-20, 2000.

GILLISON, M. L.; SHAH, K. V. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol.*, v. 13, no. 3, p. 183-8, 2001.

GIOVANNELLI, L.; CAMPISI, G.; LAMA, A.; GIAMBALVO, O.; OSBORN, J.; MARGIOTTA, V.; AMMATUNA, P. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *J Infect Dis.*, v. 185, no. 6, p. 833-6, 2002.

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. Review. *Cancer Res*, v. 54, p. 4855-78, 1994.

GOGUSEV, J.; LESEC, G.; GOGUSEV, P.; MONDIE, J. Y.; PEYROT, J.; JOURDE, J. Papilloma viruses: group-specific antigens within lesions of the oral mucosa. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*, v. 87, no. 1, p. 14-24, 1986.

GOSTOUT, B. S.; STROME, S. E.; CLAYTON, A. C.; MCGOVERN, R. M.; OLSEN, K. D.; WEBB, M. J. Two cases of coincident carcinomas of the head and neck and the uterine cervix. *Gynecol Oncol*, v. 85, no. 2, p. 376-80, 2002.

GUSTAFSSON, A. C.; GUO, Z.; HU, X.; AHMADIAN, A.; BODIN, B.; NILSSON, A.; PONTÉN, J.; PONTÉN, F.; LUNDEBERG, J. HPV-related cancer susceptibility and p53 codon 72 polymorphism. *Acta Derm Venereol.*, v. 81, p. 125-9, 2001.

HELIN, K.; HARLOW, E. The retinoblastoma protein as a transcriptional repressor. *Trends Cell Biol.*, v. 3, p. 43, 1993.

HELLAND, A.; LANGEROD, A.; JOHNSEN, H.; OLSEN, A. O.; SKOVLUND, E.; BORRESEN-DALE, A. L. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature*, v. 396, no. 6711, p. 530-1, 1998.

HIYAMA, T.; TANAKA, S.; KITADAI, Y.; ITO, M.; SUMII, M.; YOSHIHARA, M.; SHIMAMOTO, F.; HARUMA, K.; CHAYAMA, K. p53 codon 72 polymorphism in gastric cancer susceptibility in patients with Helicobacter pylori-associated chronic gastritis. *Int J Cancer*, v. 100, no. 3, p. 304-8, 2002.

HOFFMANN, M.; KAHN, T.; MAHNKE, C. G.; GOEROEGH, T.; LIPPERT, B. M.; WERNER, J. A. Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the head and neck

- determined by polymerase chain reaction and Southern blot hybridization: proposal for optimized diagnostic requirements. *Acta Otolaryngol.*, v. 118, p. 138-44, 1998.
- VAN HOUTEN, V. M.; SNIJDERS, P. J.; VAN DEN BREKEL, M. W.; KUMMER, J. A.; MEIJER, C. J.; VAN LEEUWEN, B.; DENKERS, F.; SMEELE, L. E.; SNOW, G. B.; BRAKENHOFF, R. H. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*, v. 93, no. 2, p. 232-5, 2001.
- HOWLEY, P. Papillomavirinae and their replication IN: *Fundamental Virology*, 2<sup>nd</sup> edition, New York. Raven Press, p. 734-68, 1991.
- HOWLEY, P. M. Papillomavirinae: the viruses and their replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. *Fundamental Virology*, 3<sup>th</sup> edition. Philadelphia; Lippincott-Raven, v. 2, p. 2045-109, 1996.
- HUMBEY, O.; AUBIN, F.; REMONNAY, S. C.; RIETHMULLER, D.; PRETET, J. L.; FEST, T.; SEILLES, E.; MOUGIN, C. TP53 polymorphism at exon 4 in caucasian women from eastern France: lack of correlation with HPV staus and grade of cervical precancerous lesions. *Europ J Obst Gynecol.*, v. 103, p. 60-4, 2002.
- DE RODA HUSMAN, A. M.; WALBOOMERS, J. M.; VAN DER BRULE, A. J.; MEIJER, C. J.; SNIJDERS, P. J. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserve sequences improve human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*, v. 76, p. 1057-62, 1995.
- JACOB, S. E.; SREEVIDYA, S.; CHACKO, E.; PILLAI, M. R. Cellular manifestations of human papillomavirus infection in laryngeal tissues. *J Surg Oncol.*, v. 79, no. 3, p. 142-50, 2002.
- JIKO, K.; TSUDA, H.; SATO, S.; HIROHASHI, S. Pathogenetic significance of p53 and eKi-ras gene mutations and human papillomavirus DNA integration in adenocarcinoma of the uterine cervix and uterine isthmus. *Int J Cancer*, v. 59, p. 601-6, 1994.
- JOSEFSSON, A. M.; MAGNUSSON, P. K.; YLITALO, N.; QUARFORTH-TUBBIN, P.; PONTEN, J.; ADAMI, H. O.; GYLLENSTEN, U. B. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature*, v. 396, no. 6711, p. 531, 1998.
- JOSEFSSON, A. M.; MAGNUSSON, P. K. E.; YLITALO, N.; SORENSEN, P.; TUBBIN, P. Q.; ANDERSEN, P. K.; MELBYE, M.; ADAMI, H. O.; GYLLENSTEN, U. B. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*, v. 355, p. 2189-93, 2000.
- KAYA, H.; KOTILOGLU, E.; INANLI, S.; EKICIOGLU, G.; BOZKURT, S. U.; TUTKUN, A.; KULLU, S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in larynx and lung carcinomas. *Pathologica*, v. 93, no.5, p. 531-4, 2001.
- KIM, H. J.; SONG, E. S.; HWANG, T. S. Higher incidence of p53 mutation in cervical carcinomas with intermediate-risk HPV infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, v. 98, no. 2, p. 213-8, 2001.
- KJELLBERG, L.; HALLMANS, G.; AHREN, A. M.; JOHANSSON, R.; BERGMAN, F.; WADELL, G.; ANGSTROM, T.; DILLNER, J. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive

