



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

Avaliação Genético-Molecular do Carcinoma das Células

Escamosas da Laringe

Cláudio Carlos da Silva

Goiânia
Março, 2010

**Avaliação Genético-Molecular do Carcinoma das Células
Escamosas da Laringe**

Cláudio Carlos da Silva, M. Sc.

Mestre em Biologia – UFG-GO/2000

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, Ph. D.

Orientador

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás,
como requisito parcial à obtenção do Grau de

DOUTOR EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR.

©Cláudio Carlos da Silva, Março de 2010.
Universidade Federal de Goiás

Todos os direitos reservados.
Esta tese pode ser reproduzida, no todo ou em parte, desde que mantida os direitos autorais.

Defesa Pública ocorrida em: 21 / 10 / 2009

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, Ph.D. (Orientador)

Professor Titular da PUC-GO - Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Doutor em Biologia Molecular – Universidade de Victória, Canadá (1997)

Prof. Dr. Marcelo Razera Baruffi, Ph.D.

Professor Assistente Doutor da UNESP - Universidade Estadual de São Paulo
Doutor em Ciências Biológicas – Universidade Estadual de São Paulo (2000)
Pós-Doutor em Oncogenética - Hospital das Clínicas da UNESP

Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Professora Adjunto da UFG – Universidade Federal de Goiás
Doutora em Genética e Bioquímica - Universidade Federal de Uberlândia (2003)

Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva

Professora Assistente da PUC-GO – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Doutora em Biologia Animal – Universidade de Brasília (2006)

Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres, Ph.D.

Professor Adjunto da UEG – Universidade Estadual de Goiás
Doutor em Ciências Médicas e Dentais - Universidade de Niigata, Japão (2005)

As atividades experimentais deste estudo foram desenvolvidas, no período de Setembro de 2005 a Agosto de 2009, nos seguintes laboratórios:

1. NPR - Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da UCG – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia – GO.

2. LaGene - Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular da SuLeide - Superintendência Leide das Neves Ferreira da SES/GO - Secretaria de Estado da Saúde do Governo do Estado de Goiás, Goiânia – GO.

“Ficar especulando é muito interessante, mas é mais sábio que você aja antes que alguém o faça”.

Oswald Avery, 1943.

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS, ARMINDA LUÍZA E GERALDO CARLOS (*IN MEMORIAM*).

AOS MEUS IRMÃOS, LÁZARO CARLOS (*IN MEMORIAM*), LUÍZ CARLOS E CLAYSON CARLOS.

AOS MEUS FILHOS, GABRYELL CARLOS, ALANA LUÍSA E CLÁUDIO CALIXTO.

À MINHA ESPOSA, ROSALVA CALIXTO.

*Tudo é do Pai
Toda honra e toda a glória
É Dele a vitória
Alcançada em minha vida.*

Pe. Fábio de Melo

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, Ph. D.** (Peixoto) pela orientação, apoio, incentivo, carinho e inabalável amizade.

Aos amigos do LaGene – Laboratório de Citogenética e Genética Molecular da Secretaria de Estado da Saúde do Governo do Estado de Goiás, **Daniela de Melo e Silva, Gustavo da Silva Pinto, Thaís Cidália Vieira, Flávio Monteiro Ayres e Sandra Maria de Jesus**, pelos momentos felizes e de descontração durante todos esses anos de convívio.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisas Replicon – Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, **Cristiano Luiz Ribeiro, Damiana Mirian da Cruz e Cunha, Eduardo Rocha Pedrosa, Emília Oliveira Alves Costa, Caroline Oliveira de Araújo Melo e Lysa Bernardes Minasi** pelo apoio, compreensão, amizade inestimável e dedicação.

Ao parceiro **Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva**, pelo especial incentivo, companheirismo e carinho.

Ao companheiro **Raimundo Lima da Silva Júnior**, pela colaboração no desenvolvimento das atividades de laboratório, auxílio na redação dos artigos, amizade e carinho.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia** do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás pela contribuição na minha formação acadêmica.

À **PROPE/UCG – Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa** da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pela aquisição dos materiais de consumo necessários ao desenvolvimento deste estudo.

À **SES/GO – Secretaria de Estado da Saúde** do Governo do Estado de Goiás pela disponibilidade dos equipamentos e softwares necessários ao desenvolvimento deste estudo, mediante o estabelecimento do Convênio de Cooperação Mútua entre a Secretaria de Estado da Saúde e Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

À **Dra. Maria Paula Curado** do Registro de Câncer em Goiás e Serviço de Cabeça e Pescoço do HAJ - Hospital Araújo Jorge da ACCG - Associação de Combate ao Câncer em Goiás, pela colaboração e obtenção das amostras biológicas.

À **IARC – *International Agency for Research on Cancer*** (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer) pela oportunidade da obtenção das amostras biológicas junto ao “Estudo Internacional Correlacionando Virose e Câncer de Cavidade Oral e Laringe”.

Aos **Pacientes** e demais **doadores**, que gentilmente concordaram em participar deste estudo.

SUMÁRIO

	Pág.
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii
1. Introdução.....	01
2. Referencial Teórico.....	04
2.1. Considerações Históricas.....	05
2.2. Laringe: Aspectos Histológicos & Anatômicos.....	07
2.3. Carcinoma das Células Escamosas da Laringe: <i>Uma condição clínica desafiadora</i>	11
2.3.1. Epidemiologia do Carcinoma da Laringe.....	12
2.3.2. Estadiamento do Tumor.....	14
2.3.3. Classificação Internacional da Doença.....	19
2.4. Condições que Predispõe ao Carcinoma da Laringe.....	23
2.4.1. Tabagismo & Etilismo: <i>Uma forte associação com os tumores da laringe</i>	23
2.4.2. Papilomavírus Humano & Considerações Bioquímicas na Relação Parasito-Hospedeiro: <i>Interação dos Genes de Supressão Tumoral com o Genoma do Papilomavírus Humano</i>	27

2.4.3.	Aspectos Genético-Moleculares: <i>Condições genético-moleculares de predisposição ao câncer.....</i>	35
2.4.3.1.	Polimorfismo no Gene <i>TP53</i> : <i>Uma situação de predisposição genética amplamente investigada.....</i>	36
2.4.3.2.	Outros Polimorfismos: <i>Demais genes importantes no processo de tumorigênese.....</i>	42
2.4.3.3.	Instabilidade Genômica: <i>O papel da perda da heterozigose (LOH) e instabilidade de microssatélites (MIS) no desenvolvimento do câncer.....</i>	43
2.4.3.4.	Hibridação Genômica Comparativa: <i>Estudos envolvendo comparações entre genomas inteiros de linhagens de células tumorais com DNA controle.....</i>	50
3.	Objetivos.....	54
3.1.	Objetivo Geral.....	55
3.2.	Objetivos Específicos.....	55
4.	Metodologias & Estratégias de Investigação.....	57
4.1.	Participação Institucional.....	58
4.2.	Grupo Amostral.....	58
4.3.	Critérios de Inclusão e Exclusão de Amostras.....	59
4.4.	Obtenção das Amostras.....	59

4.5.	Extração & Purificação de DNA: <i>Sangue periférico & Biópsias</i>	60
4.6.	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>PCR – do Inglês, Polymerase Chain Reaction</i>).....	60
4.6.1.	<i>Detecção do Polimorfismo do Códon 72 do Gene TP53</i>	61
4.6.2.	<i>Identificação e Genotipagem do HPV</i>	62
4.6.3.	<i>Avaliação da Instabilidade Genômica em loci Microssatélites</i> ..	62
4.7.	<i>Hibridação Genômica Comparativa (CGH - do Inglês, Comparative Genomic Hybridization)</i>	62
4.8.	<i>Eletroforese & Visualização dos Fragmentos de DNA</i>	68
4.9.	<i>Análise Estatística</i>	70
5.	Capítulo 01: <i>Análise do Polimorfismo do Gene TP53 e Infecção por HPV em Pacientes com Carcinoma das Células Escamosas da Laringe</i>	72
6.	Capítulo 2: <i>Detecção do genoma de HPV em pacientes com carcinoma espino-celular da laringe: Comparação entre os ensaios de PCR convencional e em tempo real</i>	93
7.	Capítulo 3: <i>Instabilidade Genômica no Carcinoma das Células Escamosas da Laringe</i>	105
8.	Capítulo 4: <i>Hibridação Genômica Comparativa no Carcinoma da Laringe</i>	131
9.	<i>Considerações Finais</i>	162
10.	<i>Referências Bibliográficas</i>	168

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Pág.
01.	Desenhos esquemáticos da laringe, destacando as principais partes do órgão e as três regiões anatômicas: supraglote, glote e subglote. CVF: Cordas Vocais Falsas; CVV: Cordas Vocais Verdadeiras. SILVA, 2003.....	09
02.	Benzopireno – Hidrocarboneto Policíclico Aromático (PAH) e suas propriedades químicas (HECHT, 2003).....	24
03.	Mapa genético do papiloma vírus humano 18 (HPV18). Genoma circular de dupla-fita, destacando sua organização e localização dos quadros abertos de leitura. LCR: Longa Região de Controle ou URR: Região Regulatória a Montante. SILVA, 2003.....	30
04.	Modelo esquemático do gene <i>TP53</i> . Em (A) estão indicados os éxons, íntros e o número de pares de bases respectivos. Em (B), um modelo esquemático geral da proteína p53.....	36
05.	Modelo esquemático da técnica de Híbridação Genômica Comparativa, proposta por KALLIONIEMI e colaboradores (1992).....	64
06.	Híbridação Genômica Comparativa destacando a formação dos sinais fluorescentes em situações na ausência de desequil�rios cromossômicos (1) e na presenç�a de perdas e/ou deleções (2) e ganhos e/ou ampliações (3).....	65

07. Resultado da captura individual da fluorescência em microscopia de luz, utilizando os filtros específicos para cada um dos fluorocromos utilizados. A imagem 4 corresponde à composição final das cores realizada pelo software específico..... 66
08. Modelo esquemático utilizado para identificação dos cromossomos obtidos pela fluorescência resultante da coloração pelo contracorante DAPI (azul). As áreas cromossômicas destacadas correspondem ao padrão de bandeamento do corante (intensidade de cor) DAPI nas respectivas regiões dos cromossomos..... 66
09. Perfil linear produzido após a captura de várias metáfases. As setas indicam as regiões cromossômicas onde o DNA genômico testado apresenta ganhos e/ou perdas..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Pág.
I. Classificação do tumor primário (T) para o câncer glótico.....	15
II. Classificação do tumor primário (T) para o câncer supraglótico.....	16
III. Classificação do tumor primário (T) para o câncer subglótico.....	17
IV. Denominação dos nódulos linfáticos regionais (N) para o carcinoma da laringe.....	18
V. Denominação dos nódulos linfáticos regionais (N) para o carcinoma da laringe.....	18
VI. Grupamento por estágio para o carcinoma da laringe.....	19
VII. Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O). Topografia: Laringe C32.....	20
VIII. Quinto dígito do código de morfologia para classificação das neoplasias.....	21
IX. Morfologia para os diversos tipos de tumores da laringe, com descrição e características.....	22

Avaliação Genético-Molecular do Carcinoma das Células Escamosas da Laringe

RESUMO

A laringe é uma estrutura tubular do trato aero digestivo com a principal função de formação de sons, além de estar relacionada com a proteção das vias aéreas inferiores e deglutição dos alimentos. Qualquer patologia que acomete este órgão pode ocasionar diversos problemas em sua função fisiológica normal, com influência plena e direta no decréscimo da qualidade de vida do indivíduo. Das diversas doenças que afetam a laringe, o câncer apresenta-se como uma das mais graves. O carcinoma de células escamosas da laringe apresenta-se como uma doença multifatorial e epigenética sendo influenciada por fatores ambientais, comportamentais e inerentes ao indivíduo. Este estudo avaliou 20 indivíduos portadores do carcinoma das células escamosas da laringe. Dentre dos parâmetros avaliados, destacam-se o polimorfismo do códon 72 do gene do gene *TP53*, a detecção e genotipagem do genoma de HPV, a instabilidade genômica (LOH e MIS) e alterações cromossômicas não balanceadas. Em relação ao polimorfismo de *TP53*, os resultados foram 65% (13/20) de homozigotos ($TP53^{AA}$) e 35% (7/20) de heterozigotos ($TP53^{PA}$). Em 20% dos pacientes foi observada a presença de genoma HPV associada às células tumorais, tendo sido genotipados os subtipos virais HPV 16 em uma amostra e HPV 11 e 45 na outra amostra, caracterizando uma co-infecção. Os dois casos positivos para HPV apresentaram genótipo homozigoto ($TP53^{AA}$) para o gene *TP53*. Os resultados deste estudo corroboram os dados publicados na literatura pertinente, que correlacionam a susceptibilidade aumentada para CEC da laringe em indivíduos homozigotos para

TP53Arg e a maior susceptibilidade destes à carcinogênese vírus-induzida. A instabilidade genômica foi avaliada utilizando um painel de 8 marcadores de microssatélites distribuídos em 5 cromossomos diferentes. Os *loci* D8S135 e RH-92600 foram considerados não informativos, pois se apresentaram homozigotos na maioria dos casos, enquanto que 76,2% (244/320) *loci* foram informativos. Contudo, a frequência de MIS foi de 9% (22/244) e a frequência de LOH de 6,1% (15/244). A frequência observada de MIS foi maior do que a frequência de LOH, sugerindo que o carcinoma das células escamosas da laringe segue o mecanismo “*fenótipo mutante*”. A hibridação genômica comparativa mostrou que a principal região cromossômica que apresentou ganhos foi em 1q21→qter, enquanto que as perdas cromossômicas ocorreram em 3p21→p28, 11q23, 16p16, 16q12, 17p13→pter e 22q13. As técnicas de hibridação genômica comparativa têm contribuído para melhorar a compreensão das alterações genéticas no carcinoma das células escamosas da laringe, sobretudo para a caracterização da relação entre estágios precursores de câncer laríngeo, assim como, para a identificação de regiões genômicas que podem conter oncogenes e genes supressores tumorais.

Assessing the Molecular and Genetic Aspects of Squamous Cell Carcinoma of the Larynx

ABSTRACT

The larynx is a structure of the upper aerodigestive tract responsible for the production of sounds as well as protecting the lower airways and helping during the normal act of swallowing. Any pathology which affects the larynx can impose several challenges that disrupt its normal physiological function, and consequently and directly resulting in reduction of the patient's quality of life. Among the different diseases that affect the larynx, cancer is one of the most serious. The squamous cell carcinoma (SCC) of the larynx is a multifactorial disease, influenced by environmental factors and individual behavioral, habits, and susceptibility. The current study describes the molecular and genetic assessment of 20 patients with the squamous cell carcinoma of the larynx. In summary, the study strategy included the analyses of the genetic polymorphism of codon 72 of the *TP53*, the detection and genotyping of HPV genome, assessing genomic instability (MIS and LOH) and random chromosomal imbalances using PCR and CGH approaches. Regarding to the polymorphism of the *TP53* gene, arginine homozygous genotypes (p53^{AA}) and arginine-proline heterozygous genotypes (p53^{PA}) were found in 65% (13/20) and 35% (7 / 20) of cases, respectively. HPV genome was found in association with tumor cells in 20% of SCC cases. HPV 16, 11, and 45 were the genotypes identified. Moreover, co-infection of HPV 11 and 45 was also observed. Both samples found positive for HPV genome were associated with p53^{AA} at the *TP53* gene. Our results corroborated the data published in the literature that described an

increased susceptibility to the virus-induced carcinogenesis of the larynx in arginine homozygous genotypes. Here in we report genomic instability for a panel of 8 microsatellite markers distributed in 5 chromosomes. One locus (D8S135) was found in homozygous for all cases. On the other hand, RH-92600 was not included in the analysis mainly because it was also found homozygous for most cases. We found 76.2% (244/320) of informative loci. Thus the mean frequency of MIS was 9.0% (22/244) and LOH was 6.1% (15/244). The frequency of MIS was found higher than the LOH, suggesting that the tumorigenesis of SCC of the larynx follows a mechanism of mutator phenotype. Using CGH, chromosomal gains were observed in 1q21→qter. On the other hand, chromosomal losses occurred in chromosome 3p21→p28, 11q23, 16p16, 16q12, 17p13→pter and 22q13. The techniques of comparative genomic hybridization have improved the understanding of genetic alterations in squamous cell carcinoma of the larynx, especially for characterizing the relationship between early precursors of laryngeal carcinomas, as well as to identify genomic regions that may contain oncogenes and tumor suppressor genes involved in the tumorigenesis of this anatomical site.

INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos acompanhados pela análise de dados demonstram que o câncer constitui um problema de saúde pública mundial, sendo a segunda causa de óbito mais freqüente na população adulta, atrás apenas dos problemas cardíacos (TONON *et al.*, 2007; CAIRNS, 1995).

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA/MS, 2008). A desordem no crescimento celular é resultante do acúmulo de alterações genéticas e/ou epigenéticas em genes que participam do controle do crescimento, proliferação, diferenciação, estabilidade e reparo do DNA, imunidade, quimio-resistência às drogas e morte celular programada (SOUSA, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2005; CAVALCANTE *et al.*, 2002).

O conceito de câncer como uma doença genética complexa é bem compreendido. Neste sentido, tem-se tornado cada vez mais evidente que todos os cânceres - mesmo na ausência de qualquer componente hereditário aparente - resultem de mutações em células somáticas e que a sua progressão também envolve a expressão de uma série de genes importantes para o controle da regulação dos processos celulares (THOMPSON *et al.*, 1993; HOLLSTEIN *et al.*, 1991).

Segundo PISANI e colaboradores (2000) os tumores de cabeça e pescoço pela expressividade, incidência, morbidade, mortalidade e alta letalidade, representam um relevante problema de saúde pública no mundo, particularmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil. O conjunto de tumores da cavidade oral, faringe e laringe representam cerca de 90% de todos os cânceres incidentes na região anatômica da cabeça e pescoço.

Os cânceres da cavidade oral e da faringe contribuem com 7% dos casos novos de câncer no mundo, com cerca de 270.000 casos estimados por ano entre os homens e 143.000 entre as mulheres (BOFFETA *et al.*, 2000; PARKIN *et al.*, 1993). Assim sendo, estas neoplasias representam a quinta maior frequência de câncer entre os homens e a sétima entre as mulheres. O tratamento desta doença promove mudanças importantes nas atividades diárias dos pacientes, em muitos casos, com conseqüências severas que reduzem a qualidade de vida dos indivíduos afetados por esta doença (MELERCA *et al.*, 2003).

O carcinoma da laringe é responsável por uma incidência, aproximadamente, de 136.000 novos casos e de 73.500 mortes por ano no mundo, ocorrendo predominantemente no sexo masculino, que representa cerca de 2% de todos os casos de câncer e 2,2% dos óbitos por câncer (DIAS *et al.*, 2001; PARKIN *et al.*, 1993).

BARROS (2004) afirma que apesar dos constantes progressos na detecção das causas da etiologia, patogênese e no prognóstico dos carcinomas da laringe, o tema ainda necessita de elucidação. Neste contexto, os estudos genético-moleculares que investigam mutações associadas aos genes correlacionados à iniciação e progressão dos carcinomas de cabeça e pescoço, inclusive os laríngeos, consistem em importantes ferramentas para se investigar os mecanismos carcinogênicos subjacentes ao desenvolvimento tumoral.

Deste modo, um melhor entendimento dos papéis dos genes supressores de tumor e dos oncogenes nos mecanismos relacionados com os processos de diferenciação celular, contribuem uma melhor compreensão da gênese dos carcinomas de cabeça e pescoço (OLIVEIRA, 2005).

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Considerações Históricas

Os primeiros estudos relevantes sobre a origem e desenvolvimento do câncer surgiram a partir de 1890, quando o patologista alemão David Von Hanseemann observou irregularidades nucleares e mitóticas estudando biópsias de carcinomas.

Estas observações iniciais contribuíram para que, em 1914, Theodor Boveri apresentasse à comunidade da época, a Teoria Clonal do Câncer que basicamente postulava que tumores malignos freqüentemente desenvolvem-se como um clone originado de uma célula cromossomicamente anormal (MITELMAN, 2000).

Entretanto, foi somente a partir dos anos 60 que os estudos das células neoplásicas evoluíram e esta hipótese pôde ser comprovada, constituindo-se com um marco inicial, a descrição do cromossomo *Philadelphia* (Ph^1) nas leucemias mielóides crônicas (NOWELL & HUNGERFORD, 1960), confirmando a hipótese de Boveri.

A indicação de que alterações cromossômicas nos tumores de tecidos sólidos, assim como nas leucemias, não ocorriam ao acaso foi primeiramente descrita por LEVAN (1966) e VAN STEENIS (1966). Independentemente, aqueles autores analisaram formas ascíticas de tumores gástricos, mamários, uterinos e ovarianos e encontraram determinados cromossomos que apareciam em número aumentado e outros estavam faltando de forma sistemática nos cariótipos.

No início da década de 70, após a introdução das técnicas citogenéticas de bandeamento cromossômico humano (CASPERSSON *et al.*, 1970), a sub-área da citogenética e câncer apresentou um rápido e notável desenvolvimento, contribuindo de forma extraordinária para o esclarecimento do papel das aberrações cromossômicas associadas à oncogênese. Adicionalmente, o conhecimento sobre os

cromossomos possibilitou a formulação de novos conceitos sobre a etiologia genética do câncer. Os métodos de genética e citogenética moleculares, estes baseados na hibridação *in situ* por fluorescência dos cromossomos, proporcionaram nas últimas décadas, avanços no mapeamento gênico. Atualmente ampliaram o poder resolutivo da investigação cromossômica e se tornaram ferramentas mais sofisticadas e eficientes para a identificação das aberrações cromossômicas em neoplasias (SANTOS, 2007).

Nos últimos 25 anos, os estudos de citogenética clássica e molecular revelaram mais de 600 rearranjos cromossômicos balanceados associados a neoplasias, e atualmente, estão descritos mais de 100 genes envolvidos em rearranjos que podem estar associados a doenças neoplásicas (MITELMAN, 2000).

Entretanto, estes achados resultam, na maioria das vezes, do estudo de neoplasias hematopoiéticas, caracterizando uma desproporção quanto aos estudos citogenéticos em tumores de tecidos sólidos, que constituem menos de um terço dos estudos realizados em cânceres humanos (SANTOS, 2007).

Os tumores sólidos, por outro lado, são os mais freqüentes no sexo masculino e responsáveis por uma importante morbidade e mortalidade da população mundial. A quantidade limitada de estudos citogenéticos nos tumores de tecido sólido em relação aos hematopoiéticos se deve a vários fatores, incluindo os de origem metodológica: a obtenção e a qualidade cromossômica são, normalmente, insatisfatórias, principalmente em neoplasias epiteliais; ao contrário das doenças hematológicas, a maioria dos tumores sólidos já apresenta, no diagnóstico, uma grande quantidade de aberrações cromossômicas adquiridas durante a progressão do tumor.

Deste modo, mesmo quando a qualidade dos cromossomos é satisfatória e cada anormalidade pode ser caracterizada, a diferenciação entre aberrações primárias, patogenticamente essenciais, e aberrações evolutivamente secundárias é mais difícil de ser identificada em tumores de tecidos sólidos do que em neoplasias do tecido hematopoiético (SANTOS, 2007). Por fim, um número crescente de tumores epiteliais, em particular carcinomas de pâncreas, pele e mama, parece estar caracterizado por uma alta hereterogeneidade cariotípica clonal (MITELMAN, 2000).

2.2. Laringe: Aspectos Histológicos & Anatômicos

A laringe está situada no plano mediano e anterior do pescoço, diferenciando por apresentar-se como um órgão tubular da via aérea superior, de consistência multcartilaginosa, revestida por tecido epitelial, posicionada anteriormente à faringe e continuada diretamente pela traquéia (DA PENHA & SILVA, 2001). Segundo DÂNGELO & FATINI (2000), a laringe é anatomicamente dividida em três regiões distintas:

- A região supraglótica é caracterizada pela face laríngea da epiglote, pelas pregas ariepiglóticas, pelas falsas pregas vocais e pelos ventrículos laríngeos ou ventrículos de Morgangi, notando-se que o soalho do ventrículo é parte da região glótica, enquanto sua parede lateral e teto estão na supraglote. O termo epilaringe tem sido usado para designar o conjunto de duas porções marginais da supraglote: a porção suprahiódea da epiglote e as pregas ariepiglóticas (ABRAHÃO *et al.*, 2000).

- A região glótica é constituída pela parte intermediária da laringe, onde se localizam as cordas vocais verdadeiras. O seu limite superior é delimitado pelo plano horizontal que passa junto ao soalho do ventrículo, e seu limite inferior é o plano horizontal que passa logo abaixo de seu limite superior.
- A região subglótica é caracterizada pela porção mais distal da laringe que se estende imediatamente abaixo da borda livre da corda vocal verdadeira – borda inferior da glote, e termina na borda livre da corda traqueal – superfície inferior da cartilagem cricóide.

A sustentação anatômica da laringe é feita pela ação de suas cartilagens, conforme mostra a Figura 1. Há um total de seis cartilagens diferentes que constituem parte da laringe, sendo que três ocorrem bilateralmente, totalizando, assim, nove cartilagens. São elas: tireóide, cricóide, epiglote, aritenóides, corniculadas, cuneiformes.

As cartilagens tireóide, cricóide e aritenóide são de consistência hialina, as outras são de consistência elástica (CURADO, 2000).

A cartilagem tireóide apresenta duas lâminas, que se fundem anteriormente. Estas lâminas são responsáveis pela formação de uma projeção mediana, denominada proeminência laríngea. Na região posterior, as lâminas seguem direções opostas e emitem projeções no sentido superior e inferior, denominadas, respectivamente, cornos superiores e inferiores. Cada um dos cornos inferiores apresenta uma faceta medial responsável pela articulação da cartilagem tireóide com a cartilagem cricóide.

Os cornos superiores unem-se à extremidade do corno maior do osso hióide. Na parede lateral da cartilagem tireóide observa-se um ponto de inserção para os músculos constritores interior da faringe, esternocleidomastóideo e tíreo-hióideo, denominado linha oblíqua (MOUSSAULLE *et al.*, 1997).

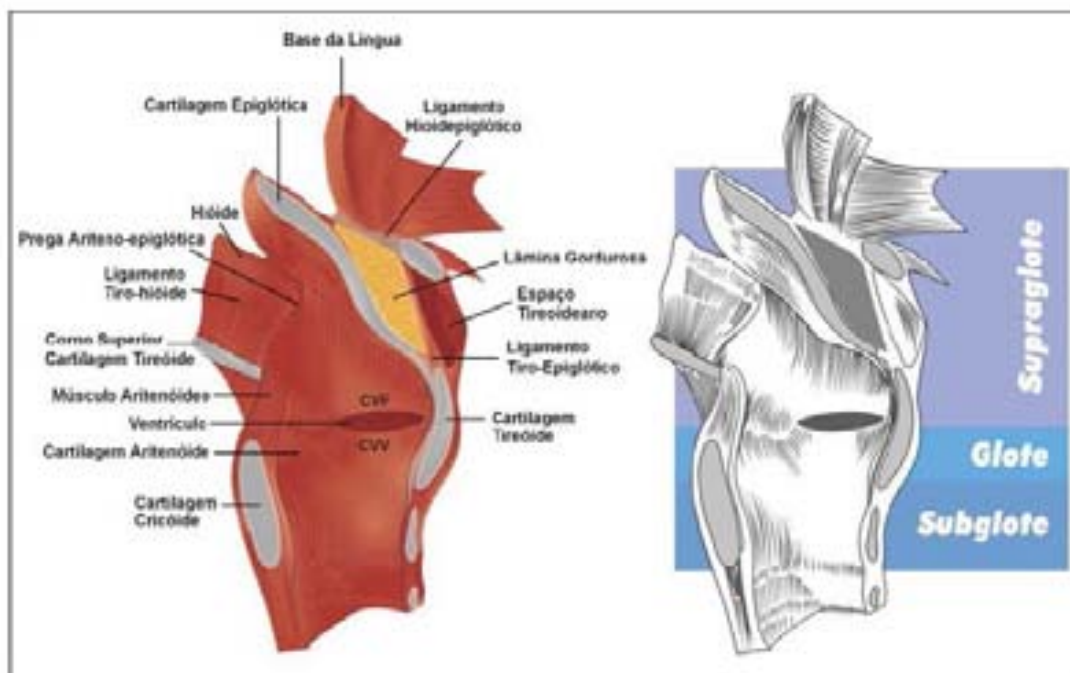


Figura 1. Desenhos esquemáticos da laringe, destacando as principais partes do órgão e as três regiões anatômicas: supraglote, glote e subglote. CVF: Cordas Vocais Falsas; CVV: Cordas Vocais Verdadeiras. SILVA, 2003.

A cartilagem cricóide se apresenta com um formato semelhante ao de um anel de sinete e se localiza no mesmo nível da sexta vértebra cervical, apresentando uma porção estreita anteriormente, denominada arco. Na porção posterior, o arco alarga-se, formando a lâmina cricóide. Na borda superior da lâmina cricóide existem duas facetas articulares, uma à esquerda e outra à direita, em relação às cartilagens aritenóides.

Na superfície posterior da lâmina verifica-se uma depressão bilateral, promovida pela inserção do músculo cricoaritenóideo posterior. Na região mediana

desta superfície aparece uma crista decorrente da inserção do esôfago, através do tendão cricoesofágico. A borda inferior da lâmina cricóide demarca o limite entre a laringe e a traquéia, assim como o limite entre a faringe e o esôfago. De cada lado, a cartilagem cricóide apresenta uma faceta lateral de articulação com o corno inferior da cartilagem tireóide (DÂNGELO & FATINI, 2001).

A cartilagem epiglótica se encontra posteriormente à raiz da língua e ao osso hióide, e anteriormente ao adito da laringe. As cartilagens aritenóides apresentam morfologia piramidal, com três superfícies: medial, posterior e antero-lateral, além do ápice e da base. As cartilagens corniculadas e cuneiformes estão localizadas junto às pregas ariteno-epiglóticas, onde as cartilagens cuneiformes ocupam a porção mais anterior quando comparadas com as cartilagens corniculadas (MOUSSALEE *et al.*, 1997).

Os tipos epiteliais presentes na laringe são: O epitélio escamoso estratificado, que recobre a superfície do vestíbulo laríngeo – região da glote, toda a extensão das cordas vocais, denominadas pregas ariteno-epiglóticas e os ligamentos vestibulares e vocais. O epitélio pseudoestratificado ciliar colunar que recobre o restante da laringe (DÂNGELO & FATINI, 2001). A maioria dos tumores que acometem a laringe surge na superfície desses epitélios, por isso, são denominados carcinomas de células escamosas (CCE) ou carcinomas espinocelulares (CEC).

Tumores diferentes podem acometer outros tecidos além do tecido epitelial, como por exemplo, o tecido cartilaginoso intensamente presente na laringe. Condrossarcomas e condromas são denominações habitualmente utilizadas para tumores malignos e benignos em cartilagem, respectivamente. Estes tumores são mais

raros do que os tumores epiteliais e a cartilagem cricóide é a mais acometida (THOMÉ *et al.*, 2001).

Fisiologicamente, a laringe é o órgão responsável pela geração da voz, pela proteção das vias aéreas inferiores contra substâncias estranhas, facilitando a tosse, mecanismo de expulsão do corpo estranho e no auxílio da deglutição dos alimentos. Qualquer patologia deste órgão causa distúrbios fisiológicos, que acarretam impacto na qualidade de vida do indivíduo.

Das diversas patologias que afetam a laringe, o câncer apresenta-se como uma das mais graves. O carcinoma de células escamosas, neoplasia mais comum que acomete este órgão, é uma doença multifatorial e multigênica, sendo influenciada por fatores ambientais e comportamentais inerentes ao indivíduo (OLIVEIRA, 2005).

2.3. Carcinoma de Células Escamosas da Laringe: Uma Condição Clínica Desafiadora

Os primeiros sintomas descritos por pacientes que apresentam câncer laríngeo são odinofagia e rouquidão prolongada, o que sugere tumores na região glótica e subglótica. O câncer supraglótico está, muitas vezes, acompanhado por sinais e sintomas como, alteração na qualidade da voz, disfagia leve, sensação de um *caroço* na garganta e linfadenopatias. Em situações avançadas, além da rouquidão, podem ocorrer dores na garganta, intensa disfagia e dispnéia (INCA/MS, 2004).

O exame clínico de tumores que acometem a região da cabeça e pescoço avalia principalmente a extensão loco-regional do tumor, identificando a presença de outros tumores primários nesta região, assim como a detecção de metástases para linfonodos

regionais. O tamanho e a localização do tumor são os parâmetros mais bem observados para o carcinoma da laringe. O tempo que marca o início dos sintomas e a presença de nódulo cervical são os principais fatores que definem o diagnóstico clínico das neoplasias da laringe (KOWALSKI *et al.*, 2000).

O exame loco-regional compreende a laringoscopia indireta, rinoscopia anterior e posterior, oroscopia e palpação do pescoço. Para uma confirmação diagnóstica, a laringoscopia direta com biópsia deve ser realizada quando o exame indireto não permite uma melhor elucidação clínica (DIAS *et al.*, 2001; KOWALSKI *et al.*, 2000).

2.3.1. Epidemiologia do Carcinoma da laringe

Segundo PISANI e colaboradores (2000) os tumores de cabeça e pescoço pela expressividade, incidência e mortalidade, assim como pela alta letalidade, representam um relevante problema de saúde pública no mundo, particularmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil.

O conjunto de tumores da cavidade oral, faringe e laringe representam cerca de 90% de todos os cânceres incidentes na região anatômica da cabeça e pescoço. Os cânceres da cavidade oral e da faringe contribuem com 7% dos casos novos de câncer no mundo, com cerca de 270.000 casos estimados por ano entre os homens e 143.000 entre as mulheres (PARKIN *et al.*, 1993).

Assim sendo, as neoplasias afetam a cabeça e o pescoço representam a quinta maior frequência de câncer entre os homens e a sétima entre as mulheres. O tratamento desta doença promove mudanças importantes nas atividades diárias dos

pacientes, em muitos casos, com conseqüências severas que reduzem a qualidade de vida dos indivíduos afetados por esta doença (MELERCA *et al.*, 2003).

O câncer da laringe é responsável por uma incidência, aproximadamente, de 136.000 novos casos e de 73.500 mortes por ano no mundo, representando cerca de 2% de todos os casos de câncer (DIAS *et al.*, 2001). Em nosso país os tumores malignos da laringe correspondem, aproximadamente, a 8.000 novos casos por ano e a 2,2% dos óbitos por câncer (INCA/MS, 2005).

No Brasil, os tumores da laringe acometem principalmente, pacientes com idade entre 50 e 70 anos, sendo mais comum em indivíduos do sexo masculino (INOUE *et al.*, 2004; WUNSCH-FILHO, 2004).

Um estudo epidemiológico realizado em Goiânia/GO por SILVA (2003), no período de 1988 a 1998, mostrou que o câncer de laringe era 4,7 vezes mais freqüente em homens que em mulheres. Este fato deve-se, provavelmente, aos hábitos de tabagismo e etilismo, mais predominantes no sexo masculino, e correspondendo aos fatores de risco que mais contribuem para a carcinogênese deste órgão (MENEZES *et al.*, 2002; AUSTIN & REYNOLDS, 1996).

Dados do Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia/GO apresentam uma taxa de incidência do câncer da laringe em homens de 5,2/100.000 habitantes, inferior a encontrada na população mundial de 8,8/100.000 habitantes. Para o sexo feminino, o quadro foi inverso, o coeficiente chega a 0,34/100.000 habitantes, sendo o coeficiente mundial de 0,24/100.000 habitantes.

A taxa de mortalidade para homens foi de 1,15/100.000 habitantes e para mulheres foi de 0,46/100.000 habitantes em Goiânia/GO. Ambas as taxas

apresentaram-se menores quando comparadas com as taxas de mortalidades mundiais de 1,76 e 0,67/100.000 habitantes, para homens e mulheres, respectivamente (ACCG, 2003).

2.3.2. Estadiamento do Tumor

O sistema TNM de classificação dos tumores utiliza informações acerca da extensão do *tumor primário* (T), da *ausência ou presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais* (N) e de possíveis *metástases à distância* (M).

Em relação ao estadiamento, o sistema TNM para a classificação dos tumores malignos foi desenvolvido por Pierre Denoix, na França, entre os anos de 1943 a 1952. Em 1950, a União Internacional Contra o Câncer (UICC) adotou e assumiu a responsabilidade sobre esse sistema (UICC, 2005). Segundo NORONHA & DIAS (1997), a definição do estadiamento TNM constitui a base para a orientação terapêutica do câncer de cabeça e pescoço. A designação de T, comum para qualquer sítio anatômico da laringe, é: (a) Tx: Tumor primário não pode ser avaliado; (b) T0: Não há evidência do tumor primário e (c) Tis: Carcinoma *in situ*. Neste caso, as células tumorais estão limitadas ao epitélio e não existindo crescimento celular para dentro de outros tecidos da laringe. Poucos pacientes são diagnosticados neste estágio inicial. Outras determinações de estadiamento para o tumor, no caso do câncer da laringe, são distintas para cada uma das três regiões anatômicas deste órgão (NORONHA & DIAS, 1997).

Os tumores glóticos são aqueles localizados na altura das pregas vocais, sendo que se manifestam e freqüentemente por meio da rouquidão, um forte sinal clínico,

que se diagnosticado precocemente, 67% dos pacientes podem apresentar um prognóstico favorável com sobrevida de 5 anos e taxas de cura acima de 90% (APRIGLIANO & MELLO, 2006). A Tabela I apresenta a descrição da classificação do tumor primário para o câncer glótico segundo OLIVEIRA (2005).

Tabela I. Classificação do tumor primário (T) para o câncer glótico.

Classificação	Descrição do Tumor
T1	Tumor confinado a(s) prega(s) vocal(is), podendo estender-se à comissura anterior ou posterior, com mobilidade normal
T1a	Tumor confinado a uma prega vocal
T1b	Tumor compromete ambas as pregas vocais
T2	Tumor estende-se a supraglote e/ou subglote, e/ou com mobilidade diminuída da prega vocal
T3	Tumor confinado à laringe com fixação da prega vocal
T4a	Tumor que invade completamente a cartilagem tireóide, ou estende-se aos tecidos além da laringe
T4b	Tumor que invade o espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacente a artéria carótida

Fonte: Oliveira, 2005

Acima da região glótica, encontra-se a região supraglótica, que apresenta um fenótipo mais agressivo, sendo a odinofagia e disfagia as queixas mais comuns dos pacientes. Adicionalmente, nessa região pode ocorrer a formação de nódulo cervical ou otalgia nos casos mais avançados.

A região supraglótica apresenta cinco sub-regiões anatômicas, que são: Ventrículo ou falsas pregas vocais; Aritenóides; Epiglote suprahiódea; Epiglote infraiódea e Pregas ariteno-epiglóticas.

Assim, o estadiamento para T, no caso do câncer supraglótico, é baseado no número de sub-regiões envolvidas e na extensão para outros sítios, conforme apresentado na Tabela II (OLIVEIRA, 2005). Na porção inferior estão localizados os tumores subglóticos, mais raros, que cursam com dispnéia e estridor.

Tabela II. Classificação do tumor primário (T) para o câncer supraglótico.

Classificação	Descrição do Tumor
T1	Tumor confinado a uma sub-região da supraglote com mobilidade normal da corda vocal
T2	Tumor invade mais de uma sub-região da supraglote ou glote, com mobilidade normal da corda vocal
T3	Tumor confinado à laringe com fixação da corda vocal e/ou invasão para área pós-cricóideia, parede medial do seio piriforme ou gordura pré-epiglótica
T4a	Tumor que invade toda a cartilagem tireóide e/ou estende-se aos tecidos além da laringe
T4b	Tumor que invade o espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacente a artéria carótida.

Fonte: Oliveira, 2005

Os tumores transglóticos cruzam verticalmente o ventrículo e envolvem a glote e a supraglote (KOWALSKI *et al.*, 2000). A descrição da classificação do tumor primário (T) para o câncer subglótico é descrito na Tabela III (OLIVEIRA, 2005).

Tabela III. Classificação do tumor primário (T) para o câncer subglótico.

Classificação	Descrição do Tumor
T1	Tumor confinado a subglote
T2	Tumor estende-se à(s) prega(s) vocal(is), com mobilidade normal ou diminuída
T3	Tumor confinado à laringe com fixação da prega vocal
T4a	Tumor que invade a cartilagem cricóide ou tireóide e/ou estende-se a outros tecidos além da laringe
T4b	Tumor que invade o espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacente a artéria carótida.

Fonte: Oliveira, 2005

No Projeto Diretrizes, divulgado pela Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (SBCCP) juntamente com a Associação Médica Brasileira (AMB) e Conselho Federal de Medicina (CFM), a fim de padronizar condutas que auxiliem o raciocínio e a tomada de decisão do médico orienta a utilização da denominação dos nódulos linfáticos regionais acometidos (N) comuns para todos os sítios anatômicos da laringe. Esta orientação está apresentada na Tabela IV (DIAS *et al.*, 2001). A denominação de metástases à distância (M) também é comum para todos os sítios anatômicos.

Uma vez determinado o tamanho do tumor (T), a quantidade e a dimensão dos nódulos linfáticos acometidos (N) e a presença ou ausência de metástase à distância (M), estas informações são combinadas, gerando assim o grupamento por estágio.

A Tabela V apresenta esta denominação segundo OLIVEIRA (2005), enquanto que a Tabela VI apresenta o grupamento por estágio para o câncer da laringe (OLIVEIRA, 2005).

Tabela IV. Denominação dos nódulos linfáticos regionais (N) para o carcinoma da laringe.

Classificação	Descrição do Tumor
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de linfonodos regionais acometidos
N1	Acometimento de linfonodo único homolateral, com 3 cm ou menos na sua maior dimensão
N2	Acometimento de linfonodo único homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão, ou de linfonodos múltiplos homolaterais, onde nenhum tenha mais que 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, onde nenhum tenha mais de 6 cm na sua maior dimensão
N2a	Acometimento de linfonodo único homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão
N2b	Acometimento de linfonodos múltiplos homolaterais, onde nenhum tenha mais que 6 cm em sua maior dimensão
N2c	Acometimento de linfonodos bilaterais ou contralaterais, onde nenhum tenha mais de 6 cm na sua maior dimensão
N3	Acometimento de um linfonodo com mais de 6 cm em sua maior extensão

Fonte: Oliveira, 2005

Tabela V. Denominação dos nódulos linfáticos regionais (N) para o câncer da laringe.

Classificação	Descrição do Tumor
MX	Condições mínimas para avaliar a presença de metástase à distância não podem ser evidenciadas.
M0	Ausência de metástases à distância.
M1*	Presença de metástases à distância.

Fonte: Oliveira, 2005

* A categoria M1 pode ser especificada pelas notações: PUL – pulmonar; OSS – ósseo; HEP – hepática; CER ou BRA – cerebral; LIN ou LYM – linfonodos; MED – medula óssea; PLE – pleura; PER – Peritoneal; CUT ou SKI – pele e OUT ou OTH – outros.

Tabela VI. Grupamento por estágio para o câncer da laringe.

Estádio	Sistema de Estádio		
	T	N	M
0	0	0	0
I	1	0	0
II	2	0	0
III	3	0	0
	*	1	0
IV	4	0 ou 1	0
	*	2 ou 3	0
	*	*	1

* T ou N podem assumir qualquer valor.

Fonte: Oliveira, 2005

2.3.3. Classificação Internacional da Doença

Nos últimos anos, a Classificação Internacional de Doença (CID) vem sendo utilizada pelos países membros da Organização Mundial de Saúde (OMS), inclusive o Brasil, para a codificação e tabulação de dados de morbidade e mortalidade.

Recentemente, a CID também tem sido usada em prontuários médicos com o objetivo de guardar e recuperar dados importantes na compreensão da evolução doença (PERCY *et al.*, 1996).

A Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O) é uma ampliação do capítulo sobre neoplasias da 9ª revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-9).

A CID-O permite a codificação de todas as neoplasias por topografia, histologia ou morfologia e comportamento biológico, como por exemplo, maligno, benigno, *in situ*, incerto se benigno ou maligno e metastático. No entanto, CID-O não apresenta

códigos para outros tipos de informação, como: estadiamento clínico, extensão da doença, lateralidade, método de diagnóstico e tratamento.

A Tabela VII apresenta uma classificação internacional de doenças para o câncer da laringe (PERCY *et al.*, 1996).

Tabela 7. Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O). Topografia: Laringe C32.

Topografia	Regiões	CID-0
	Prega vocal (verdadeira, SOE*)	
Glote	Laringe intrínseca	C32.0
	Comissura laríngea	
	Banda ventricular da laringe	
	Pregas vocais falsas	
Supraglote	Epiglote, SOE (exceto face anterior da epiglote C10.1)	C32.1
	Laringe extrínseca	
	Prega ariteno-epiglótica, face laríngea	
	Face superior da epiglote	
Subglote		C32.2
	Aritenóide	
Cartilagens Laríngeas	Cricóide	C32.3
	Cuneiforme	
	Tireóide	
Lesão Sobreposta da Laringe		C32.8
Laringe, SOE		C32.9

* SOE: Sem outras especificações.

Fonte: Oliveira, 2005

A Tabela VIII apresenta o código destinado à classificação morfológica das doenças neoplásicas. Este código é constituído por cinco dígitos, dos quais, os quatro números iniciais indicam o tipo histopatológico específico e o quinto dígito, após a barra, refere-se ao comportamento biológico (OLIVEIRA, 2005).

Tabela VIII. Quinto dígito do código de morfologia para classificação das neoplasias.

Código (5º dígito)	Comportamento Biológico do Tumor
/ 0	Benigno
/ 1	Incerto se benigno ou maligno
	Malignidade limítrofe (<i>borderline</i>)
	Baixo potencial de malignidade
/ 2	Carcinoma <i>in situ</i>
	Intra-epitelial
	Não-infiltrativo
	Não-invasivo
/ 3	Maligno, localização primária
/ 6	Maligno, localização metastática
	Maligno, localização secundária
/ 9	Maligno, incerto se primário ou metastático

Fonte: Oliveira, 2005

No caso específico do carcinoma da laringe, onde os epitélios são mais freqüentemente acometidos, é classificado morfologicamente como *carcinoma espinocelular*. De acordo com o grau de comprometimento e o comportamento biológico do tumor, o CEC recebe número ou nomes para especificar tais condições. Segundo OLIVEIRA (2005) a Tabela IX apresenta as características destes tumores.

Antes de iniciar qualquer forma de tratamento do câncer, primeiramente deve se considerar alguns fatores importantes: o tipo e a extensão do carcinoma, idade, estado geral de saúde e decisões individuais do paciente. Neste sentido, a escolha do tratamento envolve o paciente e uma equipe multidisciplinar, constituída por médicos oncologistas, cirurgiões, radioterapeutas além de outros profissionais, tão importantes quanto os médicos, como os fonoaudiólogos, psicólogos e assistentes sociais que auxiliam os pacientes na tomada de decisões (ACS, 2002).

Tabela IX. Morfologia para os diversos tipos de tumores da laringe, com descrição e características.

Morfologia	Descrição	Característica
CEC <i>in situ</i>	Carcinoma Espinocelular <i>in situ</i>	Intra-epitelial
CEC I	Carcinoma Espinocelular de Grau I	Muito diferenciado
CEC II	Carcinoma Espinocelular de Grau II	Moderadamente diferenciado
CEC III	Carcinoma Espinocelular de Grau III	Pouco diferenciado
CEC Invasivo	Carcinoma Espinocelular Invasivo	Acomete tecidos próximos
CEC Metastático	Carcinoma Espinocelular Metastático	Carcinoma secundário
CEC SOE	Carcinoma Espinocelular sem outras especificações	Tumor epitelial maligno

Fonte: Oliveira, 2005

Atualmente, são utilizadas diferentes modalidades de tratamento para o câncer da laringe, resumidas em três grupos:

1. A radioterapia é indicada para pacientes em estádios iniciais da doença, onde a presença de pequenas lesões pode ser observada. Esta é a mais importante estratégia de controle locorregional do tumor.
2. Os procedimentos cirúrgicos são indicados para os casos mais avançados da doença, podendo ser dividida em duas categorias: a laringectomia parcial, que remove apenas parte da laringe e a laringectomia total, que consiste na remoção total da laringe. A cirurgia é considerada um tratamento agressivo, podendo o paciente, inclusive, perder a voz completamente. Segundo dados do INCA, cerca de apenas 30% dos pacientes laringectomizados são capazes de desenvolver uma voz esofágica inteligível e 50% deles se retiram do convívio social, chegando a perder o emprego.

3. A quimioterapia é normalmente utilizada em casos de metástases, com intuito paliativo.

As três categorias de tratamento podem ser combinadas de acordo com as necessidades de cada paciente (DIAS *et al.*, 2001; INCA/MS, 1992).

2.4. Condições que Predispõe ao Carcinoma da laringe

Incontestavelmente, as formas de exposição humana, ocupacional, acidental e comportamental, aos agentes desencadeantes de tumores estão relacionadas com situações de risco.

Na maioria das vezes, podemos classificar os fatores de risco como exógenos e endógenos. Dentre os fatores exógenos, o tabagismo e o etilismo estão fortemente associados ao desenvolvimento de neoplasias, sendo os mais bem conhecidos e estabelecidos para o carcinoma da laringe (IARC, 2002; AUSTIN & REYNOLDS, 1996).

2.4.1. Tabagismo & Etilismo: Uma forte associação com os tumores da laringe.

A fumaça do cigarro, quando processada, possui em média 4.000 produtos químicos, nos quais se incluem mais de uma centena de substâncias carcinogênicas, entre elas se encontram as nitrosaminas tabaco-específicas, aminas aromáticas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, mais conhecidos como PAHs (do inglês, *polycyclic aromatic hydrocarbon*).

Dentre os PHAs, o benzopireno é o exemplo mais conhecido e está representado na Figura 2, (HECHT, 2003).

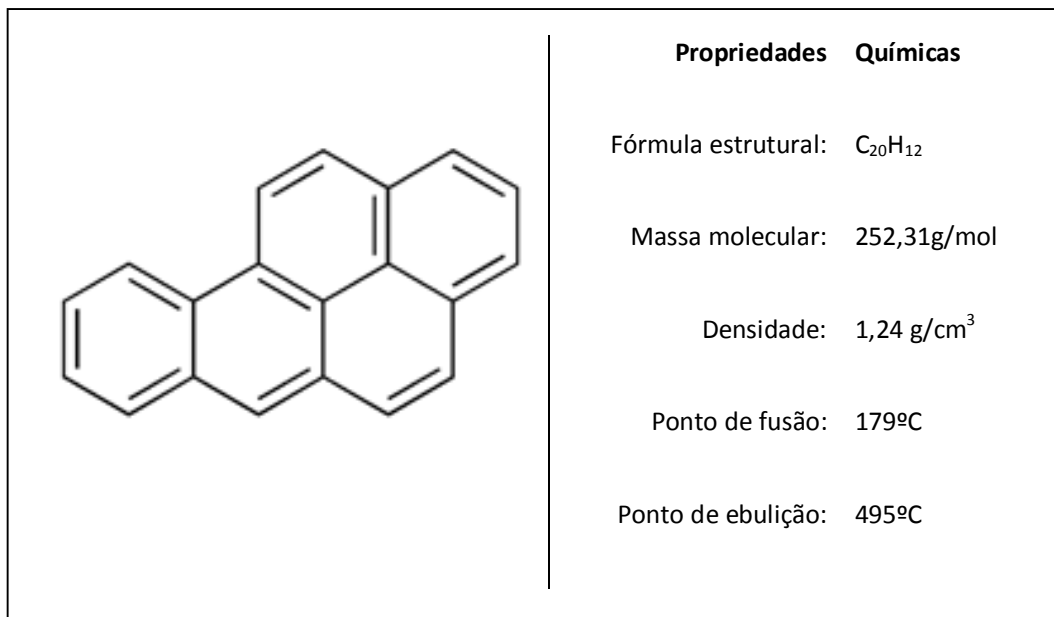


Figura 2. Benzopireno – Hidrocarboneto Policíclico Aromático (PAH) e suas propriedades químicas (HECHT, 2003).

Em especial, o benzopireno é reconhecido como um potente agente cancerígeno, formado pela combustão incompleta do tabaco, hulha e óleo. Está presente no alcatrão da fumaça do cigarro e pode ser o fator que relaciona o ato de fumar com o câncer de pulmão, laringe e da cavidade oral e, possivelmente câncer de bexiga e pâncreas.

O benzopireno e outros hidrocarbonetos polinucleares estão também presentes em carnes fortemente grelhadas sobre carvão e em peixe defumado, assim como na atmosfera sobre as grandes cidades, onde eles estão como poluentes do ar (CANEVARI & ROGATTO, 2004).

Adicionalmente, encontram-se presentes na fumaça resultante da queima do tabaco: urânio, tório, polônio-210, potássio-40, bismuto-212, bismuto-214, chumbo-212, chumbo-214, céσιο-134, céσιο-137, acroleína-228 e plutônio. Todas as espécies químicas citadas são substâncias radioativas fortemente associadas à agressão celular (WILLCOX, 1997; KILTHAN, 1996, RAJEWSKY *et al.*, 1996).

O risco de desenvolvimento de neoplasia é 14,3 vezes maior em indivíduos que fumam em comparação com os que não fumam (DIAS *et al.*, 2001). Os efeitos do tabaco e do álcool na iniciação e promoção de carcinoma da laringe já foram demonstrados em estudos conduzidos na América do Norte, Europa, Índia e América do Sul (DE STEFANI *et al.*, 1987). O risco de carcinoma laríngeo apresentou-se aumentado entre os fumantes que faziam seus próprios cigarros, quando comparados com fumantes de cigarros manufacturados (INOUE *et al.*, 2004; DE STEFANI *et al.*, 1992).

DE STEFANI e colaboradores (1987) conduziram um estudo no Uruguai, que revelou um efeito potente do fumo reverso - hábito de fumar com a brasa do cigarro na boca, quando comparado com o fumo branco - maneira usual de fumar. De modo similar, os efeitos do uso crônico de vinho tinto e de licor destilado também aumentam o risco oncogênico.

O tabagismo e o etilismo, quando combinados, possuem uma forte relação dose-resposta com o risco de câncer laríngeo (TALAMINI *et al.*, 2002). O risco relativo de desenvolver câncer de laringe em indivíduos tabagistas e etilistas crônicos é aumentado de cerca de 100 vezes em relação aos indivíduos que não consomem álcool e nem cigarro (ACS, 2002; DIAS *et al.*, 2001).

Adicionalmente, a exposição ao vapor de ácidos inorgânicos fortes foi considerada um carcinógeno ocupacional importante para o desenvolvimento do câncer de laringe (IARC, 1992). O consumo de álcool age como fator exógeno de grande relevância para o carcinoma da laringe. O seu uso crônico poderá ocasionar sérias deficiências nutricionais, aumentando a suscetibilidade aos carcinógenos ambientais e promovendo a supressão imunológica.

Adicionalmente, o álcool atua como solvente orgânico de carcinógenos e facilita a penetração destes nos tecidos-alvos. Embora seja desconhecido o mecanismo pelo qual o álcool induz a carcinogênese, há evidências de que o acetaldeído, o primeiro metabólito após a ingestão do álcool, tem um papel crítico no desenvolvimento dos cânceres relacionados ao álcool (LAZARUS, 2000).

As células basais e epiteliais dos cânceres do trato aerodigestivo superior devem também ser alteradas por concentrações de etanol diretamente na mucosa exposta e, subseqüentemente, por concentrações mais altas de carcinógenos e pró-carcinógenos (OLIVEIRA, 2005).

Outra situação potencialmente associada ao aumento no risco relativo de câncer laríngeo é a exposição aos asbestos. Entretanto, os estudos sobre esta associação ainda são controversos e dependem de maiores investigações (MARCZYNSKI *et al.*, 2000; AUSTIN & REYNOLDS, 1996). Inúmeros agentes adicionais, incluindo níquel, cromo e pó de madeira têm sido implicados na iniciação e promoção do câncer da laringe (CALVERT *et al.*, 1998; MAIER *et al.*, 1997).

Dentre os grupos de indivíduos ocupacionalmente expostos, fazendeiros, trabalhadores da indústria têxtil, abatedores de frigoríficos, preparadores de

alimentos, aviadores agrícolas e mecânicos têm um risco aumentado, quando comparados a outros grupos de trabalhadores, para o carcinoma da laringe (BOFFETTA *et al.*, 2000; GUBERAN *et al.*, 1993).

A ingestão freqüente de frutas e verduras é provavelmente um fator protetor contra o carcinoma da laringe (WCRF/AICR, 1997). A carne de peixe, leite e seus derivados têm demonstrado um efeito protetor em alguns estudos (DE STEFANI *et al.*, 1999), enquanto o consumo de carne vermelha tem sido associado a um aumento no risco de câncer (TAVANI *et al.*, 2000). No entanto, a evidência do efeito do consumo de carne de peixe, leite e carne vermelha ainda são inadequadas (WCRF/AICR, 1997). A ingestão de mate tem sido associada ao aumento do risco de carcinoma da laringe em estudos no Uruguai (DE STEFANI *et al.*, 1987) e no Sul do Brasil (PINTOS *et al.*, 1994).

Outros fatores exógenos, incluindo a radiações ionizantes, abuso e irritações vocálicas, laringite crônica, elementos climáticos e ambientais, constituem possíveis agentes carcinogênicos implicados na iniciação e promoção dos tumores malignos da laringe (LAFOREST *et al.*, 2000; NARAVANA *et al.*, 1998; NORONHA & DIAS, 1997). Nos últimos anos, doenças de refluxo gastroesofágico têm se mostrado como um fator carcinogênico independente e como coadjuvante ao cigarro e ao álcool (BRASIL & MANRIQUE, 2004). GALLI e colaboradores (2002) verificaram o papel do refluxo ácido na carcinogênese laringeal confirmando-o como um fator de risco em potencial.

2.4.2. Papilomavírus Humano & Considerações Bioquímicas na Relação

Parasito-Hospedeiro: A Interação dos genes de supressão tumoral com o genoma do papilomavírus humano

O vírus do papiloma humano (VPH) ou HPV (do inglês, *Human Papillomavirus*) infecta os queratinócitos da pele ou mucosas, e possui mais de 200 tipos diferentes. A maioria dos tipos virais está associada a lesões benignas, tais como verrugas, mas certos tipos são freqüentemente encontrados em determinadas neoplasias como o cancro do colo do útero, do qual se estima que sejam responsáveis por mais de 90% de todos os casos observados (BOCCARDO & VILLA, 2004).

A presença de genomas virais associados ao tecido neoplásico tem sido referida em aproximadamente 15% dos cânceres humanos. Nas últimas décadas, uma série de dados experimentais e epidemiológicos tem apontado diversos vírus humanos como agentes capazes de iniciar tumores específicos (KAWAGUCHI *et al.*, 1999).

O HPV é considerado o agente causal de tumores benignos como papilomas, verrugas comuns e condilomas. Com o avanço das técnicas de detecção molecular, o genoma do HPV tem sido identificado em células neoplásicas malignas. Assim, o HPV passou a ser associado a cânceres, principalmente com o carcinoma cervical. As evidências da associação destes vírus com neoplasias somadas a estudos epidemiológicos publicados recentemente permitiram estabelecer uma relação etiológica entre alguns tipos de HPVs e o carcinoma cervical (OLIVEIRA, 2005; SILVA, 2003; BIBBO & SILVA-FILHO, 1998; GARCIA-CARRANCA & GARRIGLIO, 1993).

Os HPVs são vírus pertencentes à família *Papovaviridae*, apresentando capsídeo protéico icosaédrico não envelopado com 50-55nm de diâmetro, composto por 72 capsômeros formados por duas proteínas estruturais denominadas de *proteína L1* e *proteína L2*, sendo que a primeira corresponde a 90% do conteúdo protéico do vírus. São dependentes do meio de diferenciação terminal dos queratinócitos para

replicação, síntese do capsídeo e montagem do vírus e não podem ser suficientemente cultivados em culturas teciduais ou modelos animais (SOUSA, 2008; HEBNER & LAIMINS, 2006; REIS, 2005; TERAJ & TAKAGI, 2001).

O genoma dos HPVs é constituído por DNA de dupla fita, medindo aproximadamente 8×10^3 pb (BOCCARDO & VILLA, 2004; MATZOW *et al.*, 1998; ALVAREZ *et al.*, 1997), e pode ser dividido em três regiões distintas:

(1) Região longa de controle não codante (LCR, do inglês *long control region* ou URR, *Upstream Regulatory Region* ou NCR, *non-coding region*), localizada entre a região L1 e o gene E6, compreendendo cerca de 10% do genoma viral apresentando 500 a 1000pb (SOUTO *et al.*, 2005; GARCIA-GARRANCA & GARIGLIO, 1993). A LCR contém diversas seqüências regulatórias que controlam a transcrição e replicação (SOUSA, 2008; CAVALCANTI & CARESTIATO, 2006; KITASATO *et al.*, 1994). Há substanciais evidências de que a progressão do câncer induzida pelo HPV seja um evento de múltiplas etapas, dentre as quais, mecanismos relacionados com a participação desta região regulatória (ZUR, 2000). KITASATO e colaboradores (1994) postulam que a LCR dos HPVs do tipo 6 seja alvo direto de mecanismos regulatórios intracelulares. A progressão para a malignidade é acompanhada pela perda do controle desses processos de regulação, os quais se correlacionam com uma abundante expressão gênica viral;

(2) A região precoce (E, do inglês *Early*) constituída por genes funcionais relacionados com os processos de replicação viral que, dependendo do tipo do HPV, pode ser de E1 até E8, exceto E3; Do ponto de vista da transformação celular, as proteínas resultantes das regiões gênicas E5, E6 e E7 dos HPVs são mais relevantes nos processos relacionados com a carcinogênese (ZUR, 1996);

(3) Finalmente, a região tardia (L, do inglês *Late*) que contém os genes *L1* e *L2* codificantes das proteínas capsulares virais. O alinhamento das seqüências de DNA dos HPV's revela a organização genética das regiões codificantes das proteínas virais *Early* e *Late* (ORF, do inglês *Open Reading Frames*), presentes em uma só fita de DNA (OLIVEIRA *et al.*, 2005). A Figura 3 mostra o mapa genético de um HPV, enfatizando detalhes do seu genoma (SILVA, 2003).

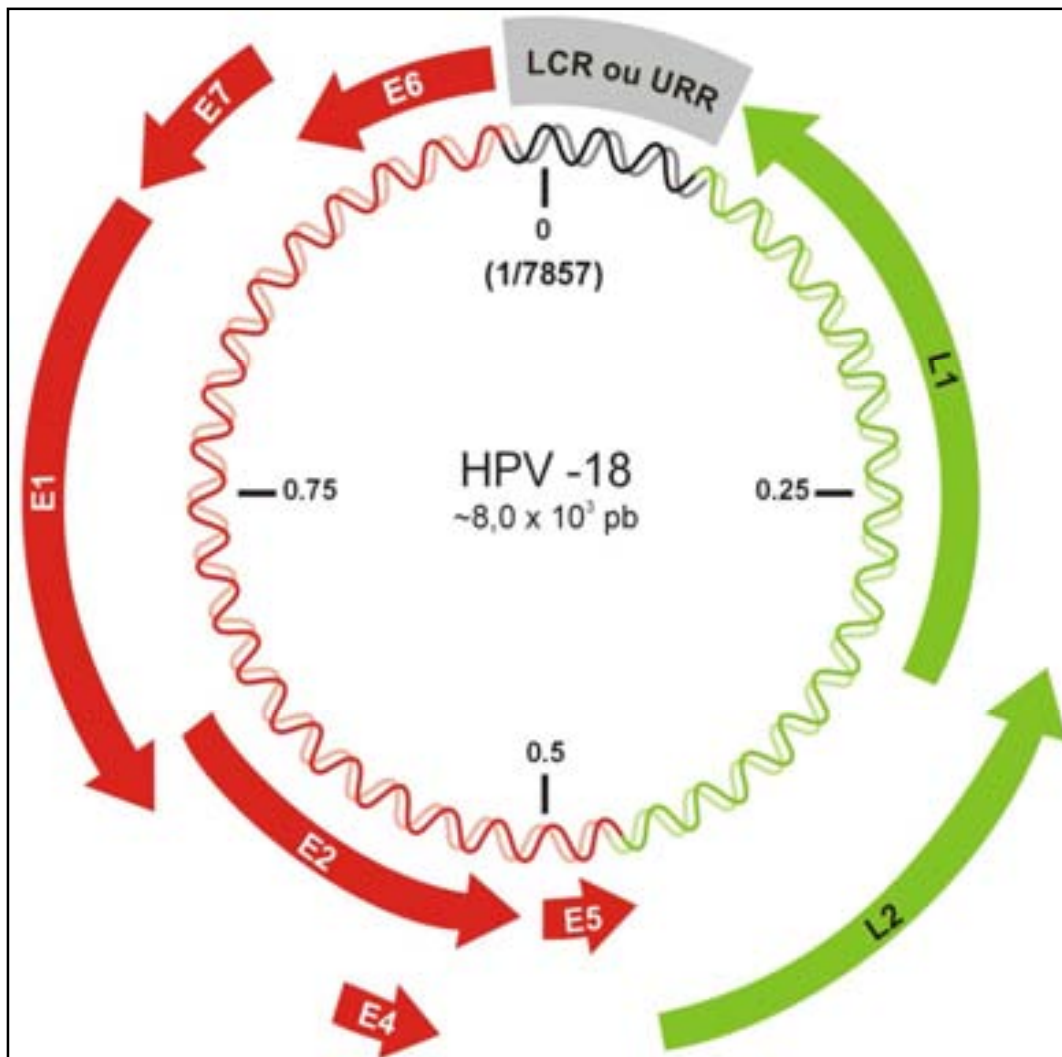


Figura 3. Mapa genético do papiloma vírus humano 18 (HPV18). Genoma circular de dupla-fita, destacando sua organização e localização dos quadros abertos de leitura. LCR: Longa Região de Controle ou URR: Região Regulatória a Montante. SILVA, 2003.

Mais de 100 tipos de HPVs já foram identificados até hoje (LIN *et al.*, 1997; KOUTSKY *et al.*, 1997) e alguns tipos são altamente oncogênicos (NODA *et al.*, 1998).

Os tipos de HPVs são dispostos em classes de acordo com o risco oncogênico. HPVs tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52 e 58 são considerados participantes do grupo de alto risco para carcinogênese cervical (NODA *et al.*, 1998). Nesse contexto, a infecção por HPV tem sido associada ao desenvolvimento de alguns tumores de epitélio esfoliado (NIV *et al.*, 2000). O tipo de HPV mais prevalente, tanto em lesões orais como em lesões genitais é o HPV 16 (KITASATO *et al.*, 1994).

Os HPVs de alto risco expressam proteínas com potencial oncogênico, capazes de imortalizar e eventualmente transformar células em cultura (VILLA *et al.*, 1995).

Especificamente os genes virais E6 e E7 dos HPVs tipos 16, 18 e 33 desempenham o papel de oncogenes. Os oncogenes virais encontrados integrados ao genoma de células cervicais cancerosas resultam em uma maior estabilidade na expressão dos genes E6 e E7 (KARLSEN *et al.*, 1996).

As oncoproteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco são conhecidas pelo seu envolvimento de iniciação e manutenção de cânceres. Basicamente, a ligação de E6 na p53 estimula a degradação de p53 celular, enquanto que a proteína E7 altera o controle do crescimento celular ligando-se a proteína RB, inibindo a sua função (CEROVAC *et al.*, 1996).

A perda da função de supressão tumoral dos produtos dos genes p53 e rb pode contribuir significativamente para o fator carcinogênese (NODA *et al.*, 1998). Os estudos sobre a expressão do mRNA E7 de papilomavírus humano em neoplasias oral

e cervical sugerem que o DNA do HPV pode ser encontrado em tecidos normais orais e cervicais (KE *et al.*, 1999).

No final dos anos 90, o HPV foi também associado ao desenvolvimento de outros tipos de cânceres, tais como de vulva, pulmão e cânceres orais (KE *et al.*, 1999). Os vários estudos epidemiológicos realizados em todo o mundo, inclusive no Brasil, revelam essencialmente as mesmas prevalências de infecção pelo HPV (FRANCO *et al.*, 1999).

Na década de 90, evidências crescentes sugerem especificamente que os HPVs 16 e 18 estão associados aos cânceres orais e lesões pré-malignas de cavidade oral. Estudos individuais têm mostrado uma variação total de 0-100% na presença de tipos de HPVs nas lesões e tumores orais (D’COSTA *et al.*, 1998).

Alguns tipos particulares de HPVs são reconhecidos como agentes cancerígenos potenciais e importantes para os seres humanos (BOUDA *et al.*, 2000; IARC, 1995). O papel de alguns HPVs, particularmente os tipos 16 e 18, na etiologia do câncer do colo do útero está firmemente estabelecido (IARC, 1995). Nesse contexto, o genoma de HPV foi detectado em mais de 93% dos tumores cervicais no mundo, com nenhuma variação significativa na positividade de HPV nestas neoplasias em diferentes países (BOSCH *et al.*, 1995).

Fortes associações entre a presença do genoma dos HPVs em neoplasias pré-invasivas e invasivas emergiram a partir de um grande número de estudos caso-controle sobre o tema, particularmente naqueles estudos onde a detecção de DNA do HPV foi determinada empregando-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que continua sendo uma metodologia sensível e disponível até o presente momento

(SOUSA, 2008; CUNHA *et al.*, 2007; ELUF-NETO *et al.*, 1994; BOSCH *et al.*, 1993; MUÑOZ *et al.*, 1992).