- use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer*, v. 82, no. 7, p. 1332-8, 2000.
- KLAES, R.; RIDDER, R.; SCHAEFER, U.; BENNER, A.; DOEBERITZ, M. K. No evidence for p53 allele-specific predisposition in human papillomavirus-associated cervical cancer. *J Mol Med*, v. 77, p. 299-302, 1999.
- KLUG, S. J.; WILMOTTE, R.; SANTOS, C.; ALMONTE, M.; HERRERO, R.; GUERRERO, I.; CACERES, E.; PEIXOTO-GUIMARAES, D.; LENOIR, G.; HAINAUT, P.; WALBOOMERS, J. M.; MUÑOZ, N. TP53 polymorphism, HPV infection, and risk of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, v. 10, no. 9, p. 1009-12, 2001.
- KLUSSMANN, J. P.; WEISSENBORN, S. J.; WIELAND, U.; DRIES, V.; KOLLIGS, J.; JUNGEHUELSING, M.; ECKEL, H. E.; DIENES, H. P.; PFISTER, H. J.; FUCHS, P. G. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer*, v. 92, no. 11, p. 2875-84, 2001.
- KOH, J. Y.; CHO, N. P.; KONG, G.; LEE, J. D.; YOON, K. p53 mutations and human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma: correlation with apoptosis. *Br J Cancer*, v. 78, no. 3, p. 354-9, 1998.
- LANDIS, S. H.; MURRAY, T.; BOLDEN, S.; WINGO, P. A. Cancer statistics. *CA: Cancer J. Clin.*, v. 48, p. 6-29, 1998.
- LINDEL, K.; BEER, K. T.; LAISSUE, J.; GREINER, R. H.; AEBERSOLD, D. M. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer*, v. 92, no. 4, p. 805-13, 2001.
- LINDEBERG, H.; KROGDAHL, A. Laryngeal cancer and human papillomavirus: HPV is absent in the majority of laryngeal carcinomas. *Cancer Lett*, v. 146, no. 1, p. 9-13, 1999.
- LONING, T.; IKENBERG, H.; BECKER, J.; GISSMANN, L.; HOEPFER, I.; ZUR HAUSEN, H. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J Invest Dermatol.*, v. 84, no. 5, p. 417-20, 1985.
- LONING, T.; MEICHSNER, M.; MILDE-LANGOSCH, K.; HINZE, H.; ORLT, I.; HORMANN, K.; SESTERHENN, K.; BECKER, J.; REICHART, P. HPV DNA detection in tumours of the head and neck: a comparative light microscopy and DNA hybridization study. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.*, v. 49, no. 5, p. 259-69, 1987.
- LORINCZ, A. T.; REID, R.; JENSON, A. B.; GREENBERG, M. D.; LANCASTER, W.; KURMAN, R. J. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol.*, v. 79, p. 328-37, 1992.
- LUTZNER, M.; KUFFER, R.; BLANCHET-BARDON, C.; CROISSANT, O. Different papillomaviruses as the causes of oral warts. *Arch Dermatol.*, v. 118, no. 6, p. 393-9, 1982.
- MADELEINE, M. M.; SHERA, K.; SCHWARTZ, S. M.; DALING, J. R.; GALLOWAY, D. A.; WIPF, G. C.; CARTER, J. J.; McKNIGHT, B.; McDOUGALL, J. K. The p53 Arg72Pro polymorphism, human papillomavirus, and invasive squamous cell cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 9, no. 2, p. 225-7, 2000.

MAKNI, H.; FRANCO, E.; KAIANO, J.; VILLA, L.; LEBRECQUE, S.; DUDLEY, R.; STOREY, A.; MATLASHEWSKI, G. p53 polymorphism in codon 72 and risk of HPV-induced cervical cancers: effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer*, v. 87, no. 4, p. 528-33, 2000.