Adicionalmente, outros raros cânceres ano-genitais são também casualmente associados à infecção por HPV. Estas evidências sugerem que a possível influência do HPV como potente agente carcinogênico não está restrita ao trato genital. Similaridades relacionadas aos epitélios e aos tipos tumorais, assim como evidências de vários estudos, colocam os cânceres da cavidade oral e faringe entre os mais prováveis candidatos a estarem associados ao HPV (SILVA, 2003).

Estudos realizados em uma série de casos têm apontado para a associação entre HPV e câncer da cavidade oral e orofaringe, sobretudo o carcinoma da laringe, especialmente quando os estudos utilizaram técnicas de detecção mais sensíveis, como PCR e *Southern blot* (FRANCHESCHI *et al.*, 1996).

Em dois estudos caso-controle que avaliaram a associação entre a presença do DNA de HPV e cânceres da cavidade oral (SCHWARTZ *et al.*, 1995; MADEN *et al.*, 1992), a pesquisa de detecção da presença do genoma viral foi realizada por PCR em células esfoliadas da mucosa bucal, coletadas com uma escova de dente. No primeiro estudo, foram avaliados 131 casos e 136 controles. Neste estudo, homens com infecção oral em relação aos homens não-infectados tiveram o risco de câncer oral aumentado em 2,9 vezes.

Nesse contexto, os homens que apresentaram infecção oral por HPV 16 mostraram um *odds ratio* de 6,2, sem ajuste por idade, uso de tabaco e álcool. No segundo estudo (SCHWARTZ *et al.*, 1995), foram avaliados 206 casos de câncer oral e 206 controles. Este estudo, não encontrou qualquer associação da infecção por HPV

com o desenvolvimento dos tumores. Os autores relataram um *odds ratio* de 0,6 para qualquer tipo de HPV. Entretanto, o DNA viral foi detectado, entre os casos de câncer, oito vezes mais freqüentemente em espécimes histológicas do que em células esfoliadas, possivelmente porque as células esfoliadas foram coletadas após o tratamento para o câncer.

As vias de transmissão do HPV para a cavidade oral, orofaringe e laringe são ainda pobremente compreendidas. A transmissão sexual do trato ano-genital para a cavidade oral é admitida (CASON *et al.*, 1995). A transmissão vertical durante o trabalho de parto, a transmissão digital de infecções peri-ungueais e a transmissão de fômites contaminados com HPV são também consideradas como possíveis (SOUSA, 2008; REIS, 2006; OLIVEIRA, 2005; SILVA, 2003; MOY *et al.*, 1989).

Os HPVs 6 e 11 causam papilomas da laringe juvenil e adulta (SILVA, 2003; AUSTIN & REYNOLDS, 1996). A proporção de papilomas relatados como sendo positivos para o HPV, em sua maioria utilizando técnicas de detecção viral de baixa sensibilidade, variam de 50 a 84% (FRANCESCHI *et al.*, 1996). Adicionalmente, uma avaliação de mucosas normais adjacentes aos papilomas resultou positiva para HPV (RIHKANEN *et al.*, 1994).

Em um estudo de série de casos de carcinoma da laringe, o DNA de HPV foi detectado em aproximadamente 25% dos casos, variando de 2% a 85% (FRANCESCHI *et al.*, 1996). Outros estudos que incluíram a comparação de grupos, a prevalência de positividade para HPV apresentou-se maior nos tecidos tumorais do que nas amostras individuais de tecidos normais. Os tipos virais mais freqüentemente procurados e encontrados em cânceres da laringe são os HPVs 16, 11 e 6, por ordem de prevalência.

Em um estudo de 24 pacientes com papilomas laríngeos, que eram positivos para HPV, a co-infecção com herpes simplex foi detectada em 12 casos e com vírus Epstein-Barr em 6 casos. No entanto, nenhum caso de co-infecção com citomegalovírus foi detectado (POU *et al.*, 1995). Foi relatado que os pacientes que apresentaram co-infecção desenvolveram um curso clínico muito mais agressivo.

2.4.3. Aspectos Genético-Moleculares: Condições genético-moleculares de predisposição ao câncer.

O papel da predisposição genética no carcinoma da laringe, bem como em outros tumores da cabeça e pescoço, tem sido bem documentado através de estudos das síndromes de múltiplos neoplasmas (TRIZNA & SCHANTZ, 1992), estudos de múltiplos tumores primários (SPITZ *et al.*, 1994) e estudos da história familiar de câncer (BONDY *et al.*, 1993).

Em um estudo brasileiro, um aumento de 3 vezes no risco de câncer da laringe foi observado em indivíduos parentes em primeiro grau de portadores de câncer de qualquer topografia. O risco relativo ainda apresentava-se maior, se o parente em primeiro grau havia desenvolvido um tumor de cabeça e pescoço (FOULKES *et al.*, 1995). Uma importante categoria de genes envolvidos no processo de carcinogênese é conhecida como genes supressores tumorais (GST ou TSG, do inglês, *Tumor suppressor genes*) que agem normalmente como reguladores negativos da proliferação celular.

Um dos principais genes representantes desta categoria é o gene *TP53* cuja mutação ou inativação está implicada no surgimento do câncer (OLIVEIRA, 2005).

2.4.3.1. Polimorfismo no gene *TP53*: Uma situação de predisposição genética amplamente investigada

Mapeado em 17p13.1, o gene *p53* ou *TP53* codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 KDa, contendo 393 aminoácidos que exerce controle negativo no ciclo celular, denominada proteína p53. A Figura 4 apresenta um esquema geral do gene *TP53*, indicando 11 éxons e 10 íntrons e as respectivas regiões da proteína p53. O gene possui 20 Kb e é composto por 11 éxons que codificam um RNA mensageiro de 2,8 Kb, porém o primeiro éxon não é codificante.

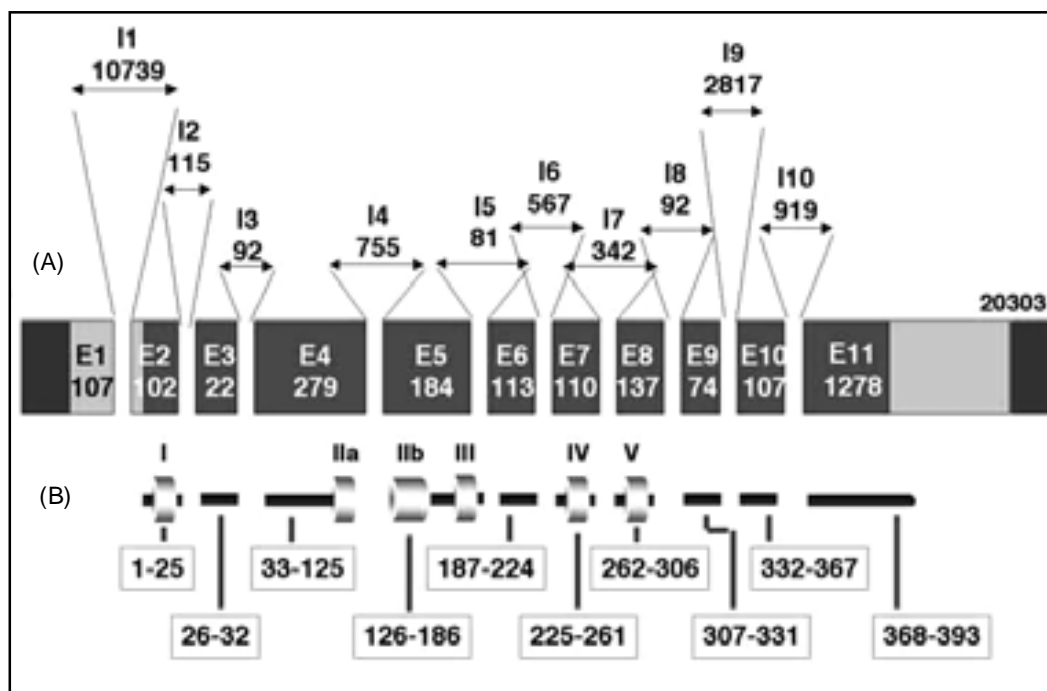


Figura 4. Modelo esquemático do gene *TP53*. Em (A) estão indicados os éxons, íntrons e o número de pares de bases respectivos. Em (B), um modelo esquemático geral da proteína p53.

Na região central da proteína p53 entre os aminoácidos 102 e 292, encontram-se os locais específicos de ligação ao DNA (em número de quatro), em função destas regiões e sua interação com o DNA, p53 passou a ser denominada como uma *DNA*-

binding protein (proteínas que apresentam sítios de ligação com a molécula de DNA, estando envolvidas na regulação de expressão de genes específicos).

Na extremidade carboxi-terminal (c-terminal) encontra-se dois domínios. O domínio de tetramerização que se situa entre os aminoácidos 319 a 360, uma região que auxilia na estabilização da p53, por favorecer a formação de tetrâmeros que é a forma mais ativa em transativação. Um domínio regulatório localizado entre os aminoácidos 364 e 393 cuja função é ligar-se ao domínio central de ligação ao DNA, impedindo a interação desta região com promotores de genes relacionados com a supressão e morte celular programada (JÚNIOR, 2003).

O gene *TP53* também promove um *check point* de S para G2, que depende da integridade do domínio c-terminal do gene. Portanto, quando *TP53* sofre mutações, as células com danos no DNA, que por um processo de seleção natural favorável podem desencadear a transformação maligna, escapam do reparo destes danos e de sua destruição, podendo iniciar um clone maligno. Apesar de ser observada principalmente em células somáticas, a importância médica do gene *TP53* é inegável, primeiro porque a detecção de mutações pode ser indicadora do diagnóstico e do prognóstico, segundo porque é um alvo perfeito para prevenção, o que estimula as abordagens de terapia gênica (FETT-CONTE & SALLES, 2002).

Em adição às mutações, muitos estudos têm focado os polimorfismos do gene *TP53* como fatores de risco na carcinogênese. Estão depositados no banco de dados da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC do inglês, *International Agency Research on Cancer*) seqüências nucleotídicas de 14 diferentes tipos polimórficos do gene *TP53*, sendo que um destes polimorfismos acomete o códon 72 no éxon 4 deste

gene supressor tumoral. Na realidade, o polimorfismo do códon 72 de *TP53* é um polimorfismo de único nucleotídeo (SNP do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) o qual resulta na expressão da proteína p53 contendo Arginina 72 ou Prolina 72. Estas variantes de p53 apresentam diferentes propriedades bioquímicas e biológicas, e por isso, são bastante pesquisadas no campo da oncologia molecular de diversas neoplasias (OLIVEIRA, 2005).

À medida que as seqüências nucleotídicas do genoma humano foram sendo desvendadas, uma constatação foi o grande número de variações de ponto encontradas ao se comparar segmentos correspondentes do genoma. Comumente estas mutações que ocorrem, aproximadamente, a cada 600 bases, são denominadas polimorfismos de nucleotídeos únicos ou SNPs (do inglês, *Single Nucleotides Polymorfisms*) e correspondem a posições onde existe uma alternância dos nucleotídeos A, C, G e T em uma freqüência alélica mínima de 1% em uma dada população (BROOKES, 1999). Os SNPs podem promover *splicing* alternativo, alterando o padrão ou a expressão de genes quando ocorrem em seqüências de promotores, gerando ou suprimindo códons de terminação ou poliadenilação na molécula de RNA mensageiro e, causando, assim, alterações na iniciação da tradução (GUIMARÃES & COSTA *et al.*, 2002).

As substituições mais freqüentes que ocorrem no DNA são as que envolvem bases nitrogenadas de mesma característica estrutural, ou seja, trocas entre duas bases purinas (A/G ou G/A) duas bases pirimidinas (C/T ou T/C), sendo denominadas transições. Já as transversões são substituições de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa. Essas alterações, algumas vezes, têm origem em erros de incorporação de

bases durante a replicação do DNA, em outros casos, são causadas por lesões no DNA por agentes ambientais. Quando essas mutações ocorrem em células germinativas e são transmitidas às gerações seguintes e se fixam na população, em uma frequência mínima de 1%, passam a ser denominadas de polimorfismo (KWOK & GU, 1999).

Os polimorfismos consistem em variações genéticas encontradas em pelo menos 1% dos indivíduos de uma amostra populacional aleatória, enquanto as mutações constituem as variações presentes em pelo menos 1% dos indivíduos, sendo, portanto mais raras do que os polimorfismos. Tais definições são estatísticas e independentes da presença de doença ou da possível predisposição a condições patológicas (ROBERTSON & WOLFFE, 2000).

No polimorfismo do gene *TP53* (tipo selvagem), o códon 72 do éxon 4 pode ocorrer uma prolina [CCC, *p53Pro*] ou uma arginina [CGC, *p53Arg*]. STOREY e colaboradores (1998) relataram uma ocorrência alta e significativa do genótipo *p53 Arg/Arg* em pacientes com câncer cervical, quando comparados com uma população normal. Os dados indicam que o *p53Arg* homozigoto corresponde a um elevado risco de tumorigênese na laringe. Assim, o alelo *p53Arg*, na ausência do alelo *p53Pro*, confere susceptibilidade para o desenvolvimento tumoral, mais propriamente associada à iniciação à progressão dos tumores da laringe.

Estudos relacionados com a susceptibilidade alélica do gene *TP53* relacionam a forma homozigótica do *p53Arg* mais susceptível diante da degradação da proteína viral E6 de HPVs de alto risco oncogênico, quando comparada ao genótipo homozigoto *TP53Pro* ou heterozigoto *p53ArgPro*.

Testes de Tendência sugeriram que indivíduos homozigotos para *p53Pro* poderiam desenvolver câncer da laringe mais tardiamente quando comparados aos indivíduos homozigotos para *p53Arg* ou heterozigotos *p53ArgPro*. Pelo método da tábua de vida atuarial, foi possível calcular a sobrevida para os pacientes categorizados por genótipo. As sobrevidas encontradas foram: 25% (*p53ProPro*), 24,9% (*p53ArgArg*) e 16,8% (*p53ArgPro*). O teste do *Logrank* demonstrou que não há diferenças significativas entre os pacientes com carcinoma laríngeo portadores dos respectivos genótipos. Tendências preocupantes têm sido geradas com a análise de estudos epidemiológicos sobre o câncer da laringe não só no Brasil como no mundo (OLIVEIRA, 2005).

Segundo OLIVEIRA (2005) em 22 biópsias de casos de câncer da laringe a frequência percentual de genótipo *p53ArgPro* foi de 59%, para o genótipo *p53ArgArg* foi de 32% e *p53ProPro* de 9%. Os resultados desta população estudada sugerem que o fenótipo contendo arginina no códon 72 da proteína supressora tumoral p53 parece desempenhar um papel importante na oncogênese dos tumores da laringe.

SOULITZIS e colaboradores (2003) estudando o mesmo polimorfismo em pacientes com câncer da bexiga apresentaram uma provável implicação do polimorfismo do gene *TP53* na carcinogênese dos tumores da bexiga, onde indivíduos com genótipo *p53ArgArg* têm um maior risco de desenvolver tais tumores.

Segundo SOURVINOS e colaboradores (2001) o genótipo *p53ArgArg* afeta a predisposição ao câncer, mas o papel do alelo *p53Arg* em heterozigotos ainda é controverso. Este alelo parece não ser suficiente para desenvolver o fenótipo de um

tumor. O alelo *p53Arg*, na ausência do alelo *p53Pro*, confere susceptibilidade ao câncer de laringe e pode estar implicado no estágio precoce durante a oncogênese.

Estudos realizados por STOREY e colaboradores (1998) revelaram que o genótipo *p53ArgArg* é até 7 vezes mais susceptível ao desenvolvimento de câncer do que o genótipo heterozigoto *p53ArgPro*, em pacientes com tumores cervicais associados ao HPV, sendo que o genótipo *p53ProPro* teria uma menor predominância neste tipo de câncer.

No entanto, BASTIAENS e colaboradores (2001) estudando o referido polimorfismo encontraram resultados diferentes. Estes autores apresentaram um estudo com o intuito de discutir a necessidade de se fazer uma triagem para o polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* em pacientes com câncer laríngeo. Para isso, analisaram 86 indivíduos com história da doença e 168 controles saudáveis. As análises estatísticas não revelaram diferenças entre os grupos. Assim, os autores concluíram que a homozigose de arginina no códon 72 do gene *TP53* não parece representar um fator de risco importante para os carcinomas de células escamosas e, por isso, a triagem não é recomendada.

O polimorfismo de *TP53* também foi avaliado em indivíduos com câncer de cólon, com a utilização das técnicas de PCR e digestão com enzimas de restrição, em um trabalho na Turquia. Este estudo conclui que os genótipos *p53^A* ou *p53^P* não parecem estar associados com o risco de desenvolver câncer de cólon ou mesmo com a infecção por HPVs (SAYHAN *et al.*, 2001).

2.4.3.2. Outros Polimorfismos: *Demais condições genéticas importantes no processo da tumorigênese.*

Talvez o polimorfismo de *TP53* associado ao HPV não seja o fator de risco mais importante ou principal para o desenvolvimento de vários tumores, dentre eles, o tumor de laringe, no entanto, resta ainda realizar estudos mais amplos e com diferentes técnicas na tentativa de encontrar uma correlação importante, ou mesmo descartá-la definitivamente. Em outra situação, também importante e que deve ser considerada, é a possibilidade da agregação familiar dos cânceres da laringe (ANKATHIL *et al.*, 1996; FOULKES *et al.*, 1995; GOLDSTEIN *et al.*, 1994). Estes pesquisadores que sugerem um polimorfismo genético das enzimas metabolizadoras de agentes carcinógenos.

A modulação dos processos de biotransformação é geneticamente determinada e, provavelmente isto seja uma das maiores fontes de variabilidade interindividual na susceptibilidade aos agentes carcinógenos (HARRIS, 1987).

Os polimorfismos genéticos têm recebido crescente destaque nos estudos de carcinogênese. Atualmente são considerados como marcadores importantes nos estudos de epidemiologia molecular. Por outro lado, o polimorfismo genético é um fator endógeno ligado à suscetibilidade individual ao carcinoma da laringe. Os genes codificadores de enzimas de biotransformação de xenobióticos, como por exemplo, citocromo-P450 (*CYP1A1*) e glutathione-S-transferase (*GST*), apresentam variantes polimórficas menos eficazes no processo de detoxificação (CANAVERI & ROGATTO, 2004; WÜNSCH-FILHO, 2004).

Adicionalmente, o polimorfismo das enzimas álcool-desidrogenase (ADH), aldeído-desidrogenase (ALDH) e mieloperoxidase podem influenciar no risco do cânceres da laringe (BENHAMOU *et al.*, 1996).

Destacando-se ainda como outros fatores endógenos, deve-se incluir o papel do sistema imunológico individual. Muitas vezes, em decorrência de deficiências genéticas ou não-genéticas, o sistema imune não é capaz de detectar e destruir as células neoplásicas. Nesse caso, o escape ao sistema imune representa um fator determinante para o desenvolvimento tumoral, sendo um evento fundamental na posterior instalação de uma metástase tumoral em outra parte do organismo. As metástases, que ocorrem por via hematogênica, linfática, ou ambas são indicadores do grau de agressividade dos tumores malignos (ABBAS *et al.*, 1995).

2.4.3.3. Instabilidade Genômica: O papel da perda da heterozigose (LOH) e instabilidade de microssatélites (MIS) no desenvolvimento de câncer.

A instabilidade genética é considerada uma fonte potencial para a diversidade de tumores malignos, de maneira que quanto mais instável for um tumor, maior será a possibilidade de progressão para um fenótipo mais agressivo. Vários estudos foram realizados para investigar a instabilidade genômica em cânceres humanos, e têm revelado perdas somáticas em locos de genes supressores e em genes envolvidos no reparo a danos no DNA (ROSSI & PINHO, 1999).

As mutações responsáveis pelo desenvolvimento do câncer podem ser cromossômicas e/ou gênicas. No caso dos genes supressores de tumor, nos quais há a

necessidade de inativação dos dois alelos, o primeiro geralmente é inativado por mutação gênica e o segundo é perdido por deleções cromossômicas envolvendo a região na qual o gene em questão está localizado (VOGEL & MOTULSKY, 1997).

Segundo WEINBERG (1991), na inativação destes genes, os mecanismos que levam à perda de seqüências podem também envolver as regiões cromossômicas próximas ao gene. Assim, marcadores de DNA que demonstravam heterozigose antes da progressão do tumor podem sofrer uma redução até atingirem a perda alélica parcial ou total, mecanismo conhecido como perda de heterozigose (LOH do inglês, *Loss of Heterozygosity*).

O câncer é geralmente relacionado a duas vias de tumorigênese, sendo a via clássica caracterizada por aneuploidias e perdas cromossômicas devido aos mecanismos de recombinação mitótica. Essas aberrações cromossômicas freqüentemente resultam na perda da heterozigose.

A instabilidade de microssatélites (MIS do inglês, *Microsatellite Instability*) pode ser avaliada pela LOH, que é um evento molecular importante na ativação de oncogenes e na inativação de genes supressores de tumor, contribuindo para a iniciação e evolução tumoral (BOCKMUHL *et al.*, 2001; SASIADEK *et al.*, 2001; SUNWOO *et al.*, 1996).

A perda da heterozigose de marcadores genéticos polimórficos é interpretada como a deleção de segmentos genômicos. Quando esta perda é detectada como um evento somático específico do tumor, pode representar a deleção de um alelo de um gene supressor tumoral e indicar a localização do outro, provavelmente mutado e não-

funcional, no cromossomo homólogo. Estas alterações conferem uma vantagem ao crescimento que leva à expansão clonal das células (BARROS, 2004; ANDO et al., 2000).

A análise de LOH pode caracterizar alterações não detectadas por outros métodos e o posterior mapeamento pode levar à identificação de novos genes supressores tumorais (KEMP, 1999).

A pesquisa de LOH se constitui num método indireto de investigar a possível localização de um gene supressor de tumor através do estudo de alterações em seqüências repetitivas em *tandem*, chamadas de microssatélites, comuns em genomas de eucariotos. A discrepância entre o tamanho dos microssatélites observada em células tumorais comparada ao tecido normal do mesmo paciente, resultado da expansão ou diminuição do seu comprimento, denomina-se instabilidade de microssatélites. Os microssatélites são seqüências altamente polimórficas, com variações entre 2 a 6 pares de bases, que podem estar localizadas entre ou dentro dos genes (PERUCHO, 1996).

A alta freqüência e a ampla distribuição destas seqüências pelo genoma humano as qualificam para estudos que visam definir regiões mínimas de perdas cromossômicas, sugerindo a presença de genes supressores (OTHE, 1997; SPEICHER, 1995).

A triagem em amostras pareadas de sangue e de tumor com marcadores distribuídos ao longo do genoma permite descobrir sítios candidatos a *locus* de GST (STRACHAN & READ, 2002).

A instabilidade de microssatélites resulta de mutações em genes de reparo, que podem permitir a manutenção de erros de pareamento do DNA. Indiretamente, esses

erros de pareamento estariam associados à transformação celular a um fenótipo maligno. A maioria das repetições de microssatélites ocorre fora das regiões codificadoras dos genes e, portanto, a instabilidade não deve levar diretamente ao desenvolvimento tumoral, mas a desestabilização dessas seqüências pode tornar o genoma suscetível a mutações subsequentes (RAJANBABU & PATRARCA, 1999; CLAIJ & RIELE, 1999; ESHLEMAN *et al.*, 1995).

Anormalidades em seqüências microssatélites têm sido associadas a várias doenças genéticas, incluindo diversos tipos de tumores malignos (WOOSTER *et al.*, 1994), como o câncer bucal (JEFFRIES & FOULKES, 2001). A utilização de microssatélites como marcadores na identificação de sítios específicos está amplamente descrita na literatura (SUDBO *et al.*, 2001; LIPPMAN & HONG, 2001; ROSIN *et al.*, 2000; SEM, 2000; MAO *et al.*, 1996a).

Os principais marcadores moleculares freqüentemente utilizados na avaliação de microssatélites relacionados com os cânceres da laringe são: D1S2883, D2S123, D3S1611, D5S346, D7S501, D8S254, *TP53* e NM23 (SASIADEK *et al.*, 2001). DAI e colaboradores (1998) relatam que 40% dos pacientes com carcinoma de células escamosas da laringe mostravam LOH no *locus* da seqüência polimórfica de microssatélites no cromossomo 13 na região do *gene RB*.

MIRACA e colaboradores (2000) utilizaram 6 marcadores de microssatélites para as regiões cromossômicas 3p13, 6q13, 9p21, 11p15, 17p13.1, e 17q22 em 81 pacientes com câncer de cabeça e pescoço nos mais diferentes estágios, relatando uma LOH para os referidos *loci* de até 55%.

Muitas regiões cromossômicas freqüentemente afetadas por LOH não apresentam até agora genes de predisposição ao câncer. Para outras regiões com LOH, embora se conheça um gene supressor tumoral envolvido em um dado tipo de tumor hereditário, raramente encontram-se mutações nesse gene nos casos de tumores esporádicos. Existem várias regiões cromossômicas afetadas por LOH em vários tumores e para as quais ainda não foi identificado um gene supressor tumoral (OJOPI & DIAS-NETO, 2002).

AYRES (2000) relatou que a perda da heterozigose de um gene supressor de tumor ou mutação constitucional, seguida da perda do segundo alelo por mutação somática, está associada à iniciação e progressão tumoral. Entretanto, em situações de haploinsuficiência, a perda do segundo alelo não é necessária para inativar um gene supressor de tumor. Essa situação pode ocorrer devido à quantidade insuficiente do produto do GST para regular o ciclo celular.

Segundo BARROS (2004) as reações que envolvem análise de LOH fornecem dados significativos, onde as regiões 8p21, 9p21, 17p13 demonstraram como bons marcadores moleculares e apresentaram a possibilidade de conter genes associados à disseminação metastática.

Muitas regiões genômicas vêm sendo estudadas nos carcinomas de cabeça e pescoço e relacionadas a possíveis locos de genes envolvidos com o processo tumoral. Segundo van der RIET e colaboradores (1994) e ROSIN e colaboradores. (2000), LOH em 9p pode ser um evento inicial em neoplasias escamosas de cabeça e pescoço, sendo observada inclusive em lesões pré-neoplásicas. Estudos de YAMAMOTO e colaboradores (2001) sugerem o envolvimento do cromossomo 21 (21q) nestas

neoplasias, afirmando que a avaliação de LOH nesta região pode ser um marcador útil na determinação do potencial de recorrência tumoral.

REIS e colaboradores (2002) sugerem que o cromossomo 22 (22q) possa conter genes supressores específicos para diferentes localizações anatômicas dos carcinomas de cabeça e pescoço, incluindo a região da laringe, e que alterações nestas regiões poderiam ter uma relevância clínica e prognóstica.

NUMASAWA e colaboradores (2005) afirmam que a freqüência de LOH por eles observada em 2q indica a presença de genes candidatos a supressores tumorais em 2q14-21 e 2q36, dados que corroboram os de YAMAMOTO e colaboradores (2003).

O braço curto do cromossomo 3 (3p) é uma das regiões onde freqüentemente se encontram anormalidades cromossômicas em cânceres humanos, como pulmão, rim e cavidade bucal (SHRIVER *et al.*, 1998). Estudos citogenéticos e moleculares têm sugerido que genes supressores tumorais localizados neste cromossomo poderiam exercer um importante papel na carcinogênese bucal, principalmente nos estágios avançados do desenvolvimento tumoral (ARAI *et al.*, 2002; DASGUPTA *et al.*, 2002).

Diversos estudos investigaram a ocorrência de LOH em 3p (YOO *et al.*, 2004; DASGUPTA *et al.*, 2002; ARAI *et al.*, 2002; ARAI *et al.*, 2001; GUO *et al.*, 2001; TABOR *et al.*, 2001; EL-NAGGAR *et al.*, 2001; CALIFANO *et al.*, 1996; MAO *et al.*, 1996b; PARTRIDGE *et al.*, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 1996; WU *et al.*, 1994). Em conjunto, estes dados indicaram as regiões 3p14, 3p21 e 3p24 como as mais freqüentemente envolvidas em perdas alélicas em carcinomas de cabeça e pescoço de diferentes localizações anatômicas.

Segundo PARTRIDGE e colaboradores (1996), ARAI e colaboradores (2002) e DASGUPTA e colaboradores (2002), existe uma associação entre LOH em 3p com tempo livre da doença, progressão tumoral e parâmetros clínicos do tumor, indicando um significado prognóstico e terapêutico para alterações nesta região cromossômica em tumores bucais.

CALIFANO e colaboradores (1996) propuseram um modelo de progressão tumoral em carcinomas de cabeça e pescoço, em que o espectro de perdas cromossômicas aumentava progressivamente com o estadiamento histopatológico, levando à transição da mucosa normal para displasia.

EL-NAGGAR e colaboradores (2001) analisaram 37 amostras de pacientes com carcinoma das células escamosas da laringe pareadas com amostras de secreções orais (saliva) do mesmo paciente. Os autores encontraram LOH em 18 (49%) amostras de saliva e em 32 (86%) mostras tumorais em pelo menos 1/25 marcadores estudados correlacionando-as com o consumo de álcool e tabaco. A maior frequência de LOH em amostras de saliva foi encontrada para o marcador mapeado em 3p14.2.

DASGUPTA e colaboradores (2002) avaliaram 57 amostras de carcinoma de cabeça e pescoço sendo 38 de cavidade bucal, 8 de laringe e 11 da região orofacial. Investigaram 20 marcadores microssatélites ao longo do cromossomo 3. Destes, 15 estavam mapeados em 3p e 5 em 3q. Os autores encontraram 96% (49/51 casos de carcinomas de células escamosas) de LOH nos marcadores mapeados na região 3p e 50% (26/51) em 3q. Alta frequência de perda foi encontrada em 3p21-22 (37/42%) pela análise dos marcadores D3S3719, D3S1289, D3S1611 e em 3p12-13 (34/38%) pela análise de D3S3634, D3S1276, D3S1284.

BEDER e colaboradores (2003) avaliaram 22 amostras de carcinoma de cabeça e pescoço com 53 marcadores mapeados ao longo dos 22 cromossomos autossômicos. Destes, 15 (28,30%) estavam também mapeados no cromossomo 3 e apresentaram alta frequência de LOH, principalmente para o marcador D3S2432 (67%), mapeado em 3p24.1.

De um modo geral, as investigações baseadas em ensaios de LOH em 3p permitiram o delineamento de regiões críticas nesta região, indicando a presença de genes supressores relacionados à etiologia dos cânceres de cabeça e pescoço, incluindo os de cavidade bucal (NUNN *et al.*, 2003; ARAI *et al.*, 2002; UZAWA *et al.*, 1998; ROWLEY *et al.*, 1996; WU *et al.*, 1994).

Os genes supressores tumorais já conhecidos e contidos nestas regiões são: *Receptor beta do ácido retinóico* em 3p24 (do Inglês, *retinoic acid receptor beta-RARB*), Família de domínios associada ao *RAS* em 3p21.3 (do inglês, *Ras association - RalGDS/AF-6 domain family -RASSF1A*) e gene tríade histidina frágil (do inglês, *fragile histidine triad gene - FHIT*) em 3p14.2 foram caracterizados como candidatos a participarem da carcinogênese (YANG *et al.*, 2002).

2.4.3.4. Híbridação Genômica Comparativa: Estudos envolvendo comparações entre genomas inteiros de linhagens tumorais com DNA controle.

A utilização da CGH pode ser muito útil no diagnóstico e na avaliação da instabilidade genômica de indivíduos com câncer de laringe (JARMUZ *et al.*, 2000). Em indivíduos com carcinoma de células escamosas da laringe, os ganhos mais frequentes

envolveram as regiões 3q, 8q e 9q, enquanto que as perdas mais freqüentes foram observadas nas regiões 18q, 3p e no cromossomo 4, e a média das deleções cromossômicas foram de 2.5 vezes maiores em tumores com metástases do que em tumores não metastáticos (KUJAWSKI *et al.*, 1999).

Em uma meta-análise das publicações utilizando ensaios de LOH em carcinomas de cabeça e pescoço, CANEVARI & ROGATTO (2004) mostraram que algumas regiões cromossômicas foram intensamente investigadas como 1p, 1q, 3p, 5q, 7q, 8p, 9p, 10q, 11q, 13q, 17p e 18q. Nesse mesmo estudo, foram avaliados publicações e dados disponíveis em bancos públicos sobre CGH para esse tipo tumoral. Essa análise demonstrou que as regiões mais freqüentemente envolvidas em ganhos foram 1q, 3q, 5p, 7, 8q, 9q, 11q, 16p, 17q, 19, 20 e 22q, enquanto perdas foram detectadas em 1p, 2q, 3p, 4, 5q, 6q, 8p, 9p, 10q, 11, 13, 17p, 18q, 19, 21q e 22q. No conjunto, estes dados demonstram múltiplas regiões genômicas que provavelmente contenham genes supressores ainda não identificados.

As alterações citogenéticas mais freqüentes relacionadas aos tumores de cabeça e pescoço localizam-se nos cromossomos 3p, 5q, 8p, 9p, 18q e 21q. O gene que expressa a ciclina D1 apresenta-se freqüentemente amplificado em carcinoma da laringe, supostamente ocasionado pela ausência da supressão da proteína RB e da proteína p16 (SIDRANSKY *et al.*, 1997). A região que mais sofre deleção nesses tipos de tumores é a 9p21-22 (NAWROZ *et al.*, 1994), região que possui o gene *p16*, um importante inibidor do complexo ciclina D1/CDK4.

Segundo SANTOS (2007), que desenvolveu estudos de CGH em tumores sólidos e em linfonodos sentinela correspondentes, destaca-se um grande número de

genes envolvidos na proliferação e/ou diferenciação da célula mamária estão mapeados nas regiões alteradas nos casos analisados. A instabilidade genética característica das células neoplásicas reforçada pela pressão seletiva a que estas células estão submetidas nos diferentes microambientes de crescimento, além de uma possível divergência clonal ocorrendo em estágios iniciais da progressão tumoral, o que determina a evolução independente dos clones celulares de tumores primários e lesões metastáticas sugerem um grande número de alterações cromossômicas isoladas.

Nos estudos de carcinoma das células escamosas da laringe, a técnica de CGH tem contribuído para a caracterização da relação entre possíveis estágios precursores do CEC em seus diferentes estágios de diferenciação até carcinoma invasivo, assim como para a identificação de regiões genômicas que podem conter genes supressores de tumor e oncogenes. Esta técnica vem sendo aplicada em uma grande variedade de lesões epiteliais, desde as benignas até câncer de laringe invasivo e metastático (REIS-FILHO et al., 2005). Neste sentido, a aplicação da técnica de hibridação genômica comparativa em carcinomas das células escamosas da laringe proporcionará uma análise de melhor resolução para a caracterização das anormalidades cromossômicas presentes nestes tecidos. Além disso, a caracterização das alterações cromossômicas poderá auxiliar no melhor entendimento da história natural e do comportamento biológico e clínico dos tumores malignos, sendo de fundamental importância para o desenvolvimento de novos métodos de determinação de fatores preditivos e prognósticos no carcinoma da laringe.