MATLASHEWSKI, G. J.; TUCK, S.; PIM, D.; LAMB, P.; SCHNEIDER, J.; CRAWFORD, L. V. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol*, v. 7, p. 961-3, 1987.

McBRIDE, A. A.; ROMANCZUCK, H.; HOWLEY, P. M. The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem.*, v. 266, p. 18411-414, 1991.

McKAIG, R. G.; BARIC, R. S.; OLSHAN, A. F. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecularbiology. *Head Neck*, v. 20, n. 3, p. 250-65, 1998.

McMURRAY, H. R.; NGUYEN, D.; WESTBROOK, T. F.; MCANCE, D. J. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol.*, v. 82, no. 1, p. 15-33, 2001.

MENZO, S.; MONACHETTI, A.; TROZZI, C.; CIAVATTINI, A.; CARLONI, G.; VARALDO, P. E.; CLEMENTI, M. Identification of six putative novel human papillomaviruses (HPV) and characterization of candidate HPV type 87. *J Virol* ., v. 75, no. 23, p. 11913-9, 2001.

MIGUEL, R. E.; VILLA, L. L.; CORDEIRO, A. C.; PRADO, J. G.; SOBRINHO, J. S.; KOWALSKI, L. P. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. *Am J Surg*, v. 176, p. 428-9, 1998.

MILLER, C. S.; JOHNSTONE, B. M. 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.*, v. 91, no. 6, p.622-35, 2001.

MINAGUCHI, T.; KANAMORI, Y.; MATSUSHIMA, M.; YOSHIKAWA, H.; TAKETANI, Y.; NAKAMURA, Y. No evidence of correlation between polymorphism at codon 72 of p53 and risk of cervical cancer in Japanese patients with human papillomavirus 16/18 infection. *Cancer Res*, v. 58, p. 4585-6, 1998.

MINAMOTO, T.; MAI, M.; RONAI, Z. Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 20, p. 519-27, 1999.

MINETA, H.; OGINO, T.; AMANO, H. M.; OHKAWA, Y.; ARAKI, K.; TAKEBAYASHI, S.; MIURA, K. Human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.*, v. 18, p. 4765-8, 1998.

**MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da incidência de mortalidade por câncer no Brasil. <http://www.inca.gov.br/epidemiologia/estimativa2002/brasil.html> , 2002**

MOORE, C. E.; WIATRAC, B. J.; McCLATCHEY, K. D.; KOOPMANN, C. F.; THOMAS, G. R.; BRADFORD, C. R.; CAREY, T. E. High-risk human papillomavirus types and squamous cell carcinoma in patients with respiratory papillomas. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, v. 120, p. 698-705, 1999.

MORK, J.; LIE, K.; GLATTRE, E.; HALLMANS, G.; JELLUM, E.; KOSKELA, P.; MOLLER, B.; PUKKALA, E.; SCHILLER, J. T.; YOUNGMAN, L.; LEHTINEN, M.; DILLNER, J. Human

- papillomavirus infection as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, v. 344, no. 15, p. 1125-31, 2001.
- MORSHED, K.; STENZEL, A.; SZYMANSKI, M.; ROZYNSKA, K.; SIWIEC, H.; GOLABEK, W.; WOJCIEROWSKI, J. Detection of human papillomavirus type 16 and 18 in laryngeal cancer using PCR methods. *Otolaryngol Pol.*, v. 55, no.1, p. 29-33, 2001.
- MUNGER, K.; PHELPS, W. C.; BUBB, V.; HOWLEY, P. M.; SCHLEGEL, R. The E6 and E7 genes human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol.*, v. 63, no. 10, p. 4417-21, 1989.
- MUNGER, K. The role of human papillomaviruses in human cancers. Review. *Front Biosci.*, v. 7, p. d641-9, 2002.
- MUÑOZ, N.; WILEMOTTE, R.; HERRERO, R.; ALMONTE, M.; GUMARÃES, D. P.; HAIAUT, P.; LENOIR, G.; WALBOOMERS, J. M. M. No evidence for an association of homozygous Arg-72 p53 with cervical cancer. *Abstract 17<sup>th</sup> International papillomavirus conference*. Charleston, South Carolina, USA, 1999.
- MUÑOZ, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. Review. *J Clin Virol.*, v. 19, no.1-2, p. 1-5, 2000.
- NAGHASHFAR, Z.; SAWADA, E.; KUTCHER, M. J.; SWANCAR, J.; GUPTA, J.; DANIEL, R.; KASHIMA, H.; WOODRUFF, J. D.; SHAH, K. Identification of genital tract papillomaviruses HPV-6 and HPV-16 in warts of the oral cavity. *J Med Virol*, v. 17, no. 4, p. 313-24, 1985.
- NAGPAL, J. K.; PATNAIK, S.; DAS, B. R. Prevalence of high-risk human papilloma virus types and its association with P53 codon 72 polymorphism in tobacco addicted oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients of Eastern India. *Int J Cancer*, v. 97, no. 5, p. 649-53, 2002.
- NEBESIO, C. L.; MIROWSKI, G. W.; CHUANG, T. Y. Human papillomavirus: clinical significance and malignant potential. *Int J Dermatol.*, v. 40, no.6, p. 373-9, 2001.
- NISHIKAWA, A.; FUJIMOTO, T.; AKUTAGAWA, N.; IWASAKI, M.; TAKEUCHI, M.; FUJINAGA, K.; KUDO, R. p53 polymorphism (codon 72) has no correlation with the development and the clinical features of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*, v. 10, p. 402-7, 2000.
- O'CONNOR, D. P.; KAY, E. W.; LEADER, M.; ATKINS, G. J.; MURPHY, G. M.; MABRUK, M. J. p53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus associated skin cancer. *J Clin Pathol.*, v. 54, no. 7, p. 539-42, 2001.
- OLSHAN, A F.; WEISSLER, M. C.; PEI, H.; CONWAY, K. p53 mutations in head and neck cancer: new data and evaluation of mutational spectra. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, v. 6, p. 499-504, 1997.
- PIFFKÒ, J.; BANKFALVI, A.; TORY, K.; FUZESI, L.; BRYNE, M.; OFNER, D.; KUSCH, F.; JOOS, U.; SCHMID, K. W. Molecular assessment of p53 abnormalities at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Head Neck*, v. 20, no.1, p. 8-15, 1998.
- PFISTER, H.; FUCHS, P. G.; VOLCKER, H. E. Human papillomavirus DNA in conjunctival papilloma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, v. 223, p. 164-7, 1985.



PORTUGAL, L. G.; GOLDENBERG, J. D.; WENIG, B. L.; FERRER, K. T.; NODZENSKI, E.; SABNANI, J. B.; JAVIER, C.; WEICHSELBAUM, R. R.; VOKES, E. E. Human papillomavirus expression and p53 gene mutations in squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck*, v. 123, p. 1230-4, 1997.

PREMOLI DE PERCOCO, G.; RAMÍREZ, J. L.; GALINDO, I. Correlation between HPV types associated with oral squamous cell carcinoma and cervicovaginal cytology: an in situ hybridization study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, v. 86, p. 77-81, 1998.

REID, R.; GREENBERG, M.; JENSON, A. B. Sexually transmitted papillomaviral infection the anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obst Gynecol.*, v. 156, no. 1, p. 212-22, 1987.

RIETHDORF, S.; FRIEDRICH, R. E.; SÜHWOLD, J.; OSTWALD, C.; BARTEN, M.; GOZACZ, P.; GUNDLACH, K. K.; SCHLECHTE, H.; BECKER, J.; BREGENZER, T.; RIETHDORF, L.; LÖNING, T. p53 mutations and HPV infections in squamous epithelial carcinomas of the head and neck region. Long-term follow up. *Mund Kiefer Gesichtschir*, v. 2, p. 30-4, 1998.

RIOU, G. F.; FOGEL, S.; BARROIS, M.; AHOMADEGBE, J. C.; RAMOZ, N.; ORTH, G. Lack of evidence for the role of p53 polymorphism at codon 72 in the development of invasive cervical carcinomas. *Abstract 17<sup>th</sup> International papillomavirus conference*. Charleston, South Carolina, USA, 1999.

SAMBROOK, K. J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular biology*. A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. USA, Cold Spring Harbor Lab Press, 3v, 1989.

SAND, L.; JALOULI, J.; LARSSON, P. A.; HIRSCH, J. M. Human papilloma viruses in oral lesions. *Anticancer research*, v. 20, p. 1183-88, 2000.

SANG, B. C.; BARBOSA, M. S. Increased E6/E7 transcription in HPV 18-immortalized human keratinocytes results from inactivation of E2 and additional cellular events. *Virology*, v. 189, p. 448-55, 1992.

SANGUINETTI, C. L.; DIAS, E. N.; SIMPSON, A. J. G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. *Biotechniques*, v. 17, p. 915-18, 1994.

SAYHAN, N.; YAZICI, H.; BUDAK, M.; BITISIK, O.; DALAY N. p53 codon 72 genotypes in colon cancer. Association with human papillomavirus infection. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.*, v. 109, no. 1-2, p. 25-34, 2001.

SCHEFFNER, M.; WERNESS, B. A.; HUIBREGTSE, J. M.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes degradation of p53. *Cell*, v. 63, p. 1129-36, 1990.

SCHEFFNER, M.; MUNGER, K.; BYRNE, J. C.; HOWLEY, P. M. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 88, p. 5523-27, 1991.

SCHWARTZ, S. M.; DALING, J. R.; DOODY, D. R.; WIPF, G. C.; CARTER, J. J.; MADELEINE, M. M.; MAO, E. J.; FITZGIBBONS, E. D.; HUANG, S.; BECKMANN, A. M.; MCDOUGALL, J. K.; GALLOWAY, D. A. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.*, v. 90, no. 21, p. 1626-36, 1998.