A detecção molecular do genoma inserido de vírus HPV, em amostras tumorais, se faz necessária pelo fato de que uma crescente porcentagem de tumores, sobretudo os cânceres anus-genitais e da cavidade oral, orofaringe e laringe, com a presença do HPV estão sendo identificados. É fundamental elucidar a presença do genoma viral do HPV e a sua participação na iniciação e na progressão desses tumores, a fim de caracterizar os tipos virais mais freqüentemente relacionados ao epitélio laríngeo. Posteriormente, as realizações de medidas preventivas mais eficazes poderão ser estabelecidas como rotina na detecção e prevenção da infecção pelo HPV na laringe.

A evolução no entendimento da etiologia, patogênese e prognóstico dos tumores da cabeça e pescoço, com ênfase nos tumores da cavidade da laringe, têm sido lento devido à carência de estudos genéticos e moleculares que investiguem as prováveis alterações genômicas associadas ao desenvolvimento e progressão dessas neoplasias.

Por outro lado, os tumores de cabeça e pescoço, incluindo os de laringe, têm uma incidência cada vez maior no Brasil e a taxa de sobrevida de cinco anos permanece uma das menores entre os principais tipos de câncer. Uma avaliação molecular como a LOH e a instabilidade de microssatélites associados com marcadores moleculares da iniciação tumoral, infecção viral e posterior avaliação dos desequilíbrios cromossômicos por CGH são de grande importância na compreensão da patogênese dos tumores laríngeos.

OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este estudo tem por objetivo promover uma avaliação genético-molecular do carcinoma das células escamosas da laringe, utilizando técnicas de biologia e citogenética moleculares, visando contribuir para a determinação de regiões genômicas que possam ser alvos na identificação de novos genes supressores tumorais e/ou oncogenes.

3.2. Objetivos Específicos

Dentre os objetivos específicos, destacamos:

- Identificar alterações do número de cópias de DNA em diferentes regiões do genoma humano, em pacientes que apresentam carcinoma das células escamosas da laringe, utilizando a técnica de hibridação genômica comparativa;
- Comparar os resultados observados com os existentes na literatura, permitindo correlacionar às alterações detectadas com a localização de genes envolvidos na tumorigênese da laringe;
- Analisar e identificar a distribuição percentual do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53*, assim como a distribuição dos homozigotos (*TP53ProPro*, *TP53ArgArg*) e dos heterozigotos (*TP53ArgPro*) em pacientes com o carcinoma da laringe;

- Identificar, por técnicas de biologia molecular, a presença do genoma de HPV nas amostras de CEC da laringe, correlacionando com o polimorfismo do gene *TP53* no códon 72;
- Investigar a instabilidade de microssatélites e a perda da heterozigose em CEC da laringe, associando os resultados obtidos com o estadiamento tumoral e com os dados resultantes da análise do perfil linear encontrados na hibridação genômica comparativa;
- Contribuir para validação da Hibridação Genômica Comparativa como importante ferramenta na investigação de novos sítios gênicos no processo da tumorigênese;
- Compreender melhor a biologia molecular e a citogenética dos tumores de cabeça e pescoço, com ênfase no tumor da laringe;

METODOLOGIAS & ESTRATÉGIAS DE INVESTIGAÇÃO

4.1. Participação Institucional

A presente avaliação consiste em estudo caso-controle, conduzido no LaGene - Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular da SuLeide - Superintendência Leide das Neves Ferreira / Secretaria de Estado da Saúde / Governo do Estado de Goiás e no NPR - Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia / UCG - Universidade Católica de Goiás em conjunto com o Registro de Câncer de Base Populacional da ACCG - Associação de Combate ao Câncer em Goiás / HAJ - Hospital Araújo Jorge.

4.2. Grupo Amostral

O grupo teste foi constituído por 20 indivíduos de ambos os sexos. As amostras foram obtidas junto ao Serviço de Cabeça e Pescoço do HAJ e os controles, também constituído por 20 indivíduos, foram obtidos fora do HAJ, como sendo indivíduos da mesma comunidade, preferencialmente do Hospital de Urgências de Goiânia - HUGO, do Hospital Geral de Goiânia - HGG e da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia.

No HAJ foram selecionados os casos de câncer primário da laringe por ocasião do diagnóstico, anteriormente ao início do tratamento. O grupo controle, combinado por sexo e idade foi utilizado como um grupo para comparação, quando necessária, com os resultados obtidos nos casos testes. Tanto os indivíduos do grupo controle, quanto os indivíduos do grupo teste receberam informações sobre os objetivos deste estudo e assinaram o termo de consentimento pós-informação e responderam individualmente um questionário, previamente aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Hospital Araújo Jorge / ACCG, com respeito à história individual de exposição a fatores ocupacionais, ambientais e hábitos de vida.

4.3. Critérios de Exclusão e Inclusão das Amostras

Todos os indivíduos foram previamente selecionados sob a condição de não terem sido submetidos à radioterapia ou quimioterapia. Foram excluídos os indivíduos cujo DNA não apresentou boa qualidade para a realização das análises moleculares. No caso dos pacientes, também foram excluídos aqueles cujo laudo histopatológico da amostra tumoral não confirmou a presença de malignidade. Foram excluídos do estudo indivíduos-controle que apresentem ou já apresentaram qualquer tipo de neoplasia.

4.4. Obtenção das Amostras

Subseqüente à entrevista, 10 mL de sangue periférico heparinizado, por punção venosa, raspado de mucosa oral e esfregaço de células esfoliadas em lâmina de microscopia foram obtidas dos casos e controles. Dos casos testes, amostras frescas de tecidos (biópsia ou espécime cirúrgico) ou fixadas em parafina foram obtidas, e quando necessárias, foram utilizadas.

Após a coleta, o sangue foi centrifugado para a retirada do anel leucocitário. Após a centrifugação, o anel de células foi aspirado, reservado em micro-tubos e conservado à – 20°C para posterior extração de DNA. As amostras de tecido tumoral foram avaliadas por um patologista para confirmar a presença de malignidade, posteriormente, foram armazenadas em frascos estéreis e estocadas em condições ideais de temperatura e conservação (-80°C). A classificação histopatológica foi realizada de acordo com a *WHO - International Classification of Tumors*. O estágio clínico foi determinado pelo estadiamento TNM do câncer.

4.5. Extração & Purificação de DNA: Sangue periférico & Biópsias

O método para a extração e o isolamento de DNA foi escolhido com a finalidade de originar DNA de alto peso molecular e consiste, basicamente, no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol. Para a extração, foi utilizado o kit comercial de purificação do DNA genômico *Wizard*[®] (*Promega Corporation*, EUA), seguindo-se exatamente todas as instruções do fabricante, conforme anexo.

4.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do Inglês, Polymerase Chain Reaction)

O desenvolvimento de novas metodologias de genética molecular, durante as décadas de 1980 e 1990, possibilitou a difusão de métodos muitas vezes simples e rápidos para detecção de mutações. A principal técnica desenvolvida foi o método da reação em cadeia da polimerase, criada em 1985 por Kary Mullis, tornando-se, em um período curto de tempo, a técnica mais utilizada em laboratórios de genética e biologia molecular e difundindo-se para laboratórios de diagnóstico (SEUÁNEZ *et al.*, 2004).

A PCR é um método que envolve a síntese enzimática *in vitro* de várias cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Esta reação se baseia no pareamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos - moléculas de DNA fita simples, usando como iniciadores oligonucleotídeos que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes oligonucleotídeos iniciadores, também chamados de *primers*, são sintetizados artificialmente, de maneira que suas seqüências de

nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo. Um ciclo de PCR envolve três etapas: (1) desnaturação, (2) anelamento e (3) extensão.

(1) A desnaturação consiste na separação das duplas fitas de DNA, através de uma elevação da temperatura para cerca de 92° a 95°C.

(2) Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida, dependendo do tamanho e da seqüência do iniciador utilizado, e que permite a hibridização DNA-DNA de cada iniciador com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo.

(3) Em seguida a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão, envolvendo a adição de nucleotídeos e utilizando como molde a seqüência-alvo. Deste modo, milhares de cópias desta seqüência alvo são realizadas em cada um dos diversos ciclos da reação, em uma escala geométrica (MULLIS *et al.*,1992).

Neste estudo, a técnica de PCR foi realizada no termociclador *GeneAmp*[®] 9700 (Perkin Elmer, EUA), para a detecção do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53*, identificação e genotipagem do HPV, avaliação da instabilidade genômica considerando a perda da heterozigose (LOH) e instabilidade de microssatélites (MIS), a partir dos protocolos sugeridos na literatura.

4.6.1. Detecção do Polimorfismo do Códon 72 do Gene *TP53*.

Na genotipagem dos alelos *p53Arg* e *p53Pro*, segundo SOURVINOS e colaboradores (2001), foram utilizados dois protocolos de termociclagem, um para o polimorfismo do gene que codifica *p53Arg* e outro para *p53Pro*, ambos presentes no códon 72 do gene *TPp53*. Os

detalhes desta estratégia de investigação, assim como os resultados destes procedimentos estão apresentados no Capítulo 1.

4.6.2. Identificação e Genotipagem do HPV

Os protocolos para a execução das reações de PCR na identificação e genotipagem do Papiloma Vírus Humano foram otimizados a partir dos protocolos sugeridos KARLSEN e colaboradores (1996). O Capítulo 2 descreve uma comparação entre os ensaios de PCR Convencional e em Tempo Real na detecção do genoma de HPV em pacientes com carcinoma espino-celular da laringe.

4.6.3. Avaliação da Instabilidade Genômica em loci Microsatélites

Para a análise da perda da heterozigose (LOH) e instabilidade de microsatélites (MIS) foi utilizado um banco com oito marcadores polimórficos de microsatélites: D17S1678; STS-M95585; D11S4962; RH68036; WI-20580; RH17792; RH92600 e STS-AA027856, conforme levantamento bibliográfico, considerando as regiões candidatas de terem uma maior frequência na instabilidade genômica em pacientes com carcinoma nas células escamosas da laringe. O Capítulo 3 apresenta esta metodologia de investigação, assim como os resultados de LOH e MIS para o carcinoma espino-celular da laringe.

4.7. Hibridação Genômica Comparativa (CGH - do Inglês, Comparative Genomic Hybridization)

A Hibridação Genômica Comparativa é uma alternativa para os estudos citogenéticos moleculares, por não depender do conhecimento prévio de regiões genômicas

freqüentemente afetadas e nem de células em metáfase do tecido em estudo (KALLIONIEMI *et al.*, 1992). Esta metodologia permite a detecção de perdas e ganhos de DNA, apresentando vantagens nas investigações de desequilíbrios genômicos, especialmente em tumores sólidos (SPECTOR *et al.*, 1998)

A técnica de CGH tem sido extensivamente utilizada para a identificação das alterações genéticas associadas ao câncer, permite a análise em um único experimento, de alterações do número de cópias de DNA de todo o genoma. Utiliza-se de uma amostra de DNA genômico teste (amostra tumoral de cada paciente) e uma de DNA genômico de referência, usado como controle, podendo ser uma amostra de tecido normal, como sangue ou pele, do paciente, ou ainda, pode ser uma amostra de um indivíduo qualquer que seja cariotipicamente normal (SAVANA, 2007).

O DNA genômico de referência é utilizado como sondas fluorescentes de DNA normalmente marcadas por moléculas repórteres, normalmente a biotina, apresentando fluorescência vermelha (Fluorocromo - TRITC), enquanto que o DNA genômico teste é marcado pela digoxigenina de fluorescência verde (Fluorocromo - FITC). As duas amostras de DNA genômicos são simultaneamente hibridadas em metáfases normais, contracoradas com DAPI, que apresenta uma fluorescência azul, na presença de DNA Cot-1. A inclusão de DNA Cot-1 é necessária para suprimir a ligação de DNA marcados na região centromérica e de heterocromatina, pois devem ser excluídas da análise, devido à variabilidade das seqüências repetitivas de DNA.

Posteriormente, ambos os DNAs são hibridados simultaneamente em cromossomos metafásicos normais que servem como a base da hibridação. Estes cromossomos geralmente não são do paciente, mas são, preferencialmente, de um indivíduo

cariotipicamente normal. A Figura 5 representa uma proposta de CGH na avaliação de tumores humanos.

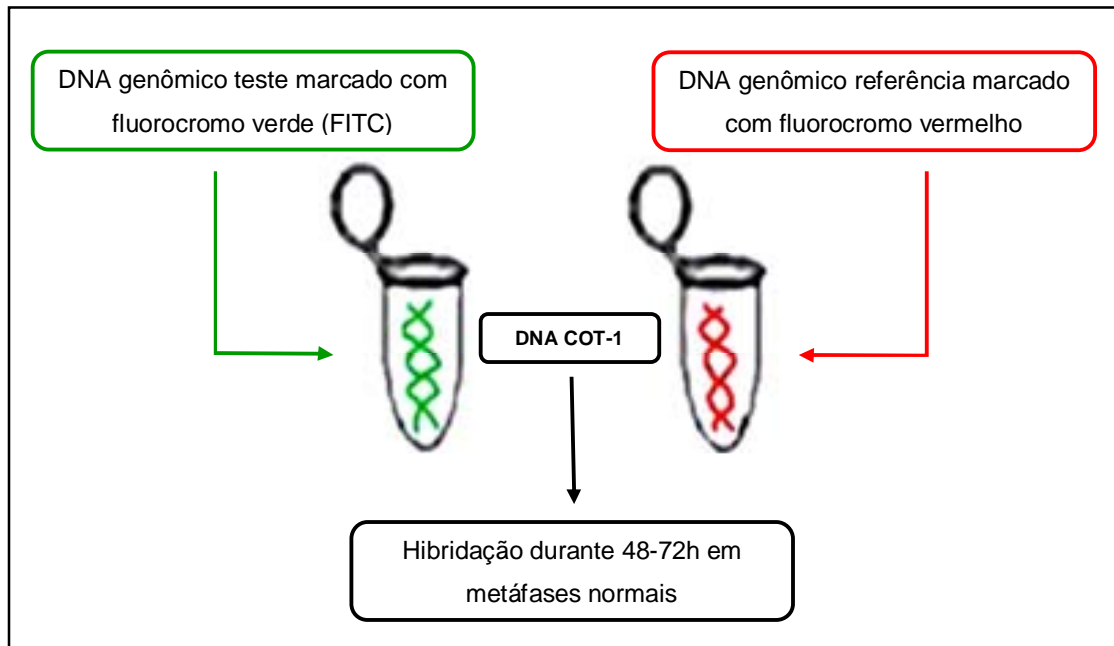


Figura 5. Modelo esquemático da técnica de Hibridação Genômica Comparativa, proposta por KALLIONIEMI e colaboradores (1992).

As sondas genômicas combinadas competem por sítios de hibridização complementares, conseqüentemente, se uma região apresenta ganho e/ou amplificação do número de cópias de DNA na amostra tumoral em comparação com o DNA referência, estes são visualizados por um excesso verde, e se uma região apresenta perda e/ou deleção, estas são visualizadas por um excesso de sinal vermelho. Em caso de não houver alterações o sinal correspondente será amarela ou ligeiramente alaranjado.

A Figura 6 destaca a formação dos sinais fluorescentes em CGH. Os sinais de fluorescência resultantes são então medidos quantitativamente, por meio de um sistema digital de análise digital de imagens, utilizando um software específico, que converte os dados da intensidade da hibridização

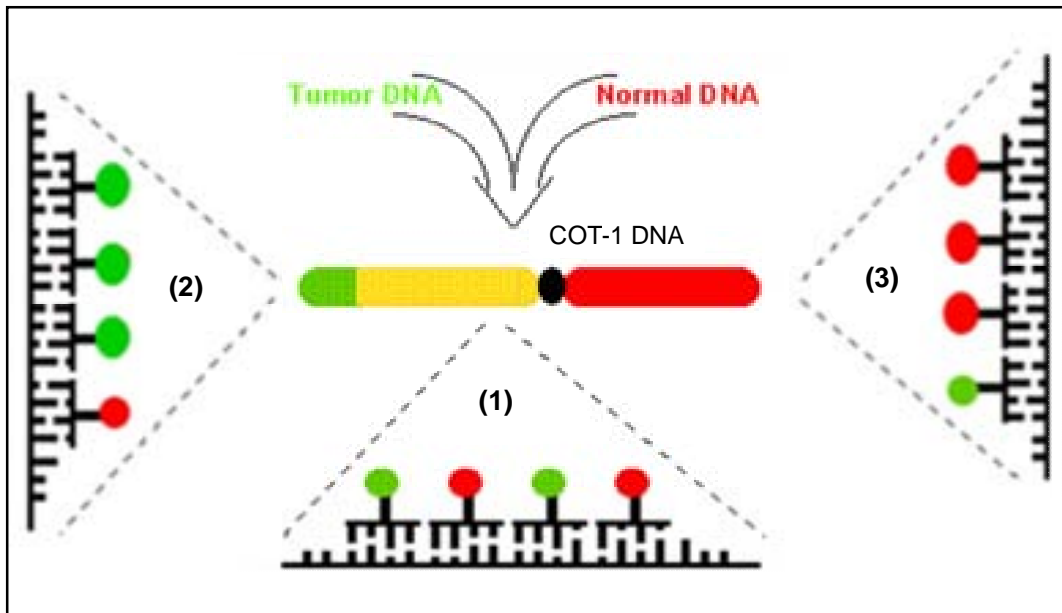


Figura 6. Hibridação Genômica Comparativa destacando a formação dos sinais fluorescentes em situações na ausência de desequilíbrios cromossômicos (1) e na presença de perdas e/ou deleções (2) e ganhos e/ou ampliações (3).

A Figura 7 apresenta a composição das imagens resultantes após a hibridação das sondas fluorescentes.

Utilizando um padrão de bandeamento DAPI, solução contracolorante, os cromossomos são pareados. No pareamento cromossômico é necessário um padrão de bandeamento DAPI, o qual permite o agrupamento correto dos pares cromossômicos.

Os cromossomos com sobreposição ou apresentando depósitos de corantes não devem ser considerados durante a análise.

A Figura 8 apresenta um modelo esquemático utilizado para o pareamento cromossômico DAPI.

A construção do perfil linear, conforme modelo apresentado na Figura 9 é realizada utilizando as imagens salvas no software, e permite uma visão panorâmica das regiões envolvidas nos desequilíbrios cromossômicos.

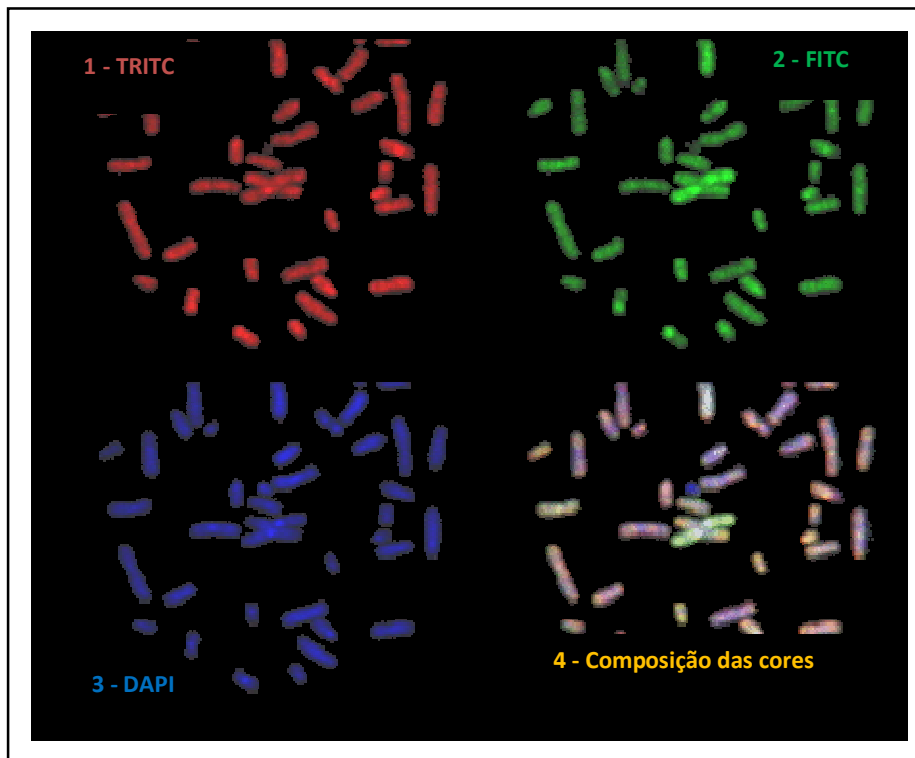


Figura 7. Resultado da captura individual da fluorescência em microscopia de luz, utilizando os filtros específicos para cada um dos fluorocromos utilizados. A imagem 4 corresponde à composição final das cores realizada pelo software específico.

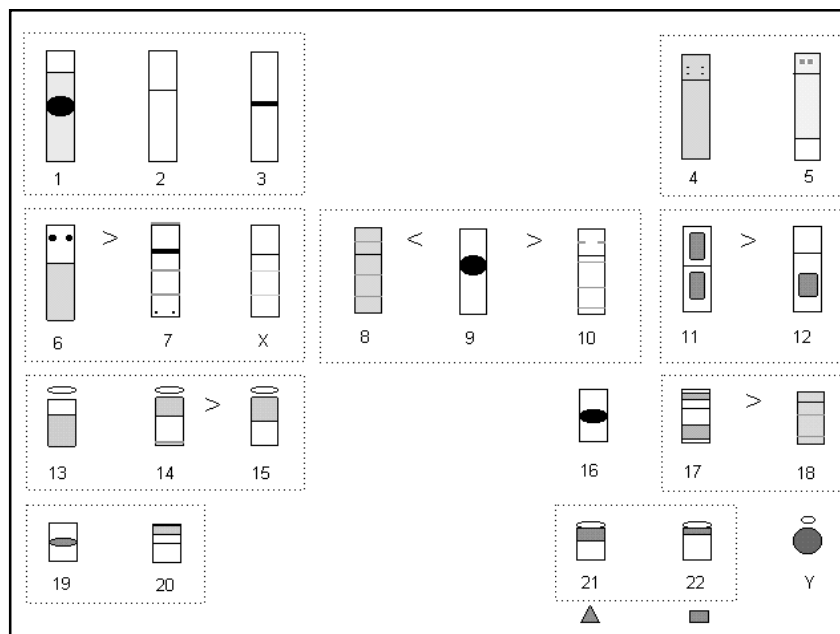


Figura 8. Modelo esquemático utilizado para identificação dos cromossomos obtidos pela fluorescência resultante da coloração pelo contracorante DAPI (azul). As áreas cromossômicas destacadas correspondem ao padrão de bandamento do corante (intensidade de cor) DAPI nas respectivas regiões dos cromossomos.

Ganhos e ampliações no DNA teste são identificados como regiões cromossômicas com razões de fluorescência aumentadas, enquanto perdas e deleções resultam em uma razão de fluorescência reduzida. As ampliações são diferenciadas de ganhos por apresentarem razões de fluorescência maiores em decorrência do maior número de cópias de DNA encontrados em uma região específica, comparação com o DNA de referência.

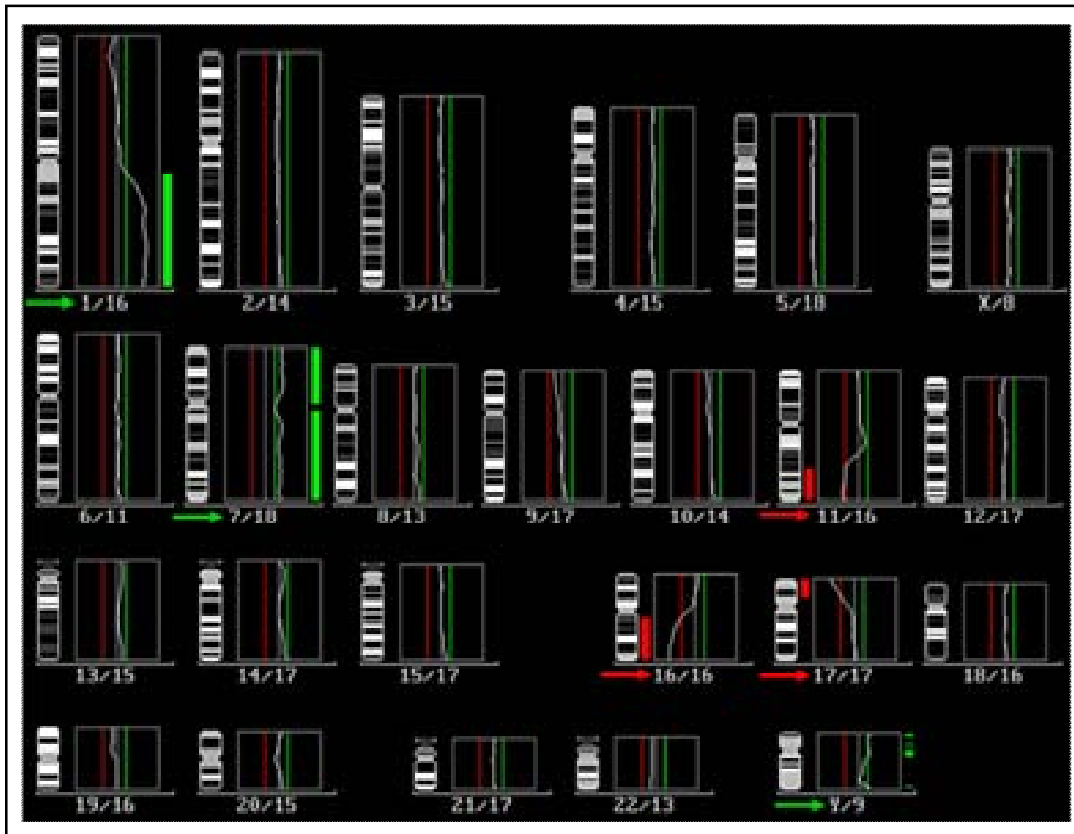


Figura 9. Perfil linear produzido após a captura de várias metáfases. As setas indicam as regiões cromossômicas onde o DNA genômico testado apresenta ganhos e/ou perdas.

Da mesma forma, deleções são diferenciadas de perdas por apresentarem razões de fluorescência menores em decorrência da ausência de seqüência de DNA genômico encontrada em uma região específica em comparação com o DNA de referência. Quando não há ganhos e/ou ampliações, assim como, perdas e/ou deleções não há excesso de

sinal verde ou vermelho, respectivamente, e o que se observa nestas regiões é um sinal amarelo (JAMES *et al.*, 1996; PIPER *et al.*, 1995; KALLIONIEMI *et al.*, 1992).

A sensibilidade da técnica é restrita à pureza da população celular usada no estudo, e à extensão e tamanho das alterações. Este teste não detecta alterações de baixa frequência, ou seja, as alterações devem estar presentes em uma porcentagem grande de células, pois esta técnica detecta apenas o clone predominante (WEISS *et al.*, 1999; KALLIONIEMI *et al.*, 1994).

Como a cultura celular não é necessária para a realização do CGH, essa metodologia possibilitou um grande progresso na análise das alterações cromossômicas em tumores de tecidos sólidos. Aplicações da mesma na pesquisa do câncer incluem sua utilização na triagem de tumores através de alterações genéticas específicas, localização de genes envolvidos na carcinogênese de subgrupos particulares de cânceres, análise de tumores em modelos experimentais para obter indícios da progressão tumoral, classificação diagnóstica, assim como na avaliação prognóstica (TIENARI *et al.*, 1998; SIMON *et al.*, 1998; HERMSEN *et al.*, 1998; RIED *et al.*, 1996; ISOLA *et al.*, 1995).

O Capítulo 4 apresenta a utilização do CGH no carcinoma da laringe. Os detalhes metodológicos e seus respectivos resultados estão apresentados e discutidos.

4.8. Eletroforese & Visualização dos Fragmentos de DNA

Com a influência de uma diferença de potencial elétrico, átomos, moléculas e partículas providas de cargas, em solução aquosa, são capazes de migrar na direção do eletrodo de carga oposta. Essa migração, em meio de viscosidade definida, acontecerá em diferentes velocidades, uma vez que as moléculas apresentam cargas e massas variáveis.

A mobilidade eletroforética, definida pela velocidade de migração por unidade de campo elétrico, é um parâmetro característico da molécula em um determinado meio de eletroforese. Este parâmetro é influenciado pela quantidade de cargas e o tamanho da molécula. Assim, a eletroforese é um método conhecido há muitos anos, mas era utilizada, principalmente, para separar RNA e proteína.

Após a década de 70, a eletroforese passou a ser utilizada para a separação de DNA, pois tais moléculas apresentam cargas negativas, devido à presença do grupamento fosfato em sua estrutura. Desta forma, quando submetido a um campo elétrico, em pH neutro, as moléculas de DNA migram do pólo negativo (cátodo) para o pólo positivo (ânodo). Sob ação de um campo elétrico, se o DNA está inserido em uma matriz que apresenta determinada resistência à migração, as moléculas pequenas alcançarão maiores distâncias que as grandes, gerando uma migração diferencial dos fragmentos (FARAH, 2000).

A matriz de resistência pode ser constituída de agarose, que possuem poros que permitem a separação de fragmentos que variam de 200pb a 50kb, e de poliacrilamida, que permitem a separação de fragmentos muito pequenos até de 1000pb. A força iônica e a concentração total de íons do tampão deve ser baixa, o mínimo para garantir um pH constante, reduzindo-se, desta forma, as correntes iônicas que fluem pelo gel e a dissipação térmica excessiva.

Nesta avaliação genético-molecular do carcinoma espino-celular da laringe em particular, os fragmentos de DNA obtidos durante a detecção e genotipagem do genoma de HPV, avaliação do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* e investigação da instabilidade genômica, foram separados em gel de poliacrilamida (8%) em TBE 2X, submetidos a um campo elétrico com voltagem constante de 10V/cm, por um tempo de 1h. Em cada canaleta

do gel foram aplicados 15 μ L de volume final, sendo 12 μ L de produtos de PCR tanto para *p53Arg* quanto para *p53Pro*, e para todos os outros produtos resultantes das reações de identificação e genotipagem de HPVs e investigação da instabilidade genômica (LOH e MIS), juntamente com 3 μ L de tampão de corrida a 6%.

Por outro lado, na metodologia CGH, os fragmentos do DNA genômico marcados com fluorocromos foram separados em gel de agarose (2%) em TBE 1X, submetidos a um campo Elétrico com voltagem constante de 10V/cm, por um tempo de 30 minutos, para a confirmação do tamanho dos fragmentos. Em CGH são recomendados que os fragmentos estejam variando entre 300-1000pb. Fragmentos muito pequenos ou muito grandes constituem um dos principais fatores da não obtenção dos sinais de fluorescência durante a hibridação comparativa.

Os protocolos para a confecção do gel de poliacrilamida 8%, agarose 2% e 6%, assim como o preparo das soluções utilizadas na produção dos géis, tampão de corrida eletroforética e corante para a visualização dos fragmentos amplificados encontram-se no Anexo II.

4.9. Análise Estatística

As variáveis contínuas foram descritas como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalos interquartis. As variáveis categóricas foram descritas em números absolutos e suas respectivas porcentagens. As freqüências das regiões cromossômicas envolvidas nos imbalanços observados foram computadas por método padrão de contagem numérica. Testes de qui-quadrado para tabelas 2x2 foram utilizados para avaliar a possível interação

entre o estadiamento tumoral do CEC da laringe com a frequência da presença do genoma de HPV, polimorfismo de *p53*, observação de LOH e/ou MIS e imbalances cromossômicos.

As diferenças nas características entre os grupos (presença ou ausência do genoma viral, polimorfismo, instabilidade genômica e imbalances cromossômicos) foram obtidas pelo teste *t* de *Student* ou pelo teste de qui-quadrado ou Teste de *Fisher*, conforme apropriado. Análise de variância (ANOVA) também foi realizada para determinar o potencial papel dos polimorfismos e das demais variáveis no desenvolvimento do CEC da laringe.

A avaliação do equilíbrio de Hardy-Weinberg para a distribuição alélica, frequência de genótipos e fenótipos associados ao gene *p53*, foi realizada utilizando o *software GenePop® 3.4 web version*.

Adicionalmente, na avaliação dos aspectos epidemiológicos do carcinoma espinocelular da laringe, o cálculo da sobrevida geral e relativa foi obtido de acordo com as variáveis clínico-epidemiológicas. Para isso, o teste de *logrank* foi realizado para comparar as diferenças estatísticas entre as curvas de sobrevida, utilizando o *software GraphPad-Prism®* versão 4.0.

Nas demais situações, as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *BioEstat* versão 3.0 para *Windows*, além do *Excell®* do pacote *Office XP2007*. Em todas as análises, um valor de *p* bi-caudal $< 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, exceto quando indicado.

CAPÍTULO 01

Análise do Polimorfismo do Gene *TP53* e Infecção por HPV em Pacientes com Carcinoma das Células Escamosas da Laringe

da Silva CC; da Silva Jr. RL; Silva AMTC & da Cruz AD

RESUMO

A predisposição genética associada a outro evento somático adicional pode induzir a iniciação, a promoção e a progressão tumoral. Os estudos sobre polimorfismo alélico de genes supressores de tumor têm sugerido uma possível susceptibilidade dependente do fenótipo individual. Adicionalmente, agentes etiológicos potenciais, como o HPV, contribuem para um aumento no risco relativo de desenvolvimento dos carcinomas. No gene *TP53* é observado um polimorfismo no códon 72 do éxon 4, que consiste em uma variação entre dois pares de bases, citosina (C) e guanina (G), que resulta em proteínas variantes para o aminoácido 72, contendo prolina [CCC, *p53Pro*] ou arginina [CGC, *p53Arg*], respectivamente. O objetivo do presente estudo foi relacionar o polimorfismo do gene *p53* em 20 pacientes com CEC de laringe, cujos genótipos foram determinados por PCR a partir de DNA extraído do creme leucocitário de sangue periférico. A infecção por HPV foi avaliada em biópsias a fresco destes pacientes por PCR, utilizando-se os primers consenso MY09/MY11 e GP5/GP6. Após a amplificação do genoma viral, procedeu-se a genotipagem dos HPVs por PCR usando-se primers tipos-específicos. Todos os fragmentos amplificados foram resolvidos em gel de poliacrilamida a 8% e corados com nitrato de prata. Em relação ao polimorfismo de *TP53*, os resultados foram 65% (13/20) de homozigotos *Arg/Arg* e 35% (7/20) de heterozigotos *Pro/Arg*. Em 20% dos pacientes foi observada a presença de genoma

HPV associada às células tumorais, tendo sido genotipados os subtipos virais HPV 16 em uma amostra e HPV 11 e 45 na outra amostra, caracterizando uma coinfeção. Os dois casos positivos para HPV apresentaram genótipo homozigoto para arginina em *TP53*. Os resultados deste estudo corroboram os dados publicados na literatura pertinente, que correlacionam a susceptibilidade aumentada para CEC da laringe em indivíduos homozigotos para *p53Arg* e a maior susceptibilidade destes à carcinogênese vírus-induzida. Por outro lado, a presença de genoma HPV 11 em células da laringe acentua o papel deste subtipo viral nas lesões neoplásicas do epitélio laríngeo. Portanto, os estudos de investigação do papel oncogênico dos HPVs de baixo risco devem ser mais explorados.