SCHWARTZ, S. R.; YUEH, B.; MCDOUGALL, J. K.; DALING, J. R.; SCHWARTZ, S. M. Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, v. 125, no.1, p. 1-9, 2001.

SCHOLES, A. G. M.; LILOGLOU, T.; SNIJDERS, P. J. F.; HART, C. A.; JONES, A. S.; WOOLGAR, J. A.; VAUGHAN, E. D.; WALBOOMERS, J. M. M.; FIELD, J. K. p53 mutations in relation to human papillomavirus type 16 infection in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer*, v. 71, p. 796-799, 1997.

SCULLY, C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol.*, v. 38, p. 227-34, 2002.

SELLERS, W. R.; KAELIN JR, W. G. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol*, v. 15, p. 3301-12, 1997.

SISK, E. A.; BRADFORD, C. R.; JACOB, A.; YIAN, C. H.; STATON, K. M.; TANG, G.; HARRIS, M. O.; CAREY, T. E.; LANCASTER, W. D.; GREGOIRE, L. Human papillomavirus infection in "young" versus "old" patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head neck*, v. 22, p. 649-57, 2000.

SMITH E. M.; HOFFMAN, H. T.; SUMMERSGILL, K. S.; KIRCHNER, H. L.; TUREK, L. P.; HAUGEN, T. H. Human papillomavirus and risk of oral cancer. *Laryngoscope*, v. 108, p. 1098-103, 1998.

SMITH, E. M.; SUMMERSGILL, K. F.; ALLEN, J.; HOFFMAN, H. T.; MCCULLOCH, T.; TUREK, L. P.; HAUGEN, T. H. Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*, v. 109, no. 11, p. 1069-76, 2000.

SNIJDERS, P. J.; van den BRULE, A. J.; MEIJER, C. J.; WALBOOMERS, J. M. Papillomaviruses and cancer of the upper digestive and respiratory tracts. Review. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 186, p. 177-98, 1994.

SORENSEN, D. M.; LEWARK, T. M.; HANEY, J. L.; MEYERS, A. D.; KRAUSE, G.; FRANKLIN, W. A. Absence of p53 mutations in squamous cell carcinomas of the tongue in nonsmoking and nondrinking patients younger than 40 years. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, v. 123, p. 503-6, 1997.

STEENBERGEN, R. D. M.; HERMSEN, M. A. J. A.; WALBOOMERS, J. M. M.; JOENJE, H.; ARWEST, F.; MEYER, C. J. L. M.; SNIJDERS, P. J. F. Integrated human papillomavirus type 16 and loss of heterozygosity at 11q22 and 18q21 in an oral carcinoma and its derivate cell line. *Cancer Res*, v. 55, p. 5465-71, 1995.

STOREY, A.; THOMAS, M.; HARWOOD, C.; GARDIOL, D.; MANTOVANI, F.; BREUERS, J.; LUGH, I. M.; MATLASHEWSKI, G.; BANKS, L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, v. 393, p. 229-34, 1998.

STROME, S. E.; SAVVA, A.; BRISSET, A. E.; GOSTOUT, B. S.; LEWIS, J.; CLAYTON, A. C.; MCGOVERN, R.; WEAVER, A. L.; PERSING, D.; KASPERBAUER, J. L. Squamous cell carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. *Clin Cancer Res.*, v. 8, no. 4, p. 1093-100, 2002.

- SUGERMAN, P.B.; SHILLITOE, E. J. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a casual relationship. *Oral Dis*, v. 3, p. 130-47, 1997.
- SUMMERSGILL, 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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 90, p. 334-9, 2000.
- SUMMERSGILL, K. F.; SMITH, E. M.; LEVY, B. T.; ALLEN, J. M.; HAUGEN, T. H.; TUREK, L. P. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 91, p. 62-9, 2001.
- SYRJÄNEN, K.; SYRJÄNEN, S.; LAMBERG, M.; PYRHONEN, S.; NUUTINEN, J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*, v. 12, no. 6, p. 418-24, 1983.
- SYRJÄNEN, K. J.; PYRHONEN, S.; SYRJÄNEN, S. M.; LAMBERG, M. A. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg*, v. 21, no. 2, p. 147-53, 1983.
- SYRJÄNEN, K. J.; SYRJÄNEN, S. M.; LAMBERG, M. A.; PYRHONEN, S. Human papillomavirus (HPV) involvement in squamous cell lesions of the oral cavity. *Proc Finn Dent Soc*, v. 79, no. 1, p. 1-8, 1983.
- SYRJÄNEN, S. M.; SYRJÄNEN, K. J. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med*, v. 31, no. 3, p. 175- 87, 1999.
- TACHEZY, R.; MIKYSKOVÁ, I.; SALAKOVÁ, M.; RANST, M. V. Correlation between human papillomavirus-associated cervical cancer and p53 codon arginine/proline polymorphism. *Human Genetics*, v. 105, p. 564-66, 1999.
- TAKANO, I.; TAMURA, S.; YAMANAKA, N. Detection of human papillomavirus DNA and expression of p53 protein in patients with head and neck cancer. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*, v. 100, p. 524-33, 1997.
- TERAI, M.; HASHIMOTO, K.; YODA, K.; SATA, T. High prevalence of human papillomavirus in the normal oral cavity of adults. *Oral Microbiol Immunol*, v. 14, no. 4, p. 201-5, 1999.
- 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*, v. 19, p. 1092-100, 1999.
- TSAI, M. H.; LIN, C. D.; HSIEH, Y. Y.; CHANG, F. C.; TSAI, F. J.; CHEN, W. C.; TSAI, C. H. Prognostic significance of the proline form of p53 codon 72 polymorphism in nasopharyngeal carcinomas. *Laryngoscope*, v. 112, no. 1, p. 116-9, 2002.
- VENUTI, A.; MANNI, V.; MORELLO, R.; DE MARCO, F.; MARZETTI, F.; MARCANTE, M. L. Physical state and expression of HPV in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa. *J Med Virol*, v. 60, p. 396-402, 2000.
- DE VILLIERS, E. M.; WEIDAUER, H.; LE, J. Y.; NEUMANN, C.; ZUR HAUSEN, H. Papilloma viruses in benign and malignant tumours of the mouth and upper respiratory tract. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)*, v. 65, no. 4, p. 177-9, 1986.

DE VILLIERS, E. M.; NEUMANN, C.; LE, J. Y.; WEIDAUER, H.; ZUR HAUSEN, H. Infection of the oral mucosa with defined types of human papillomaviruses. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, v. 174, no. 6, p. 287-94, 1986.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. p53 function and dysfunction. *Cell*, v. 70, p. 523-6, 1992.

VOWLES, R. H.; MYINT, S.; CROFT, C. B. The incidence and detection of HPV in the upper aerodigestive tract using brush and biopsy techniques. *J Laryngol Otol*, v. 111, p. 215-7, 1997.

WALBOOMERS, J. M. M.; HUSMAN, A. M.; van den BRULE, A. V. C.; SNIJDERS, P. J.; MEIER, C. J. Detection of genital papillomavirus infections: critical review of methods and prevalence studies in relation to cervical cancer. In: Stern, P.L., Stanley, M.A, eds. *Human papillomaviruses and cervical cancer: biology and immunology*. New York: Oxford University Press, p. 40-71, 1994.

WESTON, A.; PAN, C. F.; KSIESKI, H. B.; WALLENSTEIN, S.; BERKOWITZ, G. S.; TARTTER, P. I.; BLEIWEISS, I. J.; BROWER, S. T.; SENIE, R. T.; WOLFF, M. S. p53 haplotype determination in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 6, p. 105-12, 1997.

WONG, D. T. W.; MÜNGER, K. Association of Human Papillomaviruses with a subgroup of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *J Nat Cancer Institute*, v. 92, no. 9, p. 675-76, 2000

YLITALO, N.; SORENSEN, P.; JOSEFSSON, A.; FRISCH, M.; SPARÉN, P.; PONTÉN, J.; GYLLENSTEN, U.; MELBYE, M; ADAMI, H. O. Smoking and oral contraceptives as risk factors for cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer*, v. 81, p. 357-65, 1999.

ZHANG, L.; XING, D., HE, Z.; LIN, D. p53 gene codon 72 polymorphism and susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, v. 19, no. 1, p. 10-3, 2002.

ZEHBE, I.; VOGLINO, G.; WILANDER, E.; DELIUS, H.; MARONGIU, A.; EDLER, L.; KLIMEK, F.; ANDERSSON, S.; TOMMASINO, M. p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res*, v. 61, p. 608-10, 2001.

zur HAUSEN, H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.*, v. 1288, p. 55-78, 1996.

zur HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Nat Cancer Institute*, v. 92, no. 9, p. 690-98, 2000.

## ***8. Anexo***

## 8. ANEXO

Tabela 1. Dados de amplificação (+) dos alelos p53-Prolina (Pro) e p53-Arginina (Arg) em 50 amostras de tumor.

Amostra	Alelo		Amostra	Alelo	
	Arg	Pro		Arg	Pro
T2	+		T68	+	+
T3	+	+	T69	+	
T6		+	T70	+	
T7		+	T71	+	+
T8	+	+	T72	+	+
T18		+	T73	+	
T21	+	+	T74	+	
T22	+		T75	+	
T23	+		T76		+
T31	+	+	T77	+	+
T35	+		T79	+	
T36	+		T80	+	+
T38	+		T81	+	+
T41		+	T82	+	
T43	+	+	T83	+	
T52	+	+	T84	+	+
T53		+	T85	+	
T58		+	T86	+	
T61	+	+	T87	+	+
T62	+		T88	+	
T63	+		T89		+
T64	+		T90	+	
T65	+		T91	+	
T66	+	+	T92	+	
T67	+		T93	+	

Tabela 2. Dados de amplificação (+) dos alelos p53-Prolina (Pro) e p53-Arginina (Arg) em 82 amostras de indivíduos controles fumantes.