Palavras-chave: Gene *TP53*; Polimorfismo gênico; HPV; CEC da laringe.

INTRODUÇÃO

A análise de dados, intermediada por inúmeros estudos epidemiológicos, demonstram que o câncer é uma importante causa de óbitos na população mundial. Os tipos de neoplasias são, em sua maioria, classificadas por regiões ou sítios anatômicos no qual se origina o tumor. Dessa forma, os cânceres de cabeça e pescoço, sobretudo o da laringe, vêm se destacando pela sua alta incidência e relevância pelos pesquisadores de diversas áreas de conhecimento (CAIRNS, 1995).

O câncer resulta de mutações em células somáticas e/ou germinativas. Sua progressão envolve a expressão de uma série de genes, dentre eles, os oncogenes, os quais transcrevem produtos protéicos que estimulam positivamente o ciclo celular (THOMPSON *et*

al., 1993; HOLLSTEIN *et al.*, 1991). Os mecanismos de ativação dos genes que participam na oncogênese incluem translocações cromossômicas, mutações de ponto, deleções, inversões e ampliações do DNA (ANDERSON *et al.*, 1992; MERRITT *et al.*, 1990). Adicionalmente, a perda de função de genes supressores de tumor também é associada à progressão tumoral. Assim, o câncer é o resultado de um acúmulo de alterações genéticas que comprometem o controle do crescimento celular normal e a diferenciação terminal (HOLLSTEIN *et al.*, 1991).

Apesar da prevalência de tumores da cabeça e pescoço, ser relativamente alta na população, pouco se conhece sobre a sua biologia e sobre os fatores que regulam o seu crescimento. Uma melhor compreensão do papel dos oncogenes e dos genes supressores de tumor, no controle do crescimento normal e diferenciação celular, poderá contribuir para elucidar fatores relacionados à biologia dos tumores da cabeça e pescoço. Uma atividade anormal ou exacerbada de muitos oncogenes pode estar associada ao desenvolvimento do fenótipo maligno em muitos tipos cânceres (MERRITT *et al.*, 1990), sejam eles de ocorrência natural ou experimentalmente induzidos.

SIDRANSKY (1997) encontrou anomalias citogenéticas freqüentes em tumores da cabeça e pescoço envolvendo os cromossomos 3, 5, 8, 9, 18 e 21, destacando que o gene da *ciclina D1* apresenta-se freqüentemente amplificado em cânceres da laringe, provavelmente devido à falta de supressão pela proteína RB e particularmente p16.

Adicionalmente, a perda da regulação negativa normal do ciclo celular sugere mutações no gene do *receptor do tipo II TGF- β* . O locus mais comumente deletado em tumores da cabeça e pescoço é a 9p21-22 (NAWROZ *et al.*, 1994), que contém o gene da proteína p16, um potente inibidor do complexo ciclina *D1/CDK4*.

A perda em 17p é relativamente pouco freqüente nos tumores da cabeça e pescoço. Esta observação sugere que outros genes supressores de tumores devem estar envolvidos na evolução dessas neoplasias (JI *et al.*, 2008).

Fatores de Risco

Tabaco & Álcool – Os mais bem conhecidos fatores de risco para o carcinoma da laringe

Os dois agentes associados apresentam uma forte relação dose-resposta com o risco de câncer laríngeo por apresentarem efeito sinérgico (STICH *et al.*, 1983). Os efeitos do tabaco e do álcool na iniciação e promoção de carcinoma da laringe têm sido demonstrados em estudos conduzidos na América do Norte, Europa, Índia e América do Sul. Adicionalmente, o risco de carcinoma da laringe apresentou-se aumentado entre os fumantes que faziam seus próprios cigarros (sem filtros), quando comparados com fumantes de cigarros manufacturados. Outra condição de risco é o uso crônico de vinho tinto e licor destilado, pois também aumentam o risco oncogênico para CEC da laringe (De STEFANI *et al.*, 1992).

Exposição Ocupacional – Uma condição de risco inerente ao exercício da profissão

O único carcinógeno ocupacional estabelecido para câncer de laringe é a exposição ao vapor de ácidos inorgânicos fortes (IARC, 1992). A evidência associando a exposição aos asbestos e cânceres de laringe são controversos (MARCZYNSKI *et al.*, 2000). Inúmeros de agentes adicionais, incluindo níquel, cromo, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e pó de

madeira têm sido implicados na iniciação e promoção de carcinoma da laringe (CALVERT *et al.*, 1998; MAIER *et al.*, 1997).

Dentre os grupos ocupacionais, fazendeiros, trabalhadores da indústria têxtil, abatedores em frigoríficos, trabalhadores na preparação de alimentos e mecânicos têm sido atribuídos um risco aumentado para o carcinoma da laringe (BOFFETTA *et al.*, 2000; GUBERAN *et al.*, 1993).

Dieta – Fatores dietários & risco aumentado de carcinoma da laringe

A ingestão freqüente de frutas e verduras é provavelmente um fator protetor contra carcinoma da laringe (WCRF/AICR, 1997). Adicionalmente, carne de peixe e leite e seus derivados têm demonstrado um efeito protetor (De STEFANI *et al.*, 1999). Por outro lado, o consumo de carne vermelha tem sido associado a um aumento no risco de carcinoma da laringe (TAVANI *et al.*, 2000).

No entanto, a evidência do efeito de consumo de carne de peixe, leite e carne vermelha ainda são inadequadas (WCRF/AICR, 1997). A ingestão de mate tem sido associada ao aumento do risco de câncer da laringe em estudos no Uruguai (De STEFANI *et al.*, 1987) e no Sul do Brasil (PINTOS *et al.*, 1994).

Papilomavírus Humano (HPV): Uma interação bioquímica entre proteínas virais & supressoras tumorais desafiam o controle do ciclo celular

O HPV é um vírus DNA de dupla fita, cujo genoma contém aproximadamente 8×10^3 pb (MATZOW *et al.*, 1998). Mais de 100 tipos de HPV já foram identificados até a presente

data e alguns tipos são altamente oncogênicos. Os tipos de HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52 e 58 são considerados participantes do grupo de alto risco para carcinogênese cervical (NODA *et al.*, 1998). Nesse contexto, a infecção por HPV tem sido associada ao desenvolvimento de alguns tumores de epitélio esfoliado (NIV *et al.*, 2000).

Os HPVs de alto risco oncogênico expressam proteínas capazes de imortalizar e eventualmente transformar células em cultura (VILLA *et al.*, 1995). Especificamente os genes virais E6 e E7 dos HPVs dos tipos 16, 18 e 33 desempenham o papel de oncogenes.

Os oncogenes virais encontrados integrados ao genoma de células cervicais cancerosas resultam na estabilidade da expressão dos genes E6 e E7 (KARLSEN *et al.*, 1996). As oncoproteínas E6 e E7 desses HPVs são conhecidas pelo seu envolvimento de iniciação e manutenção de cânceres. Basicamente, a ligação da proteína viral E6 à proteína p53 estimula a degradação de p53 celular, enquanto que a proteína E7 altera o controle do crescimento celular ligando-se a proteína RB, inibindo a sua função (CEROVAC *et al.*, 1996).

A perda da função de supressão tumoral dos produtos dos genes *p53* e *rb* pode contribuir significativamente para o fator carcinogênese (NODA *et al.*, 1998).

Atualmente, evidências crescentes sugerem especificamente que os HPVs 16 e 18 estão associados aos cânceres orais e lesões pré-malignas de cavidade oral.

Estudos individuais têm mostrado uma variação total de 0-100% na presença de tipos de HPV nas lesões e tumores orais (OLIVEIRA, 2005; SILVA *et al.*, 2003; D’COSTA *et al.*, 1998).

Fatores Genéticos – Condições de susceptibilidade ao carcinoma da laringe

A agregação familiar dos cânceres da laringe tem sido descrita por vários autores (ANKATHIL *et al.*, 1996; FOULKES *et al.*, 1995) que sugerem um polimorfismo genético das

enzimas metabolizadoras de agentes carcinógenos. A modulação dos processos de biotransformação é geneticamente determinada e é provável que isto seja uma das maiores fontes de variabilidade inter-individual na susceptibilidade aos agentes carcinógenos (HARRIS, 1987).

As enzimas que metabolizam os agentes carcinogênicos encontrados no fumo, álcool e nos produtos alimentícios apresentam um importante papel na iniciação e promoção dos cânceres da laringe. Assim, o polimorfismo dos genes que codificam para essas enzimas deve ser refletido na variabilidade do risco individual.

Adicionalmente ao polimorfismo genético, a expressão local das enzimas do metabolismo dos agentes carcinogênicos pode ser também relevante, particularmente para os tumores da cavidade oral, onde a comida, fumo, álcool, infecção por HPV ou inflamação são capazes de induzir a atividade de enzimas específicas no órgão alvo. Incluem nesse grupo as enzimas citocromos P450 (CYPs), que representam uma superfamília de enzimas capazes de metabolizar várias drogas e substâncias químicas.

O papel da predisposição genética no câncer da laringe, bem como em outros tumores da cabeça e pescoço, tem sido bem documentado através de estudos das síndromes de múltiplos neoplasmas (TRIZNA & SCHANTZ, 1992), estudos de múltiplos tumores primários (SPITZ *et al.*, 1994) e estudos da história familiar de câncer (BONDY *et al.*, 1993). Em um estudo brasileiro, um aumento de 3 vezes no risco de câncer da laringe foi observado em indivíduos parentes em primeiro grau de portadores de câncer de qualquer topografia (FOULKES *et al.*, 1995). O risco relativo ainda apresentava-se maior, se o parente em primeiro grau havia desenvolvido um tumor de cabeça e pescoço.

Estudos sobre o polimorfismo genético das enzimas envolvidas na ativação e detoxificação de agentes carcinogênicos sugerem uma ligação com o risco de carcinoma da laringe. Atividade elevada de P450 CYP2D6 foi associada com o aumento do risco para esse tipo particular de câncer na França (BENHAMOU *et al.*, 1996). Adicionalmente, o polimorfismo das enzimas álcool-desidrogenase (ADH), aldeído-desidrogenase (AIDH) e mieloperoxidase podem influenciar no risco dos cânceres da laringe.

Polimorfismo genético ocorre quando existem, pelo menos, dois alelos distintos de um determinado gene, presente em uma população (WUNSH-FILHO *et al.*, 2001). O polimorfismo é uma variação na seqüência do DNA entre indivíduos de uma mesma espécie apresentando a freqüência alélica de no mínimo 1%. A contribuição genética herdável de uma neoplasia é avaliada em 5 a 10% de todos os cânceres humanos. Portanto, cerca de 90% dos casos de câncer resultam, de forma esporádica, da associação entre os fatores ambientais e de variáveis que definem uma suscetibilidade genética ao desenvolvimento tumoral (YUSPA, 2000).

A modulação dos processos de biotransformação baseia-se na codificação e expressão de diversos genes, sendo esse fator a provável causa das maiores fontes de variabilidade interindividual na suscetibilidade aos agentes carcinogênicos (MASSON *et al.*, 2005).

O gene *TP53*, localizado em 17p13.1, codifica uma proteína nuclear de peso 53 kDa (COTRAN *et al.*, 1994). O polimorfismo localizado no códon 72 do éxon 4 deste gene é identificado um SNP (do Inglês, “*Single Nucleotide Polymorphism*”), ou seja, as variações na seqüência de DNA estão associados com alterações de apenas uma base nitrogenada, levando a alterações estruturais da proteína p53.

Segundo RIBEIRO JR & SAFATLE-RIBEIRO (2006) o SNP acarreta mudança na seqüência de aminoácidos da proteína p53, resultando na presença de duas variantes para o resíduo 72 na população. O códon 72 do éxon 4 pode codificar um aminoácido arginina ($p53^R$) ou uma prolina ($p53^P$).

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

A proteína p53 regula a replicação de DNA, a proliferação e morte celulares (COTRAN *et al.*, 1994). Não se sabe ao certo o mecanismo de ação pelo qual a proteína p53 age como supressor neoplásico (FAN *et al.*, 2000). A proteína p53 previne a propagação de células geneticamente danificadas, apresentando uma meia vida muito curta, mensurada em minutos e não há evidência de que seja requerida para divisão celular normal.

Quando as células são expostas aos agentes mutagênicos químicos ou radiação, alterações genéticas podem resultar em modificações pós-translacionais do gene *TP53* (COX & WALKER, 1996). Essas mutações resultam na síntese de proteínas com alterações conformacionais, funcionalmente defeituosas, de meia vida maior em relação à proteína p53 selvagem (YAN *et al.*, 1996).

A proteína p53 selvagem age na célula promovendo a parada do ciclo celular na fase G1. Parada reversível e necessária, pois permite que a célula repare o DNA lesionado pelo

agente mutagênico. Uma falha neste mecanismo aumenta o risco de células mutadas se dividirem e proliferarem.

Segundo os autores COX & WALKER (1996), a perda da atividade da proteína p53 faz com que células expostas aos agentes mutagênicos repliquem o DNA danificado. Desta forma incorporando as mutações ao genoma. Embora uma mutação apenas não seja suficiente para transformar uma célula, a perda da atividade da proteína p53 predispõe as células às mutações subseqüentes e finalmente à transformação maligna (WONG *et al.*, 18, 1998).

A atividade supressora da proteína p53 pode ser inativada por produtos de certos oncogenes nucleares (COTRAN *et al.*, 1994). A inativação desta proteína pode preceder o desenvolvimento neoplásico na carcinogênese.

Segundo INSERRA e colaboradores (2003), algumas formas mutantes do gene *TP53* não apenas perdem sua função normal, mas também ganham a habilidade de inativar a proteína p53 selvagem. Assim, uma célula com um alelo mutante e um alelo selvagem funciona como se não tivesse qualquer função supressora. Mutações deste tipo são chamadas de dominante negativo porque o alelo mutante age predominantemente (JI *et al.*, 2008).

Os objetivos deste estudo foram estabelecer a prevalência do genoma do HPV associado à análise do polimorfismo do códon 72 do gene *p53* em pacientes com tumores malignos da laringe.

Este estudo permite determinar a frequência e a distribuição dos tipos de HPVs associados ao tecido tumoral a partir de portadores de tumores malignos da laringe, além da análise e identificação da distribuição percentual do polimorfismo do códon 72 do gene

TP53, assim como a distribuição dos homozigotos [*p53^{PP}*], [*p53^{AA}*] e dos heterozigotos [*p53^{PA}*] em pacientes com o carcinoma da laringe. Neste sentido, é possível correlacionar os resultados obtidos com a sobrevida individual, associando os dados do estadiamento do tumor ao diagnóstico, contribuindo para uma melhor compreensão da biologia molecular dos tumores de cabeça e pescoço, com ênfase no tumor da laringe.

Material e Métodos

Grupo Amostral

Foram selecionados junto ao Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge (HAJ/ACCG), 20 casos de carcinoma de células escamosas da laringe (sangue periférico e biópsias a fresco), combinados segundo a idade e o sexo. Um questionário sobre o estilo de vida com informações biométricas e termo de anuência assinado pelos pacientes está arquivado no Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Foram considerados como casos apenas os indivíduos recém diagnosticados com tumores primários de cavidade oral, definidos através do Código Internacional de Doenças para Oncologia, que inclui várias topografias possíveis para os tumores da cavidade laríngea, que tenham sido histologicamente confirmados pelo Serviço de Patologia. Os casos não passaram por nenhuma terapia primária, nem foram previamente tratados com radio e/ou quimioterapia local ou sistêmica.

Coleta e Preparação das Amostras

As amostras de sangue periférico heparinizado, colhidas em tubos *falcon* de 12mL, foram centrifugadas a 5000rpm durante 15 minutos. Foram preparadas a partir da

centrifugação, alíquotas de plasma armazenadas em *criotubos*, no qual continham o plasma sanguíneo, *buffy coat* (obtido do anel leucocitário) e hemácias, devidamente rotuladas e armazenadas em *freezer* a - 20°C na forma de banco de amostras. Foram adquiridos junto ao médico responsável, amostras de tecido fresco não-infectadas e livre de necrose sendo congelada imediatamente até o momento do uso.

Extração e Purificação de DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada com uso do kit de extração *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Corporation, EUA), de acordo com o protocolo de extração sugerido pelo fabricante. As amostras depois de extraídas foram submetidas, primeiramente, à PCR para a identificação e genotipagem específica de HPVs.

Protocolo de PCR

Posteriormente, as amostras foram submetidas a duas reações individuais de PCR com *primers* para a genotipagem dos alelos $p53^A$ e $p53^P$, segundo SOURVINOS e colaboradores (2001). O *primer* D8S135 foi utilizado como controle interno da reação. A seqüência de todos os *primers* e o tamanho esperado de seus produtos amplificados para o estudo da detecção do genoma e genotipagem do HPV e o polimorfismo do gene *TP53* encontram-se na Tabela I. Os fragmentos de DNA microssatélite foram amplificados utilizando termociclador *GeneAmp® 9700* (Perkin Elmer, USA) e os *primers* polimórficos para as regiões flangeadoras das seqüências de interesse. As condições de PCR para um volume final de 25µL de reação foram: 25µL de água Mili-Q, 0,3nmol de *primer* alelo-específico (Invitrogen, USA), 1U de *Taq DNA polimerase* (Promega, USA), 1X de *STR® buffer* (Promega,

USA) (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 0,2mM dNTPs e 0,5mM de MgCl₂) e 100ng de DNA genômico total.

Tabela I. Sequências de *primers* utilizados na investigação de HPV e no estudo do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53*.

Primers	Seqüência (5'→3')	Tamanho do Amplicon (pb)
<i>p53^AR/p53^AF</i>	TCC CCC TTG CCG TCC CAA CTG GTG CAG GGG CCA CGC	141
<i>p53^PR/p53^PF</i>	GCC AGA GGC TGC TCC CCC CGT GCA AGT CAC AGA CTT	177
D8S135R/F	GGG AGG CTT TAT AAT TAT TTA GC CTG GGC AAC AGA GTG GGA C	100
HPV 6R/F	CAC GTC TGC AAC GAC CAT AG CCA TGA AAT TCT AGG CAG CA	195
HPV 11R/F	CGC AGA GAT ATA TGC ATA TGC AGT TCT AAG CAA CAG GCA CAC	90
HPV 16R/F	TCA AAG CCA CTG TGT CCT GA CGT GTT CTT GAT GAT CTG CAA	119
HPV 18R/F	CCG AGC ACG ACA GGA ACG ACT TCG TTT TCT TCC TCT GAG TCG CTT	172
HPV 33R/F	AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG ACA CAT AAA CGA ACT GTG GTG	211
HPV 35R/F	CCC GAG GCA ACT GAC CTA TA GGG GCA CAC TAT TCC AAA TG	230
HPV 45R/F	ACC AGA TTT GTG CAC AGA AT TTT TTT CCA GTG TCT CTC CA	236
HPV 58R/F	GGA CAT TGC ATG ATT TGT GT TTT CTT GTG GAC ACA ATG GT	314
MY09/MY11	CGT CCA AGA GGA TAC TGA TC GCC CAG GGT CAT AAC AAT GG	450
GP05/GP06	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C	170

R = Reverse (Reverso); F = Forward (Direto)

Para a amplificação do DNA na detecção e genotipagem do genoma de HPV e dos fragmentos de 141pb ($p53^R$) e de 177pb ($p53^P$) do códon 72 do gene *TP53* foram utilizados os protocolos de termociclagem descritos na Tabela II e III, respectivamente.

Tabela II. Protocolo da termociclagem para o ensaio de PCR para a amplificação do genoma de HPV.

Etapas		Temperatura (°C)	Tempo (min.)
Desnaturação inicial		95	5
Ciclos (10)	Desnaturação	95	1
	Anelamento	57	1
	Extensão	72	1
Ciclos (30)	Desnaturação	95	1
	Anelamento	50	1
	Extensão	72	1
Extensão final		72	5
Conservação		4	∞

Tabela III. Protocolo da termociclagem para o ensaio de PCR para a amplificação dos fragmentos de 141pb ($p53^R$) e de 177pb ($p53^P$) do códon 72 do gene *TP53* a partir de DNA total extraído das células de CEC da laringe.

Etapas		Etapas	Etapas
Desnaturação inicial		95	5min
Ciclos (35)	Desnaturação	94	30s
	Anelamento	55	45s
	Extensão	72	1min
Extensão final		72	7min
Conservação		4	∞

Os produtos de PCR foram separados em gel de poliacrilamida a 8% (PAGE 8%) em TBE 1X mediante aplicação de um campo elétrico constante de 10V/cm por 2 horas. Como marcador de peso molecular, foi utilizado um *ladder* de 50pb (0,025µg/µL) aplicado nas raias iniciais do gel.

Para a visualização do DNA amplificado, o gel foi submerso em TBE 1X contendo brometo de etídeo (5mg/mL) por aproximadamente 15 minutos e em seguida as imagens foram capturadas utilizando o sistema de vídeo-documentação *ImageMasterVDS*[®] (Amersham Pharmacia Biotech, USA).

Resultados e discussão

A Figura 1 ilustra as freqüências observadas para o polimorfismo do códon 72 do gene *TP53*.

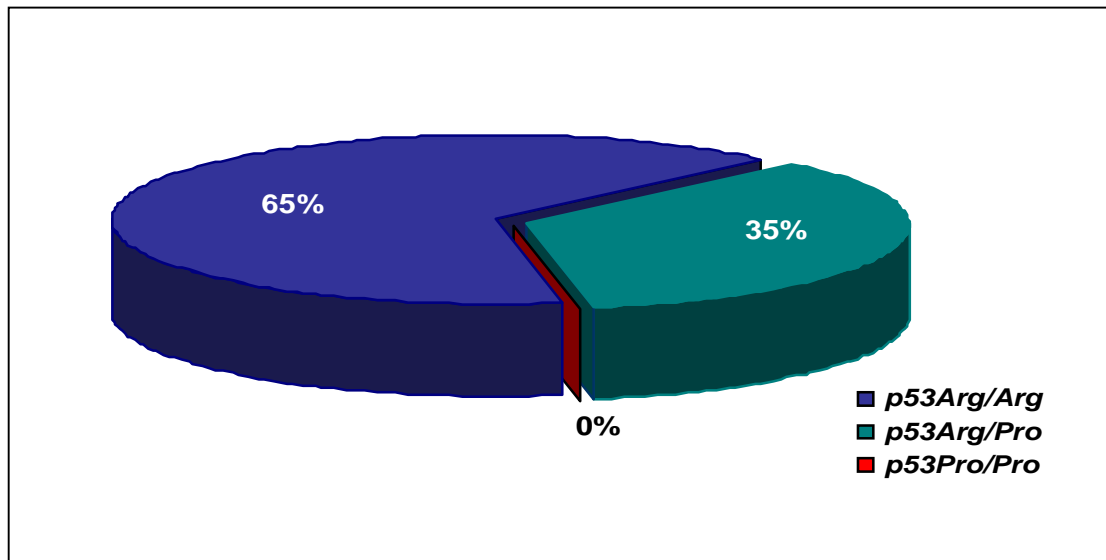


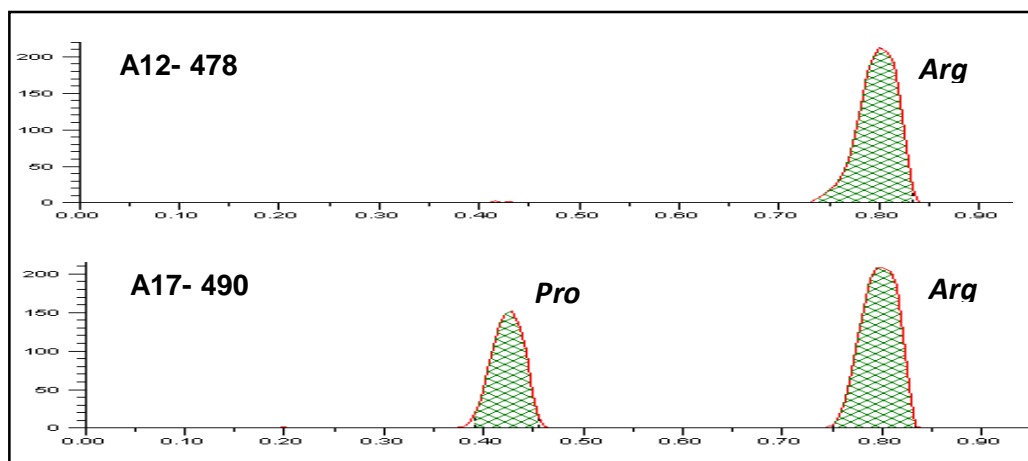
Figura 1. Freqüência alélica da análise do polimorfismo do gene *TP53* em 20 pacientes com CEC da laringe.

Na análise do polimorfismo alélico do códon 72 do gene *TP53*, foi observado 65% (13/20) para o genótipo *p53^{AA}*, 35% (7/20) mostraram-se heterozigotos *p53^{PA}* e nenhum caso de homozigose para *p53^{PP}*.

A Tabela IV apresenta as freqüências genotípicas, associadas ao estadiamento do tumor e sexo, enquanto que a Figura 2 evidencia um eletroferograma destacando o polimorfismo do gene *TP53*.

Tabela IV. Polimorfismo do gene *TP53* associado ao estadiamento do tumor.

Polimorfismo	Frequência	Sexo		Estadiamento			
		Mas	Fem	I	II	III	IV
$p53^{AA}$	0.65	12	1	2	4	3	6
$p53^{PA}$	0.35	6	1	0	2	1	2
$p53^{PP}$	0.0	0	0	0	0	0	0
Total	1.00	18	2	2	6	4	8

**Figura 2.** Eletroferograma evidenciando o polimorfismo do gene *TP53*. Em A12-478 genótipo homocigoto $p53^{AA}$. Em A17-490 genótipo heterocigoto $p53^{PA}$.

Dos indivíduos que apresentam um estadiamento IV (8/20), 75% (6/8) apresentaram homocigose para $p53^{AA}$. Os resultados encontrados corroboram com dados da literatura e predizem uma predisposição aumentada para indivíduos homocigotos [$p53^{AA}$] em pacientes com CEC da laringe.

Ao aplicar o teste de Hardy-Weinberg, utilizando o *software GenePop® 3.4 web version*, verificou-se que as frequências alélicas observadas no grupo estudado não se mostraram em equilíbrio, o que pode ser justificado pelo tamanho limitado das amostras. A

situação de equilíbrio teoricamente proposta por Hardy-Weinberg só pode ser observada em análises de extensas populações panmíticas, nas quais todos os indivíduos, ao longo de sua distribuição geográfica, formam uma população única com acasalamento aleatório (OLIVEIRA, 2005; FUTUYAMA, 1997).

Apesar dos indivíduos com CEC na laringe de não estarem em equilíbrio de Hardy-Weinberg, podemos observar que o alelo $p53^A$ foi o mais prevalente. Estes dados corroboram os relatos de OLIVEIRA (2005) e INSERRA e colaboradores (2003), que também encontraram uma maior prevalência do alelo $p53^A$ e de seu genótipo homozigoto em pacientes com carcinoma espinocelular da laringe e em diferentes grupos étnicos da América como brancos não-hispânicos, mexicanos, afro-americanos, asio-americanos e americanos nativos, respectivamente.

A Tábua de Vida Atuarial permitiu calcular a sobrevida geral (84,4%) dos pacientes, ao final de 72 meses, conforme evidenciado na Figura 3. Ao aplicar o teste de *Logrank* para os diferentes genótipos de polimorfismo do gene *TP53*, não foram obtidas diferenças significativas entre as sobrevidas.

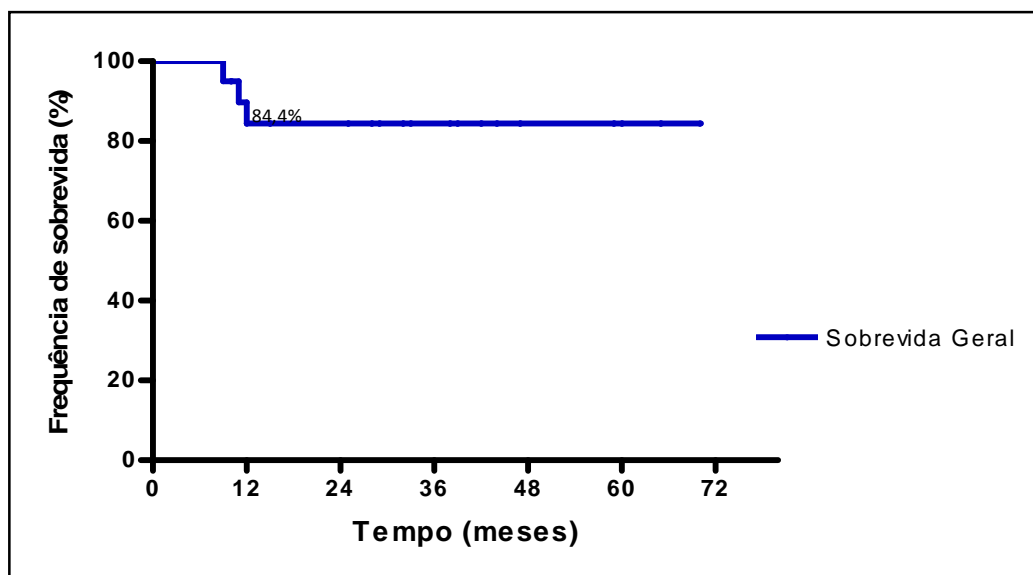


Figura 3. Sobrevida geral dos pacientes com CEC da laringe envolvidos na análise do polimorfismo do gene *TP53*.

A amplificação do genoma viral do HPV nas amostras foi observada em 20% dos casos, sendo genotipados os HPVs 11, 45, caso de co-infecção, e HPV 16 para a outra amostra. Os pesos moleculares para os respectivos *primers* genéricos MY09/11 e os tipos específicos HPV 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45 e 58 estão contidos na Figura 4.

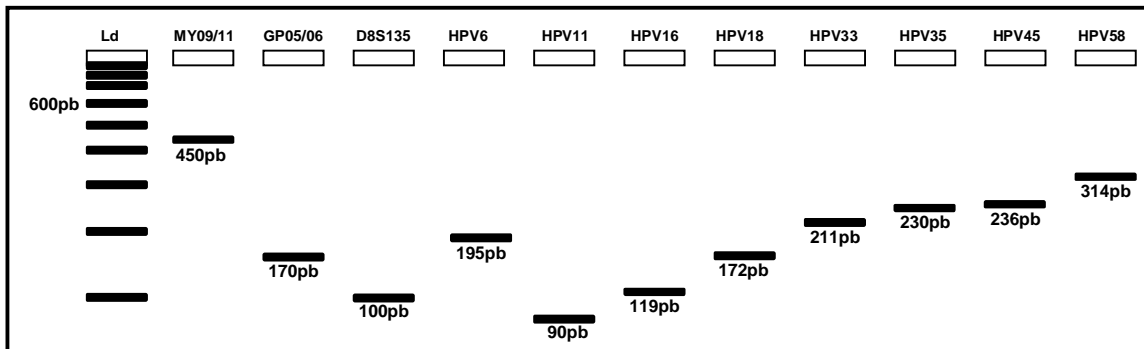


Figura 4. Posição das bandas amplificadas pelos *primers* genéricos MY09/11 e os HPVs tipo-específicos. Ld: marcador de tamanho de 100pb (*Promega Corporation, USA*).

A Figura 5 apresenta um gel de poliácridamida 8% revelado em solução de Brometo de Etídeo (5µg/mL) evidenciando os tipos de HPVs identificados nas amostras avaliadas.

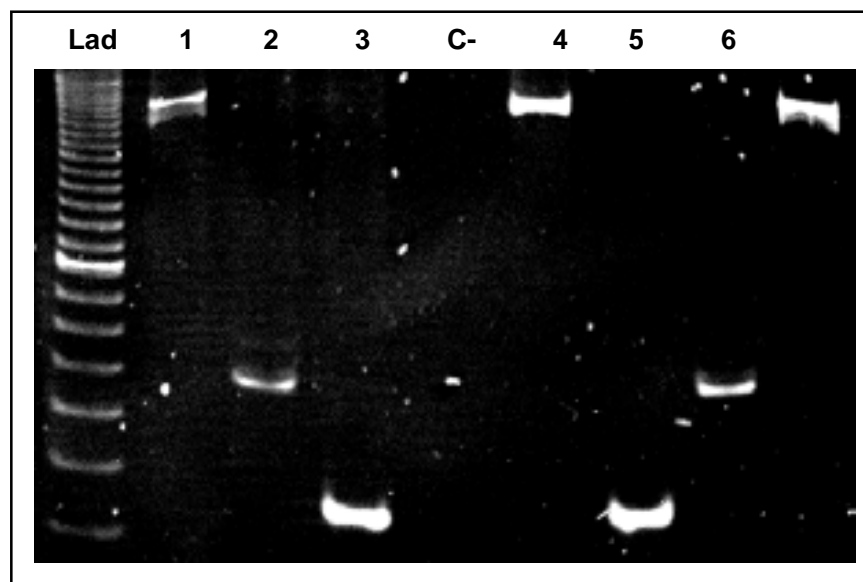


Figura 5. Nas raias 1, 4 e 2, 6 mostram amplificação por MY09/11 e GP5/6, respectivamente, indicando presença de genoma viral nas amostras A04 e A07. Lad: Marcador de peso molecular. C+ e C-: Controle positivo e negativo respectivamente. Nas raias 3 e 5, o controle interno da reação D8S135.

Conclusões

A análise da prevalência de HPV em amostras de tumores de cabeça e pescoço tem sido utilizada por muitos pesquisadores no sentido de correlacionar a infecção desse vírus com a iniciação, promoção e progressão tumoral. Estudos utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm contribuído para os estudos e o esclarecimento de mecanismos responsáveis por essa associação entre HPV e Tumor.

A identificação, assim como a genotipagem do HPV apresenta uma real importância para o prognóstico e a análise de sobrevida dos pacientes com carcinoma espinocelular da laringe. O presente estudo observou que a frequência do genoma do HPV em 10% das amostras analisadas, sendo genotipados os HPV-11, de baixo risco oncogênico para a região de cabeça e pescoço, HPV-16 e HPV-45, ambos de alto risco oncogênico.

Apesar de ser classificado como de baixo risco oncogênico, o HPV-11 tem sido associado a papilomas da laringe juvenil e adulta (SILVA, 2003). A presença de genoma HPV-11 em células da laringe acentua o papel deste subtipo viral nas lesões neoplásicas do epitélio laríngeo.

A análise do polimorfismo do gene *TP53* apresentou 65% (13/20) de homozigotos $p53^{AA}$ e 35% (7/20) de heterozigotos $p53^{PA}$ e nenhuma amostra para $p53^{PP}$. Os dois casos positivos para HPV, A04 e A07, apresentaram homozigose para o alelo $p53^A$.

Os resultados para o estudo do polimorfismo do gene *TP53* corroboram com dados publicados na literatura pertinente, que correlacionam a susceptibilidade aumentada para CEC em indivíduos homozigotos para $p53^{AA}$ e a maior susceptibilidade destes a carcinogênese vírus-induzida (OLIVEIRA, 2005).

Os *primers* utilizados na avaliação do polimorfismo alélico para o gene *TP53*, mostraram-se informativos, no entanto não foi possível correlacionar o genótipo *p53*^{AA} como fator de susceptibilidade aumentada no carcinoma das células escamosas da laringe.

Avaliações adicionais em regiões previamente estudadas e a investigação de outros fatores associados aos carcinomas laríngeos constituem ferramentas importantes na estimativa do prognóstico da progressão tumoral e, conseqüentemente, na melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

CAPÍTULO 02

**Deteção do genoma de HPV em pacientes com carcinoma espino-celular da laringe:
Comparação entre os ensaios de PCR convencional e em tempo real**

Cunha DMC; Silva AMTC; Curado MP; da Silva CC & da Cruz AD

RESUMO

A interação do genoma do HPV com o genoma da célula hospedeira ou de proteínas virais com proteínas celulares necessárias ao controle do ciclo celular desencadeia a morte celular ou age como fator de iniciação e progressão de processos malignos. Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de associar a infecção de HPV aos cânceres de cabeça e pescoço. O objetivo do presente estudo foi comparar a deteção do genoma de HPV em pacientes com CEC da laringe, considerando os ensaios de PCR convencional e em tempo real. O grupo amostral foi constituído de 15 pacientes do Registro de Câncer de Base Populacional da ACCG. Das peças cirúrgicas, foi obtido DNA total, usado na investigação molecular, para deteção do genoma de HPV, utilizando os *primers* genéricos GP05/06, que detectam todos os tipos de HPV. O genoma de HPV foi amplificado em 30% dos casos por PCR convencional e no ensaio de PCR em tempo real apresentaram amplificação em 46,7% das amostras, evidenciando uma diferença em 40%. Os estudos de associação entre o HPV e os cânceres da laringe são importantes no sentido de ampliar o conhecimento acerca dos mecanismos de infecção, iniciação e promoção tumoral potencializada por estes vírus.

Palavras-chave: HPV, PCR e PCR em tempo real

Detection of HPV genome in patients with squamous cell carcinoma of the larynx:**Comparison between conventional and real time PCR assays****SUMMARY**

The random integration of HPV DNA into the cell genome causes the interaction of viral proteins with cell cycling proteins, which will eventually lead to apoptosis or to initiation or progressions of carcinomas. Several studies have been designed to investigate the potential association of HPV infection and tumorigenesis of the head and neck. The objective of the current study was to compare the sensitivity of detection of HPV DNA using total DNA of SCC of the larynx through classical and real-time PCR essays. The study group was comprised of 15 patients who agreed to voluntarily participate in this study. Total DNA was extracted from tumor tissue samples and PCR was carried out using GP05/06 primer set. HPV genome detection was observed in 30% (5/15) and 46.7% (7/15) of samples amplified with classical and real-time PCR, respectively. The results of this study indicated that real-time PCR is 40% more sensitive to detect HPV genome in total human DNA than classical PCR essay. Thus, real-time PCR strategy is a powerful tool to detect HPV genome integrated into host cells and, consequently, could be used to further our knowledge regarding the role of HPV infection on laryngeal carcinomas.

Keywords: HPV, PCR and Real Time PCR

INTRODUÇÃO

Os HPVs são pertencentes à família *Papillomaviridae*, gênero *Papilomavirus* (Santos *et al.*, 2002). São vírus não-envelopados, simétricos, apresentando 72 capsômeros e um genoma de DNA de fita dupla circular, medindo aproximadamente 8000pb (SOUTO *et al.*, 2005).

A infecção viral promove modificações bioquímicas e moleculares em seus hospedeiros, necessárias para o desenvolvimento e reprodução viral, alterando significativamente a população dos hospedeiros ou a população de células por eles parasitadas, através da interação do genoma viral com o genoma da célula hospedeira ou de proteínas virais com proteínas celulares necessárias ao controle do ciclo celular, como as proteínas supressoras de tumor pRb e p53, desencadeando a morte celular ou agindo como um fator de iniciação e progressão de processos malignos (SILVA *et al.*, 2003).

Alguns tipos de Papilomavirus Humano (HPV), nos últimos anos, têm sido responsabilizados pelo desenvolvimento de malignidade nas regiões que comumente infectam, compreendendo, na mulher, o períneo, vulva, vagina, colo do útero e região anal (EINSTEIN & GOLDBERG, 2002) e, no homem, pênis, uretra, saco escrotal e região anal (ALMADORI *et al.*, 2002).

Além da região geniturinária, o HPV também pode ser encontrado nas células epiteliais das vias aéreas superiores e o seu papel na oncogênese dos tumores da cabeça e pescoço tem sido freqüentemente investigado (EINSTEIN & GOLDBERG, 2002). Neste sentido, diversos autores evidenciam uma correlação positiva do parasitismo provocado pelo HPV com tumores benignos como papilomas, verrugas

comuns e condilomas (GARCIA-CARRANCA & GARRIGLIO, 1993) e malignos, sobretudo nas células da região cervical (BIBBO & FILHO, 1998).

LIN e colaboradores (1998) realizaram estudos de tipagem de HPVs associando alguns tipos virais com cânceres de cabeça e pescoço. A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas que envolvem mudanças genéticas e epigenéticas, culminando na ativação de proto-oncogenes e/ou inativação dos genes supressores de tumor, que modifica o fenótipo celular. Uma célula maligna se difere de uma célula normal principalmente pela sua independência no controle do ciclo celular.

O HPV pode transformar e imortalizar as células hospedeiras, iniciando assim um processo maligno. Os produtos dos genes *E6* e *E7* são importantes para a transformação e imortalização celular. A proteína *E6* tem uma grande afinidade pelo DNA e encontrada tanto no núcleo como na membrana plasmática. A proteína *E7* é uma fosfoproteína encontrada no citoplasma e, provavelmente, no núcleo (GARCIA-CARRANCA & GARRIGLIO, 1993).

Os produtos dos genes supressores de tumores presentes nas células como as proteínas pRb e p53 são alvo da ação dos produtos dos genes dos virais. Em geral, a atividade da proteína pRb é inibida pela proteína viral *E7*, enquanto que, a proteína p53 é degradada subsequentemente a ligação com a proteína *E6*. A perda das funções de ambas as proteínas celulares responsáveis pela supressão tumoral contribui para a progressão de tumores (VOUSDEN, 1993).

O gene *RB1* é um supressor de tumor (GST) localizado no braço longo do cromossomo 13 (13q14), que tem como produto a proteína celular pRb, de aproximadamente 105 kDa. A proteína pRb tem a função de inibir a progressão do

ciclo celular, pois é capaz de seqüestrar o fator de transcrição E2F e impedi-lo de promover a transcrição de genes necessários para a replicação do DNA na fase S. A associação da proteína pRb com a proteína viral E7 causara uma perturbação no controle normal do ciclo celular, resultando em um estímulo positivo para a proliferação das células infectadas (SANDAL, 2002).

O gene *TP53* é também considerado como GST, está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13), cujo produto é a proteína p53. Esse gene apresenta 11 exons, entre os quais o primeiro deles não é codificante. A proteína p53 é constituída de 393 aminoácidos na sua extensão, apresentando quatro regiões com funções distintas, chamadas domínios da proteína. Uma vez ativada a proteína p53 é capaz de reprimir a progressão celular e sinaliza para a apoptose.

A proteína p53 uma vez ativada por fosforização ou acetilação da extremidade C-terminal passa a se ligar de maneira específica ao DNA, agindo como um fator de transcrição através da ligação em seqüência específica, promovendo a transativação *downstream* de genes alvos.

Para desempenhar tal função as proteínas p53 se associam entre si formando tetrâmeros, que são complexos protéicos resultantes da associação de quatro monômeros. Após o evento de tetramerização a proteína passa a ser capaz de impedir a proliferação celular ou induzir a morte da célula por apoptose.

Nesse sentido, a proteína p53 é responsável por monitorar danos ocorridos nas moléculas de DNA. Desta forma, o ciclo celular é impedido de prosseguir até que o dano no DNA seja restaurado. A proteína E6 do papiloma vírus humano de alto risco

oncogênico se associa a proteína p53, que é responsável pela regulação da passagem da fase G1 para S e da fase G2 para M, no ciclo celular.

A proteína E6 recruta a proteína celular E6AP, que funciona como uma ubiquitina-ligase para o complexo tetramérico contendo p53. Este recrutamento resulta na ubiquitinação de p53 seguido de sua rápida degradação (STUBENRAUCH & LAIMINS, 1999). Sem a proteína p53 a célula perde a capacidade de perceber e reparar possíveis danos no DNA, assim, a divisão celular passa a ocorrer sem reparo. Conseqüentemente, aumenta-se a freqüência das mutações, dos rearranjos cromossômicos, das aneuploidias.

O acúmulo de eventos mutacionais é a causa subjacente ao desenvolvimento de um fenótipo neoplásico e, assim, provavelmente, resultam no câncer (VOGEL & MOTULSKY, 2000; GRIFFITHS *et al.*, 1998; VOUSDEN, 1993).

O objetivo deste estudo foi comparar a eficiência da detecção do genoma de HPV pela reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional com a PCR em tempo real, em biópsia de laringe de pacientes com carcinoma espino-celular (CEC).

MATERIAL E MÉTODOS

Grupo Amostral

O grupo amostral foi constituído de 15 pacientes recém diagnosticados com carcinoma da laringe. Os casos foram obtidos do Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia/GO da Associação de Combate ao Câncer em Goiás. Todos os pacientes considerados foram diagnosticados como carcinomas da laringe (CID-O: C32). A participação foi de caráter voluntário e no ato da coleta da amostra, os

pacientes foram submetidos a uma entrevista e preencheram um questionário sobre hábitos de vida para determinar possíveis associações entre hábitos e os carcinomas laríngeos.

As amostras biológicas dos tumores foram separadas na ocasião de realização de biópsias e/ou cirurgias. Após a retirada cirúrgica, as biópsias foram transportadas em câmara fria, com temperatura média de 10°C, armazenadas sem conservantes e fixadores em criotubos e acondicionadas à -20°C até o momento do uso.

Extração e Purificação do DNA

Para a extração de DNA, 10-20mg de cada biópsia foram maceradas previamente em nitrogênio líquido. Posteriormente, o tecido macerado foi submetido à extração do DNA com o kit de purificação do DNA genômico *Wizard®* (*Promega Corporation, EUA*), seguindo-se as instruções do fabricante.

PCR Convencional

Todas as amostras foram submetidas a uma primeira PCR com os *primers* genéricos GP05/06 para detecção do genoma de qualquer HPV. Em seguida, fez-se uma segunda PCR com os mesmos *primers*, utilizando o produto da PCR anterior. Assim, as amostras só foram consideradas negativas para o HPV após serem submetidas a duas PCRs, com posterior repetição das reações para confirmação do resultado. Um conjunto de *primers*, que amplifica a região D8S135 de 8p11, foi utilizado como controle interno da reação. A seqüência de todos os *primers* e o

tamanho esperado dos fragmentos amplificados encontra-se na Tabela I. O protocolo de termociclagem para a amplificação do genoma de HPV está descrito na Tabela II.

Tabela I. Seqüências consenso dos primers utilizados e o tamanho esperado do fragmento amplificado.

Tipos	S*	Seqüências5'→3'	Fragmento (pb)
D8S135	F	GGG AGG CTT TAT AAT TA T TTA GC	100
	R	CTG GGC AAC AGA GT G GGA C	
GP05	F	TTT GTT AC T GTG GTA GAT ACT AC	170
GP06	R	GAA AA A TAA ACT GTA AA T CAT ATT C	

*S - Sentido; F - *Forward* (Direto); R - *Reverse* (Reverso)

Tabela II. Protocolo da termociclagem para o ensaio de PCR convencional para a amplificação do genoma de HPV a partir de DNA total extraído das células de CEC da laringe.

Passos	Temperatura (°C)	Tempo (min.)
Desnaturação inicial	95	5
Ciclos (10)	Desnaturação	95
	Anelamento	57
	Extensão	72
Ciclos (30)	Desnaturação	95
	Anelamento	50
	Extensão	72
Extensão final	72	5
Conservação	4	∞

PCR em Tempo Real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho *RotorGene*[®] (Corbett Research, Austrália) que mostrou resultados similares quando repetidos. Para cada teste, foram utilizados 0,5uL de DNA, 12,5uL *SYBR Green PCR Master Mix*[®]

(Invitrogen,USA), 1,0uL de cada um dos primers conforme indicado na Tabela I e 10,0uL de água para completar o volume final de 25,0uL. As condições de amplificação foram às mesmas conforme indicadas na Tabela III.

Tabela III. Protocolo da termociclagem para o ensaio de PCR em tempo real para a amplificação do genoma de HPV a partir de DNA total extraído das células de CEC da laringe.

Passos		Temperatura (°C)	Tempo (min)
Desnaturação inicial		95	10
Ciclos (40)	Desnaturação	94	1
	Anelamento	40	1
	Extensão	72	1
Conservação		4	∞

RESULTADOS

Foi observada a amplificação de DNA humano (D8S135) em todas as reações. Na PCR convencional 30% dos casos (5/15) foram positivos, evidenciando a presença do genoma de HPV nas células de CEC da laringe. Quando os mesmos *primers* foram utilizados no ensaio de PCR em tempo real, a amplificação foi observada em 46,7% (7/15) das amostras. A PCR em tempo real mostrou-se 16,7% mais sensível na detecção de genoma HPV, no presente estudo, conforme apresentado na Tabela IV.

DISCUSSÃO

Estudos recentes demonstram que a utilização da reação em cadeia da polimerase em tempo real com *primers* consenso e mais eficiente para identificar o genoma de HPV quando comparada com o ensaio de PCR convencional. O ensaio PCR em tempo real tem sido muito utilizado em avaliação retrospectiva, na tentativa de detectar a presença de genomas virais.

Tabela IV. Resultados da amplificação das amostras de DNA extraído de pacientes com CEC da laringe.

Código Paciente	Primers		
	D8S135	GP05/GP06	
		PCR convencional	PCR Tempo Real
085 – 209	+		
085 – 213	+		+
085 – 261	+		
085 – 417	+	+	+
085 – 429	+		
085 – 434	+		+
085 – 438	+	+	
085 – 476	+		+
085 – 491	+		
085 – 497	+		
085 – 600	+		
085 – 657	+	+	+
085 – 659	+	+	+
085 – 660	+		
085 – 743	+	+	+
Total (%)		30 (5/15)	46,7 (7/15)

+ : Amplificação

Adicionalmente, PCR em tempo real é uma ferramenta muito útil na quantificação da carga viral e da genotipagem de HPV, assim como de outros tipos virais. O aumento na frequência de detecção da presença do genoma viral nas amostras de pacientes com CEC na laringe por PCR em tempo real sugere que devemos ter uma atenção especial nos resultados obtidos pelo método convencional.

Durante anos o ensaio utilizando PCR convencional vem sendo largamente utilizado nos laboratórios para diagnóstico em diversas rotinas laboratoriais. Apesar de

serem confiáveis, os ensaios que utilizam PCR convencional podem não ser completamente satisfatórios.

Por outro lado, os testes utilizando novas metodologias devem ser inseridos na rotina laboratorial de maneira consciente e fundamentados. É necessário aumentar investimentos em infraestrutura e na aquisição de novos equipamentos, treinamento pessoal e compreensão pelos clínicos da utilização de novas metodologias.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos aos membros do Hospital Araujo Jorge / Registro de Câncer de Base Populacional / Associação de Combate ao Câncer de Goiás, do LaGene / SES e do NPR/UCG pelo extenso apoio para com todos os pesquisadores associados.

INSTABILIDADE GENÔMICA NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA LARINGE

da Silva CC; da Silva Jr. RL; Silva AMTC & da Cruz AD

RESUMO:

A idéia de que os tumores desenvolvam em células com alterações genéticas somáticas surgiu no início do século XX, mas somente com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular que se tornou possível relacionar mutações em genes específicos com a iniciação e progressão de tumores. A predisposição genética associada a um evento somático adicional pode induzir a iniciação, promoção e progressão tumoral. Estudos relacionados com a susceptibilidade alélica de genes supressores de tumor e oncogenes contribuem para uma melhor avaliação em pacientes com carcinoma de células escamosas da laringe. O uso de marcadores de microssatélites tem-se demonstrado uma importante ferramenta na investigação de perdas e ganhos alélicos, como fatores que predispõe a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor. O objetivo do presente estudo foi avaliar o polimorfismo alélico dos *loci* cromossômicos 17p13.1 (D17S1678), 17q22 (STS-M95585), 11p15 (D11S4962), 9p21 (RH68036), 8p23-p22 (WI20580), 8p21 (RH17792), 6q13 (RH92600) e 3p13 (STS-AA027856) mediante a amplificação de microssatélites em amostras de 20 pacientes com CEC de laringe. Nas regiões 8p21 e 8p22 foram encontradas 20% (4/20) de MIS, em ambas, e 5% (1/20) de LOH para 8p21. Para as regiões 17q22 e 11p15 foi observada a mesma freqüência de MIS de 30% (6/20). Foram encontrados ainda, 20% (4/20) de LOH e 5% (1/20) de MIS em 3p13 e 30% (6/20) de LOH correspondente a região 9p21. Para a região 17p13.1 observou-se que 20% (4/20) das amostras analisadas apresentavam LOH e 35% (7/20) MIS. A alta freqüência de

MIS encontrada no estudo sugere que a carcinogênese do CEC da laringe segue o mecanismo de fenótipo mutante. Alterações adicionais em regiões previamente estudadas e a investigação de outros fatores associados aos carcinomas laríngeos poderão vir a serem ferramentas importantes na estimativa do prognóstico da progressão tumoral e, conseqüentemente, na melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

Palavras-chave: LOH, MIS, CEC da Laringe.

INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença associada a alterações genéticas múltiplas, originando-se a partir de uma célula normal que acumulou mutações após sucessivas divisões celulares num processo de evolução clonal (CAVENEY & WHITE, 1995). Em geral, as mutações incluem alterações de seqüência, perdas, ganhos ou rearranjos em diversos genes, a maioria, segundo KOCH e colaboradores (1994), relacionados ao crescimento e proliferação celular.

Os cânceres humanos são, na sua maioria, de origem somática resultantes da interação de fatores genéticos e ambientais (PEREIRA, 1997). Cerca de 5% a 10% são hereditários, provenientes de mutações na linhagem germinativa (FEARON, 1997). Dessa forma, o câncer é uma doença genética e a identificação e a caracterização dos genes envolvidos na sua origem e progressão é fundamental para a compreensão das bases moleculares desta doença. Este conhecimento contribui de forma decisiva para o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis e terapias mais eficazes (PARMIGIANI & CAMARGO, 2004).

A origem e o desenvolvimento neoplásico são caracterizados por alterações em dois grupos principais de genes: os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais (HANAHAN

& WEINBERG, 2000; CHANG *et al.*, 1995). Genes associados aos mecanismos de reparo aos danos do DNA são considerados como um terceiro grupo, que pode atuar direta ou indiretamente no processo de carcinogênese (HOEIJMAKERS, 2001).

Os proto-oncogenes são genes celulares normais que atuam no controle positivo do crescimento e diferenciação celular (IRISH & BERNSTEIN, 1993). São genes capazes de induzir ou manter a transformação celular em animais experimentais ou em culturas de células. Podem tornar-se oncogenes por meio de mutações resultantes da exposição aos carcinógenos, radiação ou através de infecções virais. A ativação desses genes ocorre através de translocações cromossômicas, ampliações gênicas ou mutações de ponto (KNUDSON, 1985), de maneira que alterações em um único alelo são suficientes para a transformação maligna da célula. Como consequência dessas alterações, a expressão dos oncogenes leva a uma proliferação celular anormal, resultando na transformação tumoral (COOPER, 1994).

Os genes supressores tumorais atuam como reguladores negativos da proliferação celular (VERMA & TRIANTAFILLOU, 1998). Sabe-se que as proteínas codificadas por eles fazem parte das vias de sinalização celular, retardando a progressão do ciclo, bloqueando a diferenciação ou induzindo a morte celular programada ou apoptose. Conseqüentemente, alterações genéticas podem estimular a proliferação de células, antes inibidas pela ação dos produtos destes genes, levando à proliferação desordenada, característica das células cancerosas (WEINBERG, 1991).

A análise da distribuição proporcional das causas de morte no Brasil mostra que, desde a década de 30, as neoplasias malignas, juntamente com as doenças do aparelho circulatório, são responsáveis por um número cada vez maior de óbitos, apontando para uma mudança no perfil de mortalidade semelhante àquela observada nos países desenvolvidos. Os tumores malignos de cabeça e pescoço pela expressiva incidência e

mortalidade, se constituem em relevante preocupação para a saúde mundial, particularmente nos países em desenvolvimento (PISANI *et al.*, 2002).

As taxas de mortalidade, entretanto, variam entre as etnias, sexos e grupos etários. São encontradas grandes diferenças nas faixas anuais de incidência e mortalidade para o carcinoma bucal, por exemplo, variando até 20 vezes entre diferentes países. Muitas destas refletem diferentes hábitos das populações, expectativa de vida, educação preventiva e a qualidade dos relatórios médicos nos diferentes países. No Brasil, cânceres de cavidade bucal possuem uma alta prevalência, provavelmente pelo fato do país ser subdesenvolvido, e a maior parte da população não possuir acesso à saúde pública, incluindo a dentária, alimentação e higiene adequadas (DAMM & BOUQUOT, 1998).

Dois mecanismos epigenéticos estão relacionados com a carcinogênese de cabeça e pescoço. Um, denominado via supressora, é o mais comum e depende de eventos mutacionais adicionais múltiplos (somáticos e/ou germinativos) nos oncogenes e nos genes supressores de tumor, freqüentemente envolvendo deleções cromossômicas em regiões genômicas chaves. Metodologicamente, esta via é reconhecida pelo fenômeno de perda de heterozigose (LOH, do inglês – *loss of heterozygoty*).

O outro mecanismo, chamado de via mutadora, depende da perda mutacional inicial do sistema de reparo (somático e/ou germinativo) levando a aceleração do acúmulo de mutações em regiões gênicas críticas e à progressão da malignidade. Metodologicamente, esta segunda via é reconhecida pelo fenômeno de instabilidade de microsatélites (MIS, do inglês – *microsatellite instability*). Os microsatélites são seqüências curtas repetitivas de nucleotídeos presentes em todo genoma humano. Essas repetições tornam-se susceptíveis a expandir-se ou contrair-se durante a replicação do DNA. Nos tumores com deficiência nos genes de reparo do DNA (MMR – do inglês, *mismatch repair system*), essas expansões ou

contrações não são reparadas, ocasionando o fenômeno de MIS, que pode ser diferenciada em alta frequência de instabilidade (MIS-A), sendo detectada em dois ou mais dos microssatélites estudados, ou baixa frequência de instabilidade (MIS-B), detectada em apenas um microssatélite estudado.

Embora o DNA repetitivo já tenha sido considerado como *junk DNA*, estas seqüências têm uma função no genoma, principalmente na regulação da expressão gênica. Existem numerosos exemplos de microssatélites e minissatélites (seqüências longas em *tandem* entre 20 e 50 vezes, contendo de unidades repetitivas de 15 até cerca de 100 pares de bases) afetando a regulação da expressão gênica de diversas maneiras, podendo ser reconhecidas por fatores de transcrição ou ainda, afetando a estrutura da cromatina e a conformação do DNA (IGLESIAS *et al.*, 2004; LODISH *et al.*, 2002).

Microssatélites são seqüências curtas de DNA de 1 a 6 pares de bases repetidas em *tandem* que freqüentemente mostram polimorfismo multialélico e têm sido extensivamente usados como marcadores genéticos. Segundo IGLESIAS e colaboradores (2004) classe mais comum é a forma (CA)_n. Repetições de mononucleotídeos A (Adenina) e T (Timina) são mais comuns, totalizando 10Mb ou 0,3% do genoma nuclear. Por outro lado, repetições C (Citosina) e G (Guanina) são raras. Os dinucleotídeos CA somam 0,5 % do genoma, sendo que GT/AG aparecem em segundo lugar com 0,2% do genoma. Repetições CG/GC são raras, pois os resíduos C são flanqueados em 3' por um resíduo G (Ilhas CpG), os quais são propensos a metilação e subsequente desaminação, resultando em TpG (ou CpA na fita oposta). Repetições de trinucleotídeos e tetranucleotídeos também são raras, mas altamente polimórficos, sendo considerados importantes marcadores potenciais (STRACHAN & READ, 1999).

A natureza polimórfica dos microssatélites é devida as altas taxas de mutações causadas por erros da DNA polimerase (*slippage*), da ordem de 5 a 10 *locus* por gameta, que podem originar variantes, aumentando ou diminuindo o número de repetições internas, podendo gerar MIS. Esta instabilidade depende de numerosos parâmetros, incluindo número de repetições, conteúdo da seqüência, *locus* cromossômico e capacidade de reparo do DNA (HUSSEN & WOOD, 2002).

Mutações germinativas em microssatélites variam de um nível não detectável a até 8×10^{-3} pb. Estas mutações podem diferir do seu alelo parental por uma única unidade de repetição, não sendo geradas por *crossing-over* desigual e sim por mau pareamento causado por deslizamento (*slipped strand misparing*). O pareamento errado entre repetições em *tandem* é responsável por grandes deleções e duplicações, sendo considerado um mecanismo que propicia a evolução genômica (STRACHAN & READ, 1999).

A perda de heterozigose é definida como a perda de um alelo em um *locus* heterozigoto constitucional, portador de microssatélite, sendo aceito como marcador de um dos eventos requeridos para inativação de genes supressores de tumor (GST) em Câncer. O gene que codifica a proteína p16 (*CDKN2A*), localizado em 9p21, é considerado um *hot spot* para inativação por LOH, ocorrendo frequentemente em pulmão, pele, cabeça e pescoço entre outras topografias tumorais.

No câncer colorretal não-poliposo hereditário (HNPCC – do inglês, *hereditary non-poliposis colorectal cancer*) há mutações nos MMR humanos, principalmente nos genes *hMLH1* e *hMSH2*, que levam a um defeito na correção do reparo durante a replicação do DNA, com um subsequente acúmulo de mutações por todo o genoma, incluindo oncogenes e genes supressores de tumor, os quais podem causar transformação maligna.

A instabilidade genômica foi inicialmente descrita na maioria dos CEC de cabeça e pescoço em aproximadamente 15% dos tumores esporádicos. Diversos estudos têm relatado que a instabilidade genômica pode ser avaliada por LOH e MIS, que são eventos moleculares importantes na ativação de oncogenes e na inativação dos genes supressores de tumor, contribuindo para a iniciação e evolução tumoral (BOCKMUHL *et al.*, 2001; SASIADEK *et al.*, 2001; SUNWOO *et al.*, 1996;).

A análise de LOH em pacientes com desenvolvimento tumoral tem sido usada para identificar as regiões cromossômicas que possivelmente contém os genes associados ao tumor. Os principais marcadores moleculares utilizados na avaliação deste tipo de instabilidade relacionados com os cânceres da laringe são: *D1S2883*, *D2S123*, *D3S1611*, *D5S346*, *D7S501*, *D8S254*, *TP53* e *NM23*, sendo considerados bons marcadores de LOH (SASIADEK *et al.*, 2001).

DAI e colaboradores (1998) relatam que 40% dos pacientes com carcinoma de células escamosas da laringe mostravam LOH no *locus* da seqüência polimórfica de microsatélite no cromossomo 13 (RB 1.20). MIRACCA e colaboradores (2000) utilizaram 6 marcadores de instabilidade genômica para as regiões cromossômicas 3p13, 6q13, 9p21, 11p15, 17p13.1, e 17q22, em 81 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, nos mais diferentes estágios, relatando uma LOH para os referidos *loci* de até 55%.

A instabilidade genética é considerada uma fonte potencial para a diversidade de tumores malignos, de maneira que quanto mais instável for um tumor, maior será a possibilidade de progressão para um fenótipo mais agressivo. Vários estudos foram realizados para investigar a instabilidade genômica em cânceres humanos, e têm revelado perdas somáticas em locos de genes supressores e em genes envolvidos no reparo a danos no DNA (ROSSI & PINHO, 1999).

Sabe-se que as mutações responsáveis pelo desenvolvimento do câncer podem ser cromossômicas e/ou gênicas. No caso dos genes supressores de tumor, há a necessidade de inativação dos dois alelos. O primeiro geralmente é inativado por mutação gênica e o segundo é perdido por deleções cromossômicas envolvendo a região na qual o gene em questão está localizado (VOGEL & MOTULSKY, 1997). Na inativação destes genes, os mecanismos que levam à perda de seqüências podem também envolver as regiões cromossômicas próximas ao gene. Assim, marcadores de DNA que demonstravam heterozigose antes da progressão do tumor podem sofrer uma redução até atingirem a perda alélica parcial ou total (WEINBERG, 1991).

A LOH quando é detectada como um evento somático específico do tumor pode representar a deleção de um alelo de um gene supressor tumoral e indicar a localização do outro, provavelmente mutado e não-funcional, no cromossomo homólogo. Estas alterações conferem uma vantagem ao crescimento que leva à expansão clonal das células (ANDO *et al.*, 2000). A análise de LOH pode caracterizar alterações não detectadas por outros métodos e o posterior mapeamento pode levar à identificação de novos genes supressores tumorais (KEMP, 1999).

A pesquisa de LOH se constitui num método indireto de investigar a possível localização de um gene supressor de tumor através do estudo de alterações em seqüências repetitivas em *tandem*, comuns em genomas de eucariotos. Estes marcadores podem estar localizados entre ou dentro dos genes (PERUCHO, 1996). A alta freqüência e a ampla distribuição destas seqüências pelo genoma humano as qualificam para estudos que visam definir regiões mínimas de perdas cromossômicas, sugerindo a presença de genes supressores tumorais (LOTHE, 1997; SPEICHER, 1995).

A discrepância entre o tamanho dos microssatélites observada em células tumorais comparada ao tecido normal do mesmo paciente resulta da expansão ou diminuição do seu comprimento. Este evento é resultado de mutações em genes de reparo a erros de pareamento do DNA. Indiretamente, esses erros de pareamento estão associados à transformação celular e a um fenótipo maligno. A maioria das repetições de microssatélites ocorre fora das regiões codificadoras dos genes e, portanto, a instabilidade não deve levar diretamente ao desenvolvimento tumoral, mas a desestabilização dessas seqüências pode tornar o genoma suscetível a mutações (CLAIJ & RIELE, 1999; RAJANBABU & PATRARCA, 1999; ESHLEMAN *et al.*, 1995).

Anormalidades em seqüências microssatélites têm sido associadas a diversos tipos de tumores malignos (WOOSTER *et al.*, 1994), como o câncer bucal (JEFFRIES & FOULKES, 2001). A utilização de microssatélites como marcadores na identificação de sítios específicos está amplamente descrita na literatura (SILVA, 2003; SUDBO *et al.*, 2001; LIPPMAN & HONG, 2001; ROSIN *et al.*, 2000; MAO *et al.*, 1996)

Muitas regiões genômicas vêm sendo estudadas nos carcinomas de cabeça e pescoço e relacionadas a possíveis *loci* de genes envolvidos com o processo tumoral. Segundo VAN DER RIET e colaboradores (1994) e ROSIN e colaboradores (2000), LOH em 9p pode ser um evento inicial em neoplasias escamosas de cabeça e pescoço, sendo observada inclusive em lesões pré-neoplásicas.

YAMAMOTO e colaboradores (2001) sugerem o envolvimento do cromossomo 21 (21q) nestas neoplasias, afirmando que a avaliação de LOH nesta região pode ser um marcador útil na determinação do potencial de recorrência tumoral. REIS e colaboradores (2002) sugerem que no braço longo do cromossomo 22 possa conter genes supressores específicos para diferentes localizações anatômicas dos carcinomas das células escamosas

da cabeça e pescoço, incluindo a região bucal, e que alterações nestas regiões podem ter uma relevância clínica e prognóstica.

NUMASAWA e colaboradores (2005) afirmam que a alta frequência de LOH em no braço longo do cromossomo 2 indica a presença de genes candidatos a supressores tumorais, principalmente, nas regiões 2q14-21 e 2q36, dados que corroboram como os resultados de YAMAMOTO e colaboradores (2003).

O braço curto do cromossomo 3 é uma das regiões onde frequentemente se encontram anormalidades cromossômicas em cânceres humanos, como pulmão, rim e cavidade bucal (SHRIVER *et al.*, 1998). Estudos citogenéticos e moleculares têm sugerido que genes supressores tumorais localizados neste cromossomo podem exercer um importante papel na carcinogênese bucal, principalmente nos estágios avançados do desenvolvimento tumoral (ARAI *et al.*, 2002; DASGUPTA *et al.*, 2002).

Diversos estudos investigaram a ocorrência de LOH em 3p (YOO *et al.*, 2004; DASGUPTA *et al.* 2002; ARAI *et al.*, 2002; ARAI *et al.*, 2001; GUO *et al.*, 2001; TABOR *et al.*, 2001; EL-NAGGAR *et al.*, 2001; CALIFANO *et al.*, 1996; MAO *et al.*, 1996; PARTRIDGE *et al.*, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 1996; WU *et al.*, 1994). Em conjunto, os resultados destes estudos indicam as regiões 3p14, 3p21 e 3p24 como as mais frequentemente envolvidas em perdas alélicas no câncer de colo retal não-poliposo (CCRNP) de diferentes localizações anatômicas.

Segundo PARTRIDGE e colaboradores (1996), ARAI e colaboradores (2002) e DASGUPTA e colaboradores (2002), existe uma associação entre LOH em 3p com tempo livre da doença, progressão tumoral e parâmetros clínicos do tumor, indicando um significado prognóstico e terapêutico para alterações nesta região cromossômica em tumores bucais. CALIFANO e colaboradores (1996) propuseram um modelo de progressão tumoral em

CCRNP, em que o espectro de perdas cromossômicas aumentava progressivamente com o estadiamento histopatológico, levando à transição da mucosa normal para displasia.