Amostra	Alelo		Amostra	Alelo		Amostra	Alelo	
	Arg	Pro		Arg	Pro		Arg	Pro
F1	+		F34	+	+	F68	+	+
F2	+		F35	+		F69	+	
F3	+		F36	+		F70		+
F5	+		F37	+	+	F71	+	+
F6	+	+	F38	+	+	F72	+	+
F7	+	+	F39	+	+	F73	+	+
F8	+		F40	+		F74	+	
F11	+	+	F41	+	+	F75	+	+
F12	+		F42	+	+	F76	+	+
F13	+	+	F43	+		F77	+	+
F14	+	+	F44	+		F78	+	
F15	+	+	F45	+	+	F79	+	
F16	+	+	F46	+	+	F80	+	
F17	+	+	F47	+	+	F81	+	+
F18	+	+	F48	+	+	F82	+	+
F19	+	+	F51		+	F85	+	+
F20	+	+	F52		+	F87	+	
F21	+		F55	+		F89	+	+
F22	+		F57	+		F90	+	
F25	+	+	F58	+	+	F91	+	+
F26	+		F59	+	+	F92	+	+
F27	+	+	F60	+	+	F93	+	
F28	+	+	F61	+		F94	+	+
F29	+	+	F62	+		F95	+	
F30	+		F64	+		F97	+	
F31	+	+	F65	+		F99	+	
F32	+		F66		+			
F33	+		F67	+	+			

Tabela 3. Dados de amplificação (+) dos alelos p53-Prolina (Pro) e p53-Arginina (Arg) em 60 amostras de indivíduos controles não fumantes.

Amostra	Alelo		Amostra	Alelo	
	Arg	Pro		Arg	Pro
NF1	+		NF56	+	+
NF17	+		NF59	+	
NF20	+		NF60	+	
NF22	+		NF61	+	+
NF24	+	+	NF62	+	+
NF27	+		NF63	+	
NF29	+	+	NF64	+	+
NF33	+		NF65		+
NF34	+		NF66	+	+
NF35	+		NF67	+	
NF36	+		NF68		+
NF37	+	+	NF69	+	
NF38	+		NF71	+	
NF39	+		NF72	+	
NF40	+		NF73	+	
NF41	+		NF74		+
NF42		+	NF75	+	
NF43		+	NF76	+	
NF44	+	+	NF81	+	
NF45	+	+	NF82	+	+
NF46	+		NF83	+	
NF47	+	+	NF85	+	
NF48	+	+	NF87	+	
NF49	+		NF88	+	
NF50	+		NF89	+	+
NF51	+		NF90	+	
NF52	+	+	NF91		+
NF53	+	+	NF92	+	
NF54	+	+	NF95	+	
NF55	+		NF96	+	



Tabela 4. Positividade para o vírus HPV em 50 amostras de tumor.

Amostra	HPV	Amostra	HPV
T2	+	T68	
T3	+	T69	+
T6		T70	
T7		T71	
T8		T72	
T18		T73	
T21		T74	
T22		T75	
T23		T76	
T31		T77	
T35		T79	
T36		T80	
T38		T81	
T41		T82	
T43		T83	+
T52	+	T84	
T53		T85	
T58		T86	
T61		T87	+
T62	+	T88	
T63	+	T89	
T64		T90	
T65		T91	
T66		T92	
T67		T93	

Tabela 5. Positividade para o vírus HPV em 82 amostras de controles fumantes.

Amostra	HPV	Amostra	HPV	Amostra	HPV
F1		F34		F68	
F2		F35		F69	
F3		F36		F70	
F5		F37		F71	
F6		F38		F72	+
F7		F39		F73	+
F8	+	F40		F74	
F11		F41		F75	
F12		F42	+	F76	
F13		F43		F77	
F14		F44		F78	
F15		F45	+	F79	
F16	+	F46	+	F80	
F17		F47		F81	
F18		F48		F82	
F19		F51		F85	
F20		F52		F87	
F21		F55		F89	
F22		F57		F90	
F25	+	F58		F91	
F26	+	F59		F92	
F27		F60		F93	
F28	+	F61		F94	
F29		F62		F95	
F30		F64		F97	
F31		F65		F99	
F32		F66			
F33		F67			

Tabela 6. Positividade para o vírus HPV em 60 amostras de controles não fumantes.