EL-NAGGAR e colaboradores (2001) analisaram 37 amostras de pacientes com carcinoma das células escamosas da cavidade bucal pareadas com amostras de secreções orais (saliva) do mesmo paciente. Os autores encontraram LOH em 18/37 (49%) amostras de saliva e em 32/37 (86%) amostras tumorais. A maior frequência de LOH em amostras de saliva foi encontrada para o marcador mapeado na região 3p14.2.

DASGUPTA e colaboradores (2002) avaliaram 57 amostras de CCRNP sendo 38 de cavidade bucal, 8 de laringe e 11 da região orofacial. Investigaram 20 marcadores microssatélites ao longo do cromossomo 3. Destes, 15 estavam mapeados em 3p e 3q. Os autores encontraram 96% (49/51 casos de carcinomas de células escamosas) de LOH nos marcadores mapeados na região 3p e 50% (26/51) em 3q. Alta frequência de perda alélica foi encontrada em 3p21-22 (37/42%) utilizando os marcadores D3S3719, D3S1289, D3S1611 e em 3p12-13 (34/38%) os marcadores D3S3634, D3S1276, D3S1284.

BEDER e colaboradores (2003) avaliaram 22 amostras de CCRNP com 53 marcadores mapeados ao longo dos 22 cromossomos autossômicos. Destes, 15/53 (28,3%) estavam mapeados no cromossomo 3 e apresentaram alta frequência de LOH, principalmente para o marcador D3S2432 (67%), mapeado em 3p24.1.

De um modo geral, as investigações baseadas em ensaios de LOH em 3p permitiram o delineamento de regiões críticas nesta região, indicando a presença de genes supressores relacionados à etiologia dos cânceres de cabeça e pescoço, incluindo os de cavidade bucal (NUNN *et al.*, 2003; ARAI *et al.*, 2002; UZAWA *et al.*, 1998; ROWLEY *et al.*, 1996; WU *et al.*, 1994). Adicionalmente, Os papilomavírus humanos oncogênicos se integram, predominantemente, em locais cromossômicos específicos nos sítios frágeis, como 8q24 e

12q15, provocando a ativação “cis” de diferentes proto-oncogenes. Subseqüentemente, são detectadas anormalidades cromossômicas como LOH, por deleção de um dos alelos nas regiões relacionadas com os genes reparadores de DNA e os genes supressores tumorais (YANG *et al.*, 2002).

As perdas de heterozigose ocorrem com freqüência em 3p14-22, 4p16, 5p15, 6p21-22, 11q23, 17p13-3, 18q12-22 e 19q13-18 (LAZO, 1999) levando ao acúmulo de mutações, algumas das quais são significativas para desenvolver o fenótipo tumoral. Nessas mutações são identificadas diferentes alterações genômicas em clones celulares de carcinoma cérvix uterina, entre elas se destaca as mutações em no gene *p53* e *K-ras*, que atuam sobre as expressões de *HER-2/neu*, *bcl-2*, *EGFR*, metaloproteases, *VEGF*, *c-myb* e na redução da perda na expressão de moléculas HLA-classe I e de nm23. Muitas dessas alterações genéticas estão relacionadas com os comportamentos biológicos diferentes na evolução da enfermidade das pacientes com câncer cervical (KUKI *et al.*, 2001).

Outro estudo mostra que a LOH do cromossomo 3p é detectado com freqüência em vários cânceres humanos, e entre eles o câncer cervical uterino. A freqüência de LOH em 3p é de 45% para câncer invasivo, 21% para NIC III e 61% para NIC II/III; para o cromossomo 6p a LOH é de 28% no câncer cervical (NISHIMURA *et al.*, 2000). Dentre os objetivos propostos nesta avaliação foi identificar a instabilidade genômica no carcinoma de células escamosas da laringe, determinando um perfil de danos genômicos em pacientes diagnosticados pelo Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge, Goiânia-GO. Adicionalmente, este estudo permite correlacionar os resultados de LOH e MIS com e com os dados do estadiamento do tumor ao diagnóstico e demais fatores clínicos e anatômicos do prognóstico, tradicionalmente utilizados para o tumor da laringe.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupo Amostral

Foram selecionados junto ao Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge (HAJ/ACCG), 20 casos de carcinoma de células escamosas da laringe (sangue periférico e biópsias a fresco), combinados segundo a idade e o sexo. Um questionário sobre o estilo de vida com informações biométricas e termo de anuência assinado pelos pacientes está arquivado no Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Foram considerados como casos apenas os indivíduos recém diagnosticados com tumores primários de cavidade oral, definidos através do Código Internacional de Doenças para Oncologia, que inclui várias topografias possíveis para os tumores da cavidade laríngea, que tenham sido histologicamente confirmados pelo Serviço de Patologia. Os casos não passaram por nenhuma terapia primária, nem foram previamente tratados com radio e/ou quimioterapia local ou sistêmica.

Coleta das Amostras

As amostras de sangue periférico heparinizado, colhidas em tubos *falcon* de 12mL, foram centrifugadas a 5000rpm durante 15 minutos. Foram preparadas a partir da centrifugação, alíquotas armazenadas em *criotubos*, no qual continham o plasma sanguíneo, *buffy coat* (anel leucocitário) e hemácias, devidamente rotuladas e estocadas em *freezer* a -20°C na forma de banco de amostras. Para cada paciente, foi adquirida junto ao médico patologista responsável, amostra de tecido fresco, livre de necrose, sendo congelada imediatamente até o momento do uso.

Extração e Purificação de DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada utilizando o kit de extração *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Corporation, EUA), de acordo com o protocolo de extração sugerido pelo fabricante. As amostras de DNA depois de extraídas foram submetidas, primeiramente, à PCR para a identificação e genotipagem específica de HPVs e posteriormente, à PCR para investigação da instabilidade genômica.

Protocolo de PCR

As amostras de DNA foram submetidas à análise de LOH e MIS utilizando um banco com oito marcadores polimórficos de microssatélites: D17S1678; STS-M955a85; D8S135; RH68036; WI-20580; RH17792; RH 92600 e STS-AA 027856. Os fragmentos de DNA microssatélite foram amplificados utilizando termociclador *GeneAmp® 9700* (Perkin Elmer, USA) e os *primers* polimórficos para as regiões flanqueadoras das seqüências de interesse.

As condições de PCR para um volume final de 25µL de reação foram: 25µL de água Mili-Q, 0,3nmol de *primer* alelo-específico (Invitrogen, USA), 1U de *Taq DNA polimerase* (Promega, USA), 1X de STR® *buffer* (Promega, USA) (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 0,2mM dNTPs e 0,5mM de MgCl₂) e 100ng de DNA genômico total.

O protocolo de termociclagem, apresentado na Tabela I, foi do tipo *touchdown* (62/52°C), que consiste na graduação da diminuição da temperatura de anelamento a partir de uma temperatura ótima, aumentando por sua vez a competitividade pela região alvo de interesse.

Os produtos de PCR foram separados em gel de poliacrilamida a 8% (PAGE 8%) em TBE 1X mediante aplicação de um campo elétrico constante de 10V/cm por 2 horas. Como

marcador de peso molecular, foi utilizado um *ladder* de 50pb (0,025µg/µL) aplicado nas raiais iniciais do gel.

Tabela I. Protocolo da termociclagem para o ensaio de PCR para a análise de LOH e MIS em pacientes com CEC da laringe.

Etapas		Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial		94	5min
<i>Touchdown</i>	Desnaturação	94	30seg
	Anelamento	61	30seg
	Extensão	72	30seg
Desnaturação		94	30seg
Ciclos (30)	Anelamento	51	30seg
	Extensão	72	30seg
Extensão final		72	5min
Conservação		4	∞

Para a visualização do DNA amplificado, o gel foi submerso em TBE 1X contendo brometo de etídeo (5mg/mL) por aproximadamente 15 minutos e em seguida as imagens foram capturadas utilizando o sistema de vídeo-documentação VDS® (Amersham Pharmacia Biotech/USA).

Análise de LOH e MIS

Primeiramente foi analisado o DNA normal de cada paciente para a identificação de alelos informativos (presença de dois alelos que apresentassem uma diferença de tamanho superior ou igual a 2pb). As amostras cujos marcadores apresentaram-se em homozigose na análise do sangue periférico foram consideradas não informativas para aquele marcador em específico.

Os marcadores que se mostraram informativos para cada paciente foram, em seguida, avaliados quanto à perda de heterozigose. O *software ImageMaster*® versão 3.01

(Amersham Pharmacia Biotech/USA) fornece os valores de altura e área dos picos representativos dos alelos. A LOH foi determinada matematicamente utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\text{LOH} = \frac{\text{Altura do pico do alelo normal 2}}{\text{Altura do pico do alelo normal 1}}$$

$$\text{LOH} = \frac{\text{Área do pico do alelo tumoral 1}}{\text{Área do pico do alelo tumoral 2}}$$

$$\text{LOH} = \frac{\text{Altura do pico do alelo tumoral 2}}{\text{Altura do pico do alelo tumoral 1}}$$

$$\text{LOH} = \frac{\text{Área do pico do alelo tumoral 1}}{\text{Área do pico do alelo tumoral 2}}$$

Sendo o alelo 1 o alelo que possui menor tamanho em pares de bases, e o alelo 2 o alelo que possui o maior tamanho. Um valor de $\text{LOH} \leq 0,6$ indica que a amostra tumoral apresenta significativa perda do alelo de maior tamanho, enquanto que um valor de $\text{LOH} \geq 1,6$ indica que a amostra tumoral apresenta perda do alelo de menor tamanho. Foram consideradas como apresentando LOH apenas as amostras com valores inclusivos em ambos os cálculos. Casos com dúvidas na interpretação dos resultados foram repetidos ou excluídos da amostragem final.

Para a análise dos perfis de MIS foram consideradas portadoras de instabilidade de microssatélites as amostras que tiveram redução ou expansão no tamanho de um dos alelos no tecido tumoral quando comparado ao DNA do sangue periférico.

As amostras que apresentaram MIS não foram analisadas quanto à perda de heterozigose, pois devido à metodologia utilizada neste trabalho não seria adequado aplicar as fórmulas matemáticas de análise de LOH para comparar alelos que sofreram alteração no número de bases, uma vez que o tamanho do fragmento influencia na altura e área dos picos. Dessa forma, os casos positivos para MIS foram considerados não informativos nas análises de frequência de LOH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média de idade observada no grupo amostral foi de 60,65 anos, obedecendo a um intervalo entre 41 e 83 anos.

A Figura 2 mostra a distribuição dos pacientes segundo a faixa etária. Dos 20 pacientes diagnosticados com carcinoma da laringe, segundo o Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge – HAJ, apenas 10% (2/20) são do sexo feminino sendo o restante do sexo masculino, 90% (18/20).

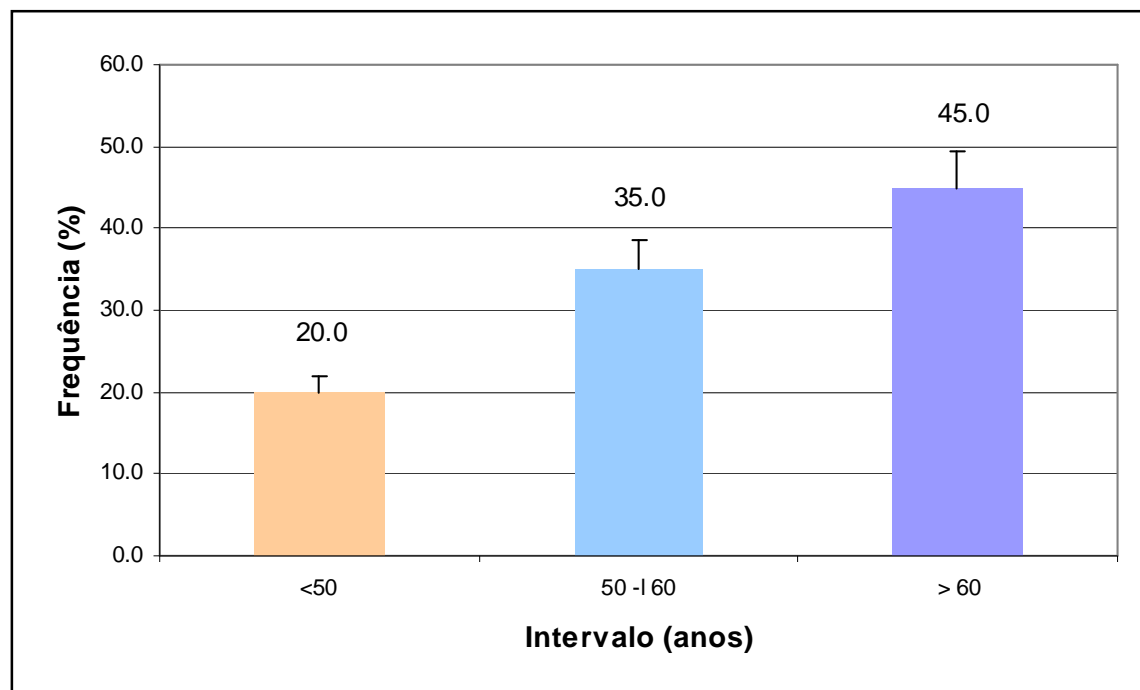


Figura 2. Distribuição da frequência de pacientes com CEC da laringe, segundo a faixa. etária.

Segundo WUNSCH-FILHO (2004) os tumores da laringe afetam pacientes entre 50 a 70 anos e preferencialmente indivíduos do sexo masculino. No entanto, SILVA e colaboradores (2003) apresentam que o CEC da laringe é 4,7 vezes mais freqüente em homens do que em mulheres, enquanto que neste estudo, a proporção foi de 9 homens afetados para 1 mulher. Esta condição está fortemente associada aos hábitos de tabagismo

e etilismo, mais predominantes no sexo masculino, principalmente quando ambos os hábitos estão presentes.

Em 73% dos pacientes (13/20), foi observado o provável sinergismo entre tabagismo e etilismo, que quando combinados, possuem uma forte relação dose-resposta com o risco de câncer laríngeo (TALAMINI *et al.*, 2002). A Figura 3 destaca a distribuição dos pacientes, segundo os critérios de classificação da etnia.

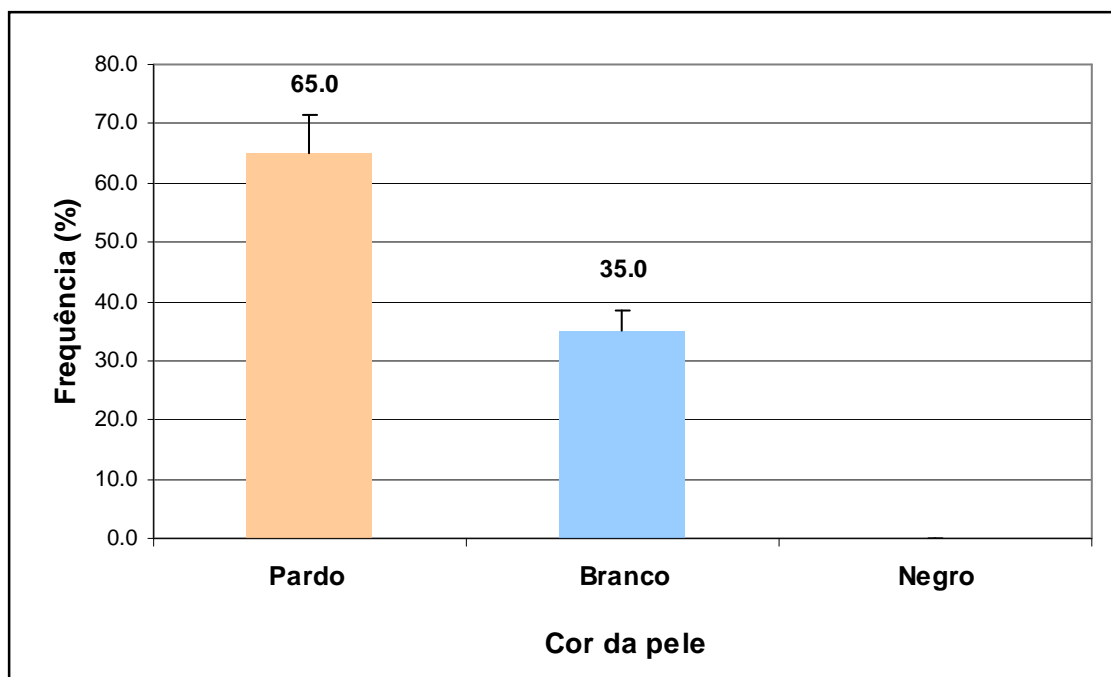


Figura 3. Distribuição da frequência de pacientes com CEC da laringe, segundo a etnia. etária.

A Figura 4 representa o perfil alélico observado para uma amostra de tecido normal e outra tumoral, no qual identificou instabilidade genômica relacionado ao *primer* RH 68036. Das mais de 60 reações de PCR executadas e analisadas, foram obtidas as seguintes considerações:

A instabilidade genômica foi avaliada utilizando um painel de 8 marcadores de microssatélites distribuídos em 5 cromossomos diferentes. Os *loci* D8S135 e RH-92600 foram considerados não informativos, pois se apresentaram homozigotos na maioria dos casos,

enquanto que 76,2% (244/320) *loci* foram informativos. Contudo, a frequência de MIS foi de 9% (22/244) e a frequência de LOH de 6,1% (15/244).

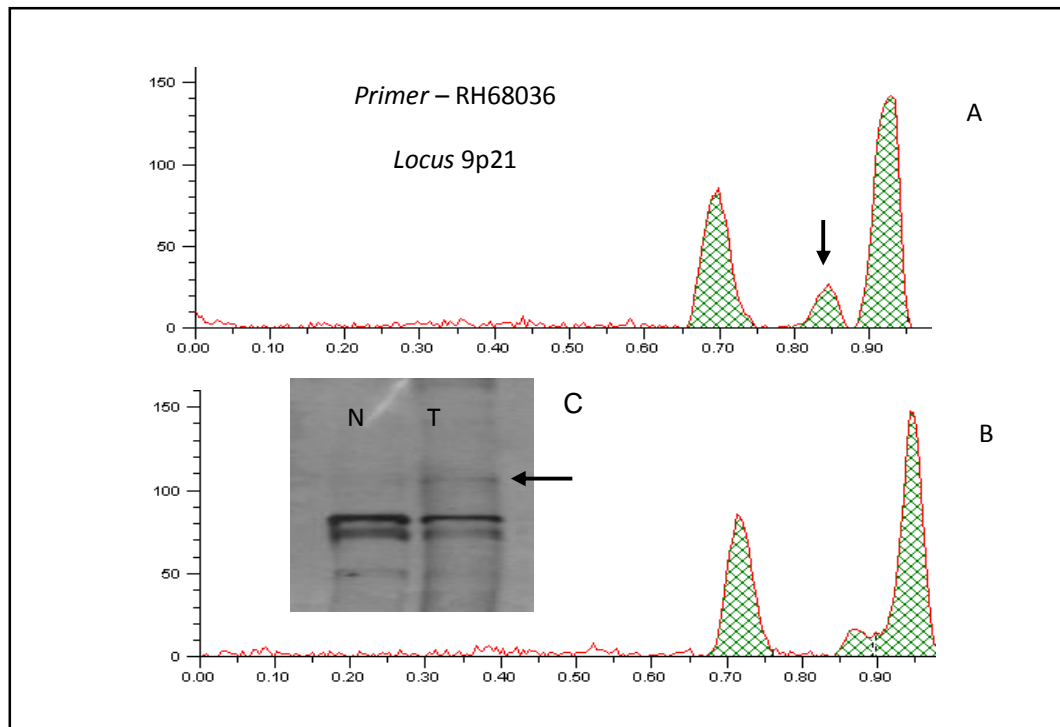


Figura 4. Análise do *locus* de microsatélite RH-68036 de indivíduo com CEC da laringe, Estádio III. Em (A) e (B) estão representados os eletroferogramas das amostras tumoral (T) e sangue (N), respectivamente. As setas indicam MIS. (C) Gel de poliacrilamida a 8% corado por nitrato de prata.

O *primer* RH 92600 não é informativo para a análise de LOH, já que 100% (20/20) das amostras analisadas para esse marcador estão em homozigose; os *primers* D17S1678 e RH17792, por sua vez mostraram-se bons marcadores moleculares para a análise de LOH e MIS, sendo que 10% (2/20) das amostras analisadas para o marcador D17S1678 foram positivas para LOH e 30% (6/20) apresentaram instabilidade no genoma tumoral (MIS). Esta mesma situação ocorre com o *primer* RH 68036, no qual 10% (2/20) das amostras

submetidas à PCR apresentaram LOH positivo e 30% (6/20) amplificaram uma banda extra, quando comparado ao tecido normal, na amostra tumoral indicando MIS positiva.

A Figura 5 indica LOH para o *primer* D17S1678 e onde se observa o perfil heterozigoto na amostra normal (sangue) e a perda de um dos alelos na amostra tumoral (biópsia).

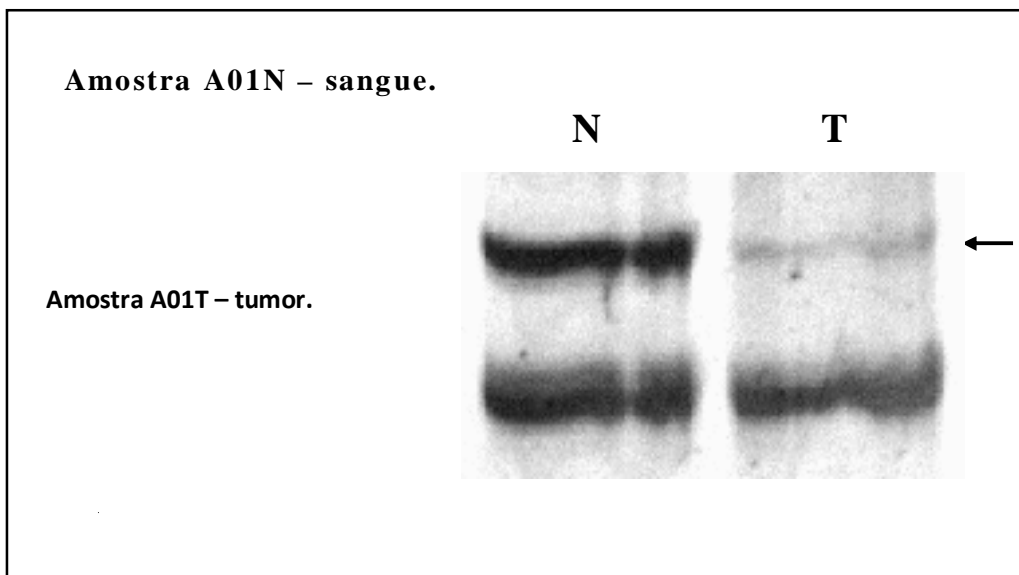


Figura 5. Análise do *locus* microsatélite D17S1678 do paciente A01 em gel de poliacrilamida a 8% corado por nitrato de prata. As LOH estão indicadas pelas setas. Legenda: A01N: amostra do sangue (tecido normal) do paciente A01; A01T: amostra do tumor do paciente A01; N: amostra normal (sangue) e T: biópsia (tumor).

A frequência observada de MIS foi maior do que a frequência de LOH, sugerindo que o carcinoma das células escamosas da laringe segue o mecanismo “*fenótipo mutante*”.

A Tabela II representa a distribuição das frequências das instabilidades genômicas observadas por *locus* cromossômico, enquanto que a Figura 6 destaca a frequência da Perda de Heterozigose (LOH) e Instabilidade de Microsatélites (MIS) para os 320 *loci* avaliados neste estudo.

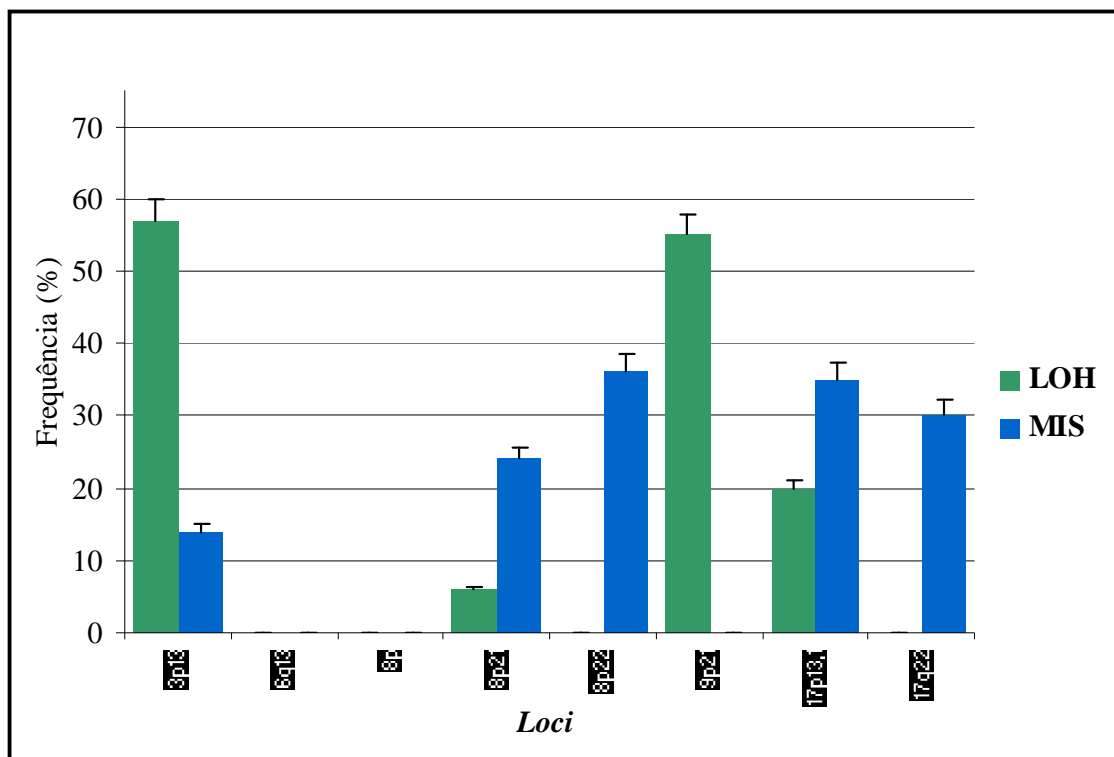
Tabela II. Resultado de LOH e MIS para o painel de 08 marcadores polimórficos de STRs em pacientes com CEC de laringe.

Pacientes	Estádio	D17S1678	STS-M95585	RH-68036	WI-20580	RH-17792	RH-92600	STS-AA027856	D8S135	FAL (LOH)
438	I	R	Ni	NA	NA	R	Ni	NA	Ni	0,000
482		R	R	NA	R	R	NA	NA	Ni	0,000
200	II	LOH	R	R	R	LOH	Ni	LOH	Ni	0,375
417		R	R	LOH	NA	R	Ni	LOH	Ni	0,286
429		MIS	MIS	LOH	R	MIS	NA	NA	Ni	0,200
490		R	MIS	R	NA	R	Ni	NA	Ni	0,000
376		MIS	R	NA	NA	NA	NA	NA	Ni	0,000
458		R	R	R	R	R	NA	NA	Ni	0,000
209	III	R	R	R	MIS	R	Ni	R	Ni	0,000
271		R	R	LOH	NA	R	Ni	R	Ni	0,143
434		MIS	Ni	R	NA	MIS	Ni	NA	Ni	0,000
733		R	MIS	NA	NA	R	NA	NA	Ni	0,000
749	IV	MIS	0	NA	NA	MIS	NA	NA	Ni	0,000
276		LOH	0	NA	R	NA	NA	MIS	Ni	0,200
394		MIS	0	LOH	MIS	NA	NA	NA	Ni	0,200
497		LOH	0	LOH	NA	R	NA	NA	Ni	0,400
518		R	0	NA	R	R	NA	NA	Ni	0,000
567		MIS	MIS	LOH	R	R	NA	NA	Ni	0,167
591		MIS	MIS	NA	MIS	R	NA	LOH	Ni	0,167
606		LOH	MIS	NA	MIS	MIS	NA	LOH	Ni	0,333
LOH		4	0	6	0	1	0	4	0	0,124
MIS		7	6	0	4	4	0	1	0	-
TOTAL		20	20	11	11	17	7	7	20	-

Legenda: FAL = Frequência de LOH; LOH = Perda de Heterozigose; MIS = Instabilidade de Microsatélites; NA = Não avaliado; R = Retenção de Heterozigose; Ni = Não informativo; I, II, III e IV = Estadiamento da doença.

As regiões 3p13 (51%) e 9p21 (55%) foram às regiões mais comumente relacionadas à Perda de Heterozigose (LOH) no presente estudo. Os *loci* 8p21 e 8p22 apresentaram freqüências elevadas para MIS, 24% e 36% respectivamente.

Figura 6. Freqüência de LOH e MIS nos oito *locus* avaliados em pacientes com CEC da laringe.

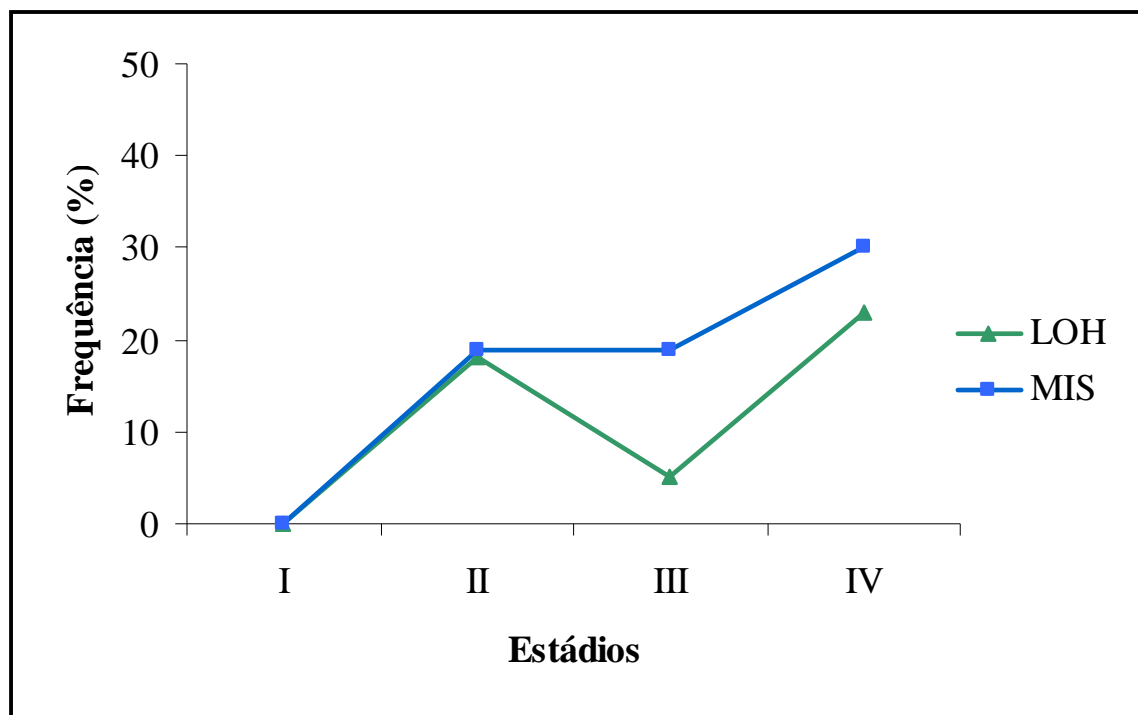


A Instabilidade também foi observada em 17p13.1 (35%) e 17q22 (30%), regiões no qual localizam-se importantes genes supressores de tumor como o gene *p53*. As regiões 8p21 e 8p22 apresentaram 20% (4/20) de MIS, em ambas, e 5% (1/20) de LOH para 8p21, sendo este evento não observado em 8p22. A região 17q22 observou-se uma freqüência de MIS de 30% (6/20). Foram encontrados ainda, 20% (4/20) de LOH e 5% (1/20) de MIS em 3p13 e 30% (6/20) de LOH correspondente à região 9p21. Em 17p13.1, 20% (4/20) das

amostras analisadas apresentavam LOH e 35% (7/20) correspondentes a MIS. Para o *locus* 8p11 todas as amostras mostraram-se não informativas (Ni) para esse estudo.

A Figura 7 apresenta a distribuição das freqüências da instabilidade genômica, associadas ao grau de estadiamento do CEC da laringe.

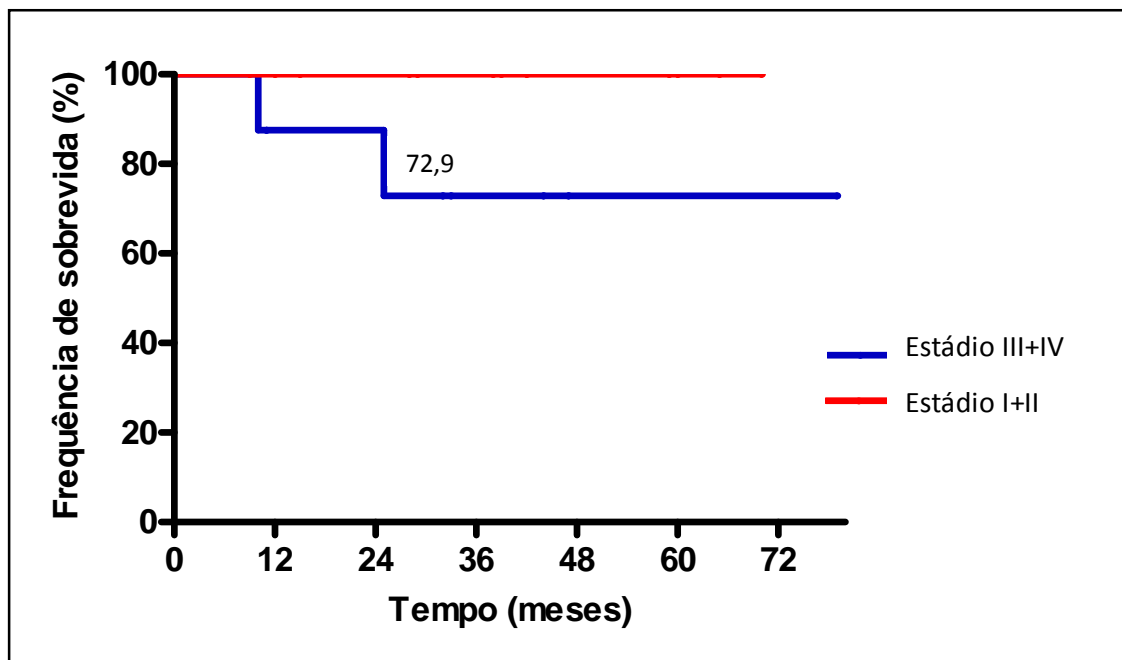
Figura 7. Distribuição da freqüência de LOH e MIS segundo o estadiamento clínico do CEC da laringe.