Amostra	HPV	Amostra	HPV
NF1		NF56	
NF17		NF59	
NF20		NF60	
NF22	+	NF61	
NF24		NF62	
NF27		NF63	
NF29		NF64	
NF33		NF65	
NF34	+	NF66	+
NF35	+	NF67	
NF36	+	NF68	
NF37		NF69	
NF38		NF71	
NF39		NF72	
NF40		NF73	
NF41		NF74	
NF42		NF75	
NF43		NF76	
NF44		NF81	
NF45		NF82	
NF46		NF83	
NF47		NF85	
NF48		NF87	
NF49		NF88	
NF50		NF89	
NF51		NF90	
NF52		NF91	
NF53		NF92	
NF54		NF95	
NF55		NF96	

Projeto: **Papilomavírus Humano (HPV) e polimorfismo do gene TP53 no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço**

Nome.....sexo .....

Local/data de nascimento.....RG.....

Endereço.....fone.....

Profissão atual.....tempo de atuação.....

Profissão anterior.....tempo de atuação.....

Antecedentes raciais.....Classe social.....

Hábitos alimentares (frequência de consumo/tipos)

    Leite e derivados.....

    Frutas.....

    Carne.....

    Frituras/assados/defumados.....

    Chá.....Café.....A adoçante.....

Outros hábitos alimentares

    Temperatura dos alimentos.....

Exposição ao tabaco

    Fumante ativo ( )           ex-fumante ( )

    Nunca fumou ( )           fumante passivo/motivo ( /           )

    Início.....Duração.....tipo.....consumo diário.....

Exposição a bebidas alcoólicas

    Etilista ( )           consumo social ( )           nunca consumiu ( )

    Início.....Duração.....tipo.....Consumo semanal/tipo.....

Exposição ocupacional a compostos químicos/tipo.....

Inflamação/infecção:

    Oral.....outras.....

História de câncer:

    Propósito.....família.....

Outras doenças:

    Propósito.....família.....

Raio X diagnóstico/data do último exame:

    Dentário.....outros.....

Responsável pelo procedimento.....

## ***9. Resumo***

## 9. RESUMO

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço é uma neoplasia cujo principal fator de risco é o consumo de tabaco e/ou álcool. As infecções pelo HPV têm sido observadas nesse grupo de tumores. Os HPVs de alto risco podem induzir alterações celulares pela interação de suas proteínas E6 e E7 com as proteínas p53 e a pRb, respectivamente. As oncoproteínas são insuficientes para o desenvolvimento do fenótipo maligno, sugerindo a presença de outros cofatores, como a susceptibilidade genética. O gene *TP53* possui um polimorfismo que resulta na presença de uma prolina ou de uma arginina na posição correspondente ao códon 72, no exon 4. O objetivo do presente estudo foi avaliar o papel da infecção pelo HPV e do polimorfismo de *TP53* na carcinogênese de cabeça e pescoço. Foram analisadas 142 amostras de indivíduos controle e 50 amostras de pacientes. Os resultados mostraram a presença do HPV em 10,6% dos controles e em 16% dos tumores. A análise da frequência de distribuição dos genótipos relativos revelou 50% Arg/Arg, 43% Arg/Pro e 7% Pro/Pro no grupo controle e 52% Arg/Arg, 32% Arg/Pro e 16% Pro/Pro no grupo dos tumores. A análise estatística desses dados não mostrou diferença significativa na distribuição dos genótipos e dos alelos entre os dois grupos, independentemente da presença do HPV, à exceção dos indivíduos Pro/Pro, que estão associados à ausência do HPV. O alelo arginina e o genótipo Arg/Pro têm efeito protetor ao desenvolvimento dos tumores. O HPV não representa risco aos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: HPV; p53; polimorfismo; cabeça e pescoço.

## ***10. Abstract***

## 10. ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma is a disease associated with tobacco and/or alcohol abuse. There are evidences that oncogenic HPV may also be a risk for upper aerodigestive tract cancers. High-risk HPVs encode two early proteins, E6 and E7, that can bind to p53 and pRb, respectively, and induce its degradation or inactivation. The *TP53* gene has a single polymorphism at codon 72 of exon 4 that encodes either arginine (Arg) or proline (Pro). The purpose of this study was to evaluate the role of HPV infection and *p53* polymorphism in head and neck cancer. We analyzed 50 tumors as well swabs of oral mucosa from 142 control individuals by PCR technique. The prevalence of HPV in controls was 10.6% and in cancer specimens was 16%. The frequency of distribution of genotypes in controls was 50% Arg/Arg, 43% Arg/Pro and 7% Pro/Pro and in tumors was e 52% Arg/Arg, 32% Arg/Pro e 16% Pro/Pro. Contrarely to the results of some studies on cervical cancer, no association between any *TP53* genotype or allele and the development of head and neck cancer was observed, regardless of HPV status, except for Pro/Pro genotype which is associated with the absence of HPV. Arginine allele and Arg/Pro genotype appear to protect against head and neck cancers. Also, the data showed that HPV infection results in no increasing risk of developing head and neck tumors..

Keywords: HPV; p53; polymorphism; head and neck.



Autorizo a reprodução deste trabalho.

São José do Rio Preto, 23/08/2002.

---

**Sylvia Sanches Cortezzi**