Quanto ao estadiamento clínico da doença, o paciente mais jovem (41 anos) apresenta Estádio I e TMN 1.0.0, enquanto que o paciente mais velho (83 anos) Estádio IV e TMN 3.2a.0, porém os dados referentes aos hábitos de tabagismo e etilismo deste paciente não foram informados. Entre os pacientes de CEC da laringe avaliados neste estudo, 10% apresentam-se no Estádio I, 30% no Estádio II, 20% no Estádio III e 40% no Estádio IV, porém nenhum apresentou comprometimento bilateral dos linfonodos e nenhuma metáfase à distância foi evidenciada. A Tábua de Vida Atuarial permitiu calcular a sobrevida dos pacientes, conforme a Figura 8, ao final de 72 meses, segundo o estadiamento do tumor. Para os pacientes com estádios I ou II a sobrevida foi de 100%, enquanto que para os

pacientes com estádios III ou IV a sobrevida foi de 72,9%. Ao aplicar o teste de *Logrank* entre os diferentes grupos de estadiamento (Grupo I/ II; Grupo III/IV) não foram obtidas diferenças significativas entre as sobrevidas.

Figura 8. Sobrevida dos pacientes com CEC da laringe segundo o estadiamento clínico do tumor.



Os carcinomas de cabeça e pescoço constituem um grupo de doenças heterogêneas com complexas anormalidades moleculares. Podem ter origem de lesões pré-malignas por um processo de expansão clonal devido ao acúmulo de alterações genéticas. Estas alterações resultam na inativação de genes supressores de tumor e na ativação de proto-oncogenes (PEREZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2006).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), dentre os carcinomas de cabeça e pescoço, os de boca são considerados os mais freqüentes, com cerca de 390 mil novos casos por ano (STEWART *et al.*, 2003). A designação comum de “câncer de boca” refere-se a uma categoria abrangente de localização de neoplasias com diferentes etiologias e perfis histológicos, embora a grande maioria dos tumores seja do tipo carcinoma de células

escamosas. Sua etiologia é multifatorial, integrando fatores endógenos, como a suscetibilidade genética, e fatores exógenos ambientais e comportamentais, como o hábito tabagista e etilista, de cuja integração pode resultar o agravo da doença (BIAZEVIC *et al.*, 2006).

Em muitos estudos que analisam LOH em tumores malignos de cabeça e pescoço, os diferentes sítios anatômicos não são distinguidos. Entretanto, sabe-se que o comportamento biológico varia entre os diferentes tipos tumorais, como boca, faringe e laringe, sugerindo propriedades intrínsecas distintas. Segundo REIS e colaboradores (2002), isto se reflete no padrão de crescimento do tumor, comportamento clínico e prognóstico, de modo que os diferentes sítios anatômicos não devem ser considerados como entidade única.

CONCLUSÕES

O presente estudo analisou vinte amostras de pacientes diagnosticados com Carcinoma Espinocelular (CEC) da Laringe e apresenta que: 1) As regiões 8p21 e 8p22 apresentaram 20% (4/20) de MIS, em ambas, e 5% (1/20) de LOH para 8p21, sendo este evento não observado em 8p22. 2) A região 17q22 observou-se uma freqüência de MIS de 30% (6/20). 3) Foram encontrados ainda, 20% (4/20) de LOH e 5% (1/20) de MIS em 3p13 e 30% (6/20) de LOH correspondente à região 9p21. 4) Em 17p13.1, 20% (4/20) das amostras analisadas apresentavam LOH e 35% (7/20) correspondentes a MIS. A alta freqüência de MIS encontrada no estudo sugere que a carcinogênese do CEC da laringe segue o mecanismo de fenótipo mutante. Investigações adicionais em regiões previamente estudadas, utilizando novas ferramentas de análise genômica e a investigação de outros fatores associados aos carcinomas laríngeos são ferramentas importantes na estimativa da progressão tumoral, prognóstico e, conseqüentemente, na melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA NO CARCINOMA DA LARINGE

Comparative Genomic Hybridization in the Larynx Cancer

da Silva CC & da Cruz AD

RESUMO

O carcinoma das células escamosas da laringe caracteriza-se como uma doença de natureza multifatorial e multigênica, sendo influenciada por fatores ambientais, comportamentais e inerentes ao indivíduo. Neste estudo foram analisadas, utilizando a técnica de hibridação genômica comparativa, amostras de sangue periférico e biópsias do tecido tumoral de 20 pacientes diagnosticados com CCE da laringe. Os resultados mostram que as principais regiões de ganhos foram observadas em 1q21→qter, enquanto que as perdas cromossômicas ocorreram em 3p21→p28, 11q23, 16p16, 16q12, 17p13→pter e 22q13. As técnicas de hibridação genômica comparativa têm contribuído para melhorar a compreensão das alterações genéticas no carcinoma das células escamosas da laringe, sobretudo para a caracterização da relação entre estágios precursores de câncer laríngeo, assim como, para a identificação de regiões genômicas que podem conter oncogenes e genes supressores tumorais.

Palavras-Chave: CGH – CEC de laringe – Oncogenes – Genes Supressores de Tumor

INTRODUÇÃO

O processo de tumorigênese está associado com a ocorrência de alterações genéticas que, gradativamente se acumulam no genoma de uma célula normal. Dessa forma, os processos de identificação e caracterização dos genes alterados que participam da iniciação, promoção e progressão tumoral são fundamentais para a compreensão das bases moleculares da doença (FERREIRA & ROCHA, 2004; JIN *et al.*, 1995).

O carcinoma das células escamosas (CCE) é a neoplasia mais comum que acomete a laringe, representando 2-3% de todas as malignidades diagnosticadas em todo o mundo e corresponde a 5% dos cânceres que anualmente são diagnosticados na Europa (Keser *et al.*, 2008; SCHLADE-BARTUSIAK *et al.*, 2005). O CCE da laringe caracteriza-se como uma doença de natureza multifatorial e multigênica, sendo influenciada por fatores ambientais, comportamentais e inerentes ao indivíduo. O sexo, idade e características genéticas individuais são considerados como os fatores de risco endógenos mais freqüentemente relacionados ao carcinoma da laringe (OLIVEIRA, 2005).

A epidemiologia do carcinoma das células escamosas da laringe apresenta alta complexidade devido à natureza multigênica da doença e ao grande número de agentes ambientais potenciais em que os indivíduos são expostos. A distribuição dos fatores de risco varia consideravelmente nas diferentes populações. Os principais comportamentos de risco envolvidos no carcinoma da laringe estão relacionados ao consumo de álcool e do tabaco (PAPADIMITRAKOPOULOU, 2000). Por outro lado, a presença do genoma do papilomavírus humano (HPV) associado ao material genético das células do epitélio laríngeo tem sido atribuída como um fator de risco adicional na etiologia deste tumor (OLIVEIRA, 2005; LAZARUS *et al.*, 2000).

Segundo KESER e colaboradores (2008) diversas alterações genéticas têm sido observadas em níveis citogenéticos (desequilíbrios cromossômicos e alterações estruturais) e em níveis moleculares (mutações de ponto, instabilidade de microssatélites-MIS e perda da heterozigose- LOH).

Alterações cromossômicas clonais foram descritas por MITELMAN e colaboradores (2000) utilizando técnicas clássicas de bandeamento cromossômico e hibridação fluorescente *in situ* (FISH) em mais de 250 casos de CCE (SCHLADE-BARTUSIAK *et al.*, 2005). Alterações estruturais incluindo isocromossomos de 3q, 5p e 8p também foram observadas (JIN *et al.*, 2006; GOLLIN, 2001).

Com o emprego da técnica de Hibridação Genômica Comparativa (CGH), perdas de material genético foram relatadas envolvendo as regiões 3p, 5q, 7q, 8p, 9p, 11q, 13p, 14p, 15p e 18p e os ganhos cromossômicos mais importantes foram observados em 1q, 3q, 8q, 11q13 e 15q (KESER *et al.*, 2008; STRUSKI *et al.*, 2002; OWENS *et al.*, 1992).

Avanços em técnicas de citogenética molecular (FISH e CGH) têm contribuído para melhorar a compreensão das alterações genéticas no carcinoma das células escamosas da laringe, sobretudo para a caracterização da relação entre possíveis estágios precursores de câncer laríngeo, assim como, para a identificação de regiões genômicas que podem conter genes supressores de tumor e oncogenes (KESER *et al.*, 2008).

MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo caso-controle resultante da parceria entre Secretaria de Estado da Saúde do Governo do Estado de Goiás, Pontifícia Universidade Católica de Goiás e o Registro de Câncer de Base Populacional da Associação de Combate ao Câncer em Goiás.

Grupo Amostral

O grupo de estudo foi constituído por 20 indivíduos de ambos os sexos. As amostras foram obtidas junto ao Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge (HAJ). Foram selecionados os casos de câncer primário da laringe por ocasião do diagnóstico, anteriormente ao início do tratamento. Os indivíduos doadores receberam informações sobre os objetivos deste estudo, assinaram o termo de consentimento pós-informação e responderam individualmente um questionário, com respeito à história individual de exposição aos fatores ocupacionais, ambientais e hábitos de vida, previamente aprovado pelo comitê de ética em pesquisa.

Obtenção das Amostras

Subseqüente à entrevista, 10 mL de sangue periférico heparinizado, por punção venosa, foi obtido junto aos doadores. Após a coleta, o sangue foi centrifugado para a retirada do anel leucocitário e armazenado em micro-tubos à temperatura de -20°C para posterior extração de DNA. Adicionalmente, amostras frescas de tecidos, biópsia ou espécime cirúrgico, foram obtidas e armazenadas por criopreservação.

As amostras de tecido tumoral foram avaliadas pelo serviço de patologia do HAJ, para confirmar a presença de malignidade. A classificação histopatológica foi realizada de acordo com a *WHO - International Classification of Tumors*. O estágio clínico foi determinado pelo estadiamento TNM do tumor.

Extração e Purificação do DNA

O método para a extração e o isolamento de DNA foi escolhido com a finalidade de originar DNA de alto peso molecular e consiste, basicamente, no rompimento mecânico

e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol. Para a extração, foi utilizado o kit comercial de purificação do DNA genômico *Wizard*[®] (Promega Corporation, EUA), seguindo todas as instruções do fabricante.

Hibridização Genômica Comparativa

A investigação dos desbalanços cromossômicos por CGH (Kallioniemi *et al.*, 1992) foi realizada utilizando o kit comercial para CGH / *Nick Translation*[®] (VYSIS, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Para verificar a eficiência do processo de marcação, as amostras foram submetidas, utilizando um gel de agarose (2%) em TBE 1X, a um campo elétrico com voltagem constante de 10V/cm, por 1h. Os fragmentos de DNA com 300-1000pb foram revelados pela coloração do gel em solução de brometo de etídeo (5mg/mL). Posteriormente, a imagem foi capturada utilizando sistema de vídeo-documentação / VDS – *Video-documentation System*[®] (GENERAL ELECTRICS, USA).

As condições de hibridação das amostras ocorreram em sistema de co-desnaturação, utilizando forno de hibridação para lâminas do tipo *Hybride*[®] (VYSIS, USA). A Tabela I apresenta os detalhes da hibridação das amostras.

Tabela I. Protocolo de hibridação dos fragmentos marcados por Nick Translation envolvendo a co-desnaturação em forno para lâminas.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Co-desnaturação Inicial	84±1	5 minutos	1
Anelamento	37	72 horas	1
Armazenamento	4	∞	∞

A captura das imagens foi realizada utilizando o sistema de fotomicrografia de epifluorescência *Axiolmage2*[®] (CARL ZEISS, ALEMANHA) equipado com lâmpada de mercúrio HBO – 100W, platina motorizada e conjuntos de filtros (emissão/excitação) para fluorescência (FITC – 550/540nm, DAPI - 340/440nm e TRICT – 660/570nm) e o Software *ISIS/CGH*[®] (METASYSTEMS, ALEMANHA).

Na obtenção do perfil linear para CGH cromossômico, foram utilizadas no mínimo, 10 metáfases por caso. Os valores limítrofes para ganhos e perdas foram, respectivamente, 1.25 e 0.75. As perdas cromossômicas foram consideradas para os casos que apresentaram valores menores que 0.75. Os ganhos cromossômicos para os casos com valores maiores que 1.25. Nos casos de amplificação gênica, o intervalo do perfil cromossômico apresentou valores acima de 2.25.

As imagens dos cromossomos sobrepostos, alterações estruturais (quebras cromatídicas/cromossômicas, cromossomos em anéis, fragmentos acêntricos, cromossomos dicêntricos, dentre outras), depósitos de corante, ausência de fluorescência e o cromossomo Y foram excluídos da análise. Como controle interno da reação de CGH foi utilizado o DNA da linhagem celular *MPE600*[®] (VYSIS, USA) que apresenta um conjunto de alterações genômicas pré-identificadas que acompanha o Kit de CGH utilizado neste estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estatística Descritiva do Grupo Amostral

A Tabela II apresenta o descritivo do grupo amostral utilizado para a avaliação dos imbalances genômicos do CCE da laringe, considerando a idade, estadiamento tumoral, sexo, TMN e consumo de álcool e Tabaco.

Tabela II. Estatística descritiva do grupo amostral utilizado na avaliação genômica do carcinoma das células escamosas da laringe.

Paciente	Idade (anos)	Estadiamento	Sexo	T	N	M	Tabagismo	Etilismo
A07	62	I	M	1	0	0	Sim	Não
A15	41	I	M	1	0	0	Sim	Sim
A01	59	II	F	2	0	0	Sim	Não
A04	69	II	M	2	0	0	Sim	Sim
A05	59	II	M	2	0	0	Sim	Sim
A08	60	II	M	2	0	0	Sim	Sim
A12	44	II	M	2	0	0	Sim	Sim
A14	61	II	M	2	0	0	Sim	Sim
A02	73	III	M	3	1	0	Sim	Não
A03	58	III	M	3	0	0	Sim	Não
A06	56	III	M	3	0	0	Sim	Sim
A09	73	III	M	3	0	0	Sim	Sim
A10	80	IV	M	4	0	0	Sim	Sim
A11	53	IV	M	4	0	0	Sim	Sim
A13	54	IV	F	4	0	0	Sim	Não
A16	83	IV	M	3	2a	0	Ni*	Ni*
A17	74	IV	M	4	0	0	Sim	Sim
A18	42	IV	M	3	3	0	Sim	Sim
A19	63	IV	M	4	1	0	Sim	Não
A20	49	IV	M	4	0	0	Sim	Sim

* Ni = Não informado; M = Masculino; F = Feminino

A média de idade observada no grupo amostral foi de 60,7 anos, obedecendo a um intervalo entre 41 e 83. Dos 20 pacientes diagnosticados com CCE da laringe segundo o Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge, 10% (2/20) são do sexo feminino e 90% (18/20) do sexo masculino.

Segundo WUNSCH-FILHO (2004) os tumores da laringe afetam pacientes entre 50 a 70 anos e preferencialmente indivíduos do sexo masculino. Estas condições foram

coincidentes nos pacientes avaliados neste estudo. No entanto, SILVA (2003) relatam que o CEC da laringe é 4,7 vezes mais freqüente em homens do que em mulheres, enquanto que neste estudo, a proporção é de 9 homens afetados para 1 mulher. Esta condição é fortemente associada aos hábitos de tabagismo e etilismo, mais predominantes no sexo masculino, principalmente quando ambos os hábitos estão presentes.

Em 73% dos pacientes (13/20), evidenciamos a associação entre tabagismo e etilismo, que quando combinados, possuem uma forte relação dose-resposta com o risco de câncer laríngeo (OLIVEIRA, 2005).

Quanto ao estadiamento clínico da doença, o paciente mais jovem (41 anos) apresenta Estádio I e TMN 1.0.0, enquanto que o paciente mais velho (83 anos) Estádio IV e TMN 3.2a.0, porém os dados referentes aos hábitos de tabagismo e etilismo deste paciente não foram informados. Entre os pacientes de CEC da laringe avaliados, 10% apresentam-se no Estádio I, 30% no Estádio II, 20% no Estádio III e 40% no Estádio IV, porém nenhum apresentou comprometimento bilateral dos linfonodos e nenhuma metáfase à distância foi evidenciada.

Imbalanços cromossômicos detectados por CGH

Nos estudos de câncer de laringe, a técnica de CGH tem contribuído para a caracterização da relação entre possíveis estágios precursores de câncer laríngeo, assim como, para a identificação de regiões genômicas que podem conter genes supressores de tumor e oncogenes.

Esta técnica vem sendo aplicada em uma grande variedade de lesões laríngeas, desde as benignas até cânceres de laringe invasivos e metastáticos (DOS REIS *et al.*, 2002). Foram

analisadas pela técnica de CGH cromossômico, 20 amostras de pacientes com carcinoma das células escamosas da laringe.

A Figura 1 exemplifica os desequilíbrios cromossômicos observados nesta análise. A técnica de CGH, extensivamente utilizada para a identificação das alterações genéticas associadas ao câncer, permite a análise em um único experimento, de alterações do número de cópias de DNA de todo o genoma.

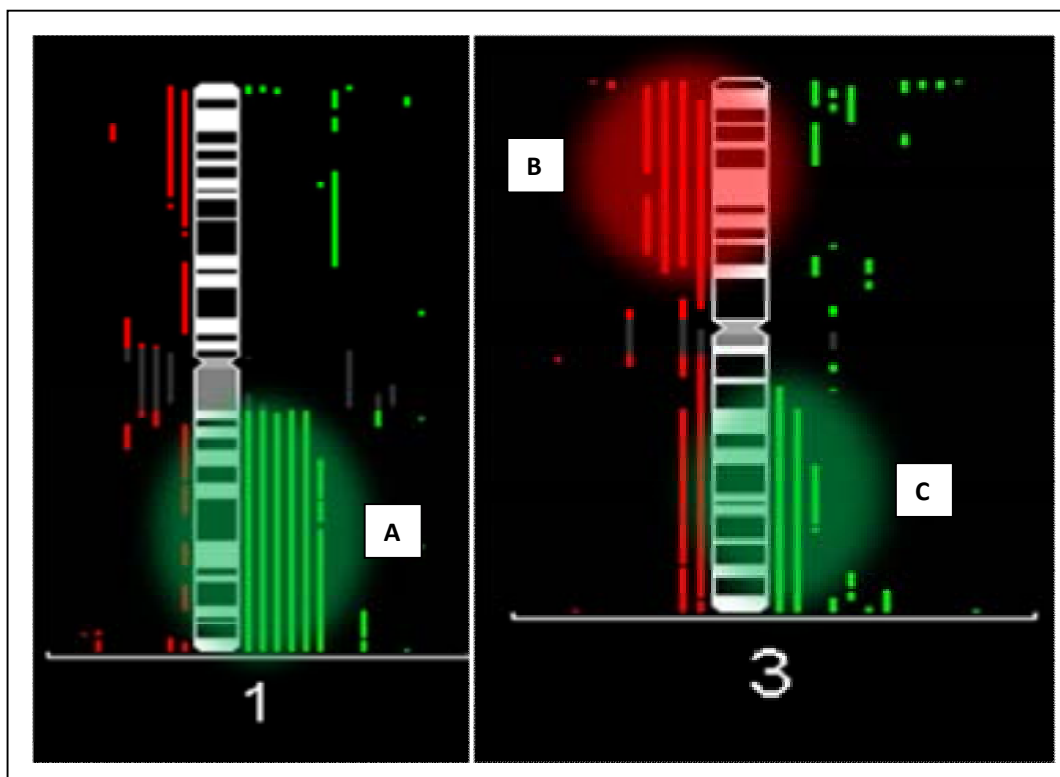


Figura 1. Perfil cromossômico evidenciando em (A) amplificação gênica. Em (B) perda cromossômica e em (C) ganho cromossômico.

A Figura 2 apresenta o perfil individual para os cromossomos 01, 03, 05 e 22, obtidos a partir da hibridação de metáfases normais com DNA genômico extraído da linhagem de células tumorais *MPE6000*[®] (VYSIS – USA), as quais acompanham o Kit de CGH, sendo utilizadas como controle interno da reação de CGH.

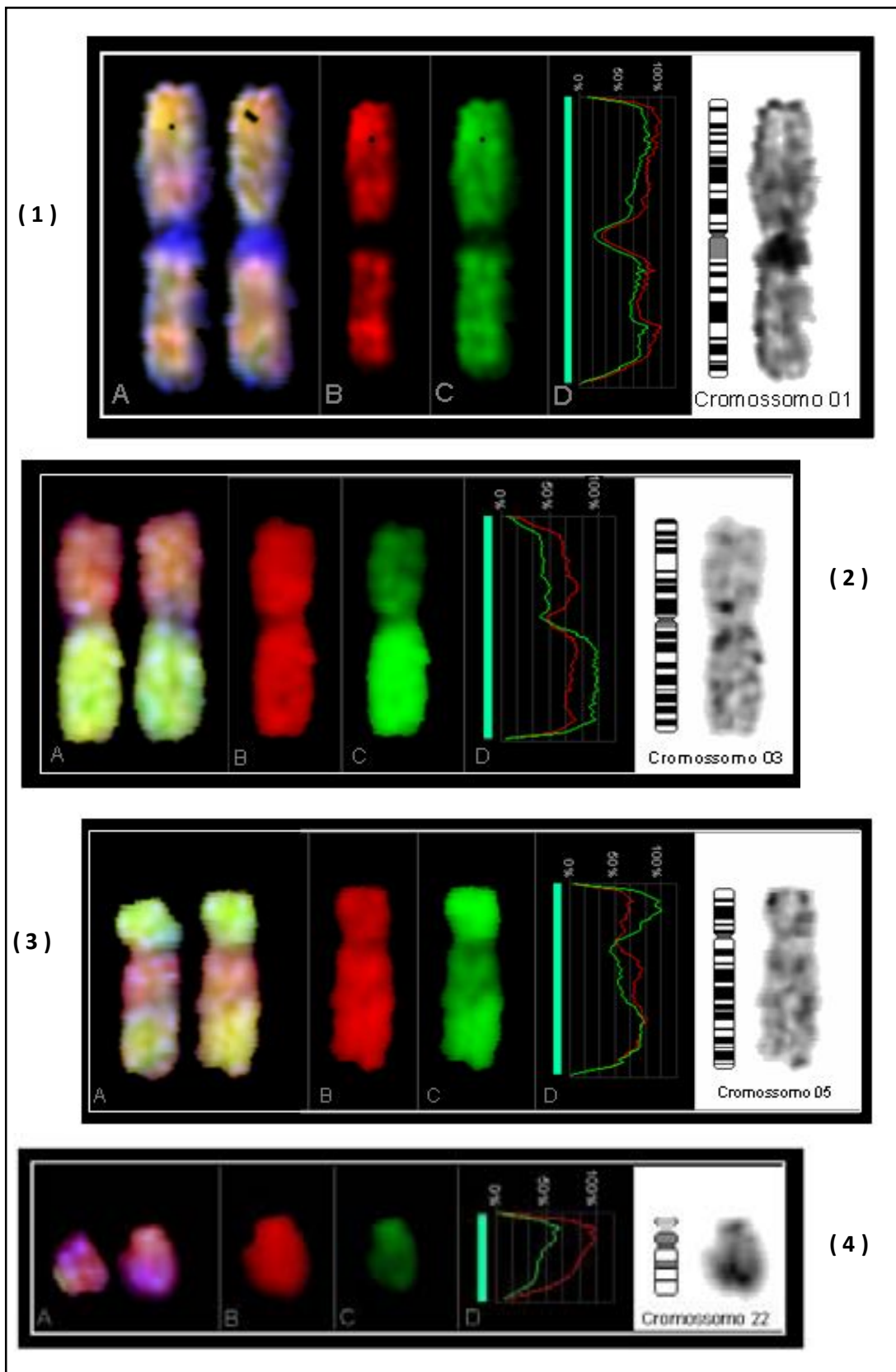


Figura 2. Perfil linear individual por cromossomo. Detalhes vide texto.

O intervalo do perfil linear cromossômico utilizado como critério na avaliação das alterações do número de cópias das regiões do genoma foi de 0.75 – 1.25, conforme resultados obtidos utilizando DNA de referência da linhagem de células *MPE600*[®] (VYSIS, USA). As perdas cromossômicas foram consideradas para os casos que apresentaram valores menores que 0.75. Os ganhos cromossômicos para os casos com valores maiores que 1.25. Nos casos de amplificação gênica, o intervalo do perfil linear cromossômico apresentou valores acima de 2.25.

No caso da Figura 2, as situações A, B, C e D, representam o resultado final otimizado para a análise cromossômica por CGH. A imagem em (A) é obtida pela sobreposição das capturas seriadas da metáfase analisada, utilizando os filtros DAPI (340/440nm – cor azul), Vermelho (TRICT – 660/570nm, com imagem representada em B) e Verde (FITC – 550/540nm, com imagem representada em C). Em (D), tem-se o perfil de CGH cromossômico, evidenciando as regiões de ganhos (linha verde) e de perdas (linha vermelha) em porcentagens por região cromossômica.

Adicionalmente, é adicionado em cada imagem o ideograma e o cromossomo específico no padrão de bandeamento DAPI (em preto e branco). Estas imagens foram geradas com a utilização o *software ISIS/CGH*[®] (METASYSTEMS – ALEMANHA). A Figura 3 representa uma metáfase normal, utilizada como controle negativo, e o respectivo pareamento cromossômico utilizado para a obtenção do perfil de CGH cromossômico.

A Figura 4 representa em (A) o perfil linear cromossômico obtido a partir da análise de metáfases hibridadas com DNA genômico da linhagem de células *MPE600*[®] (VYSIS, EUA) apresentando as seguintes alterações: Perdas em 2q; 4q; 7p; 8qter; 9q; 10p; 11qter; 12pter; 12qter; 13q; 17pter; 18p; 18q e 22q. Ganhos em 7q; 19p e 19q. Em (B) o perfil linear

cromossômico obtido a partir da análise de metáfases de indivíduo citogeneticamente normal hibridadas com DNA genômico não apresentando alterações detectáveis por CGH.

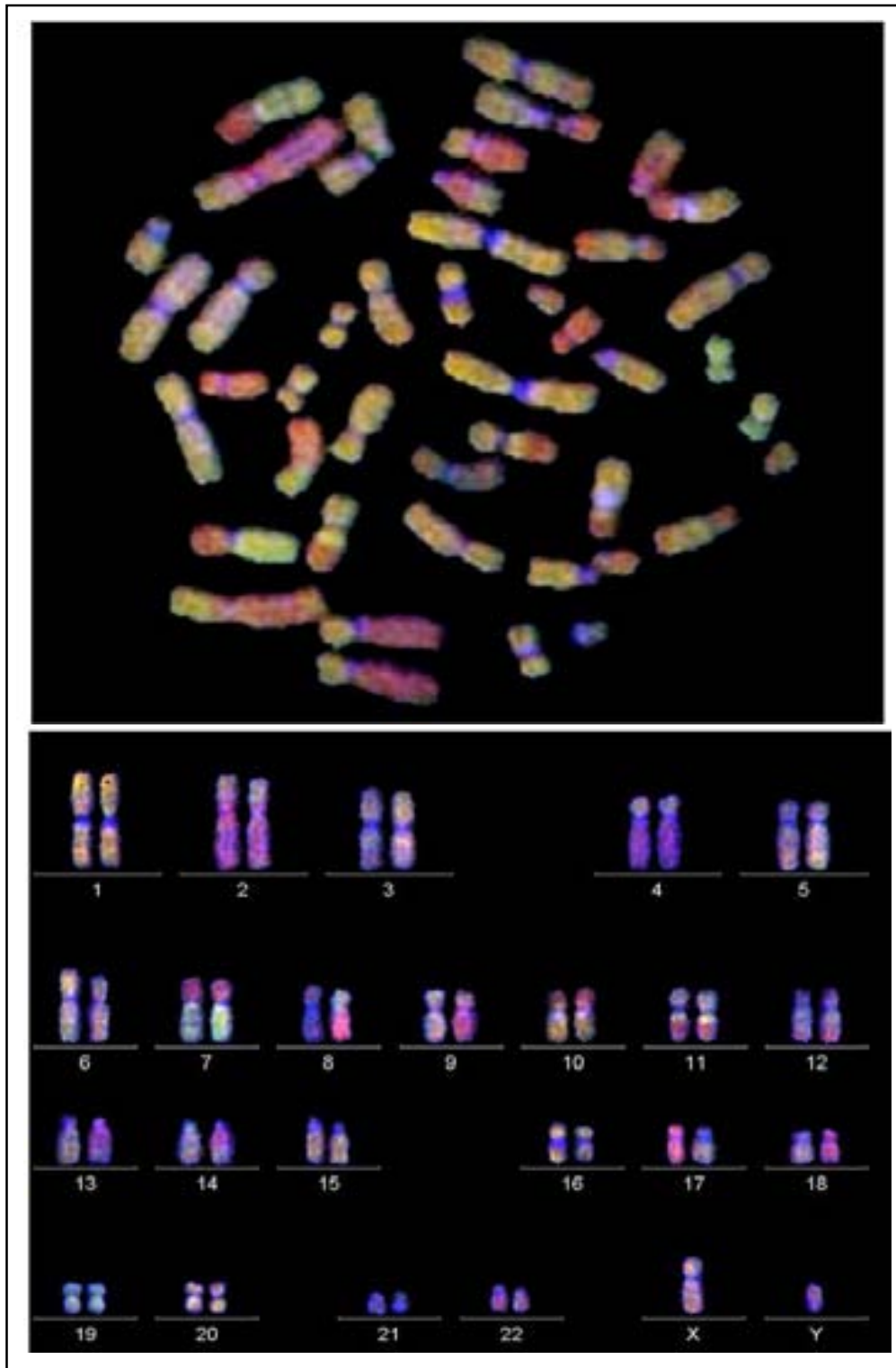


Figura 3. Metáfase normal (controle negativo) e pareamento cromossômico utilizado para a obtenção do perfil de CGH cromossômico.

Estes resultados permitiram aperfeiçoar a plataforma e os limites de análise específica para o *software* *ISIS*[®]/*CGH* (METASYSTEMS – ALEMANHA).

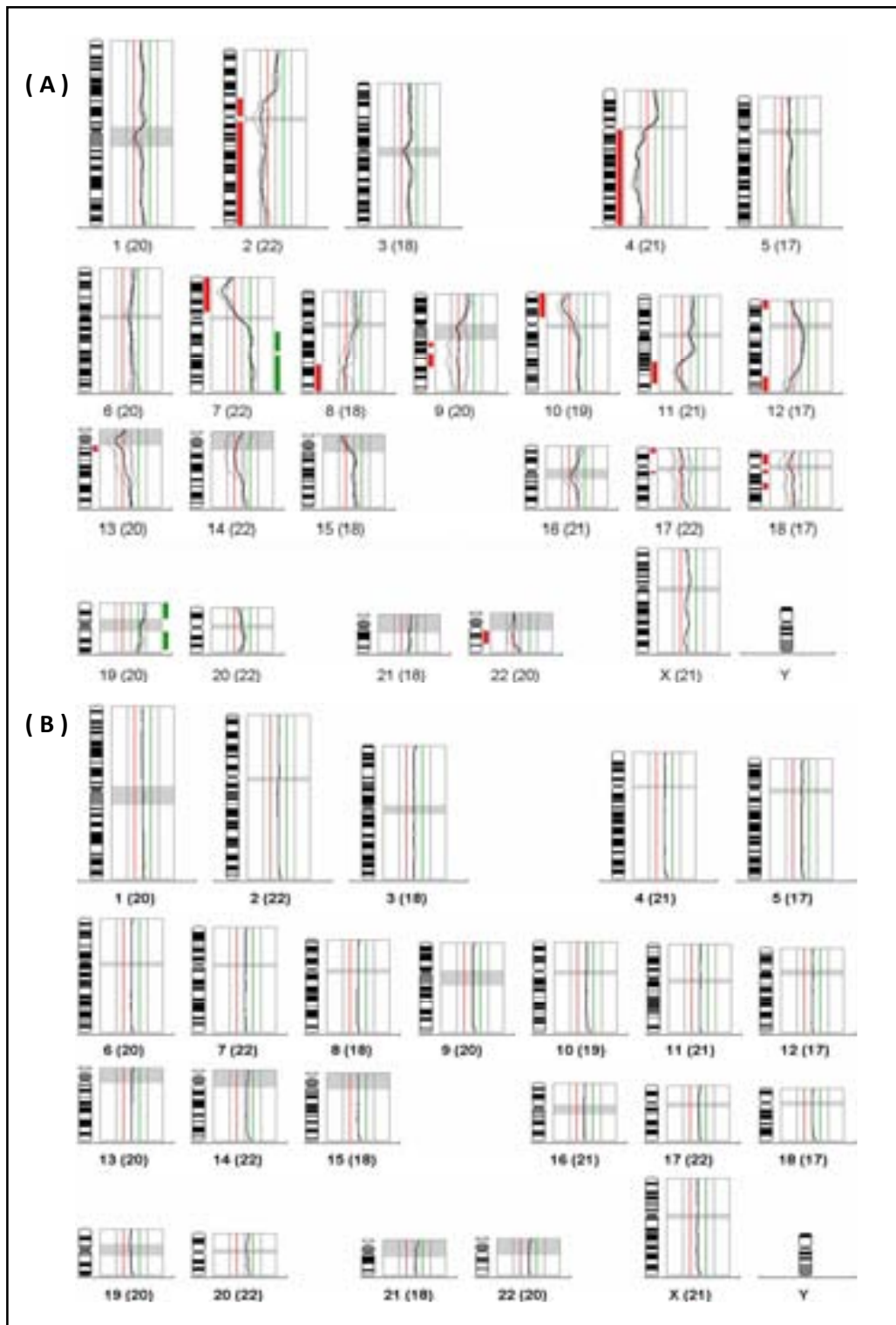


Figura 4. Perfil linear obtido a partir do DNA genômico obtido a partir da (A) linhagem de células *MPE600* e (B) células de indivíduo normal.

Os resultados obtidos após a análise da hibridação comparativa envolvendo o genoma de indivíduos que apresentam CEC da laringe conforme as alterações do número de cópias de DNA, incluindo regiões com amplificações gênicas, ganhos e perdas cromossômicas estão apresentados na Tabela III.

A Tabela IV apresenta as freqüências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas em carcinoma das células escamosas da laringe por caso, enquanto que a Tabela V apresenta tais freqüências por cada cromossomo.

Nos 20 casos de tumores de laringe avaliados, foi observado um total de 295 alterações cromossômicas, com uma média de $14,75 \pm 4,3$ alterações por caso. As alterações cromossômicas não se distribuíram ao acaso entre os casos estudados ($\chi^2_{20} = 60,61$; $P < 0,001$), sendo que os casos 4 (21 – 7,1%), 6 (32 – 10,8%), 8 (26 – 8,8%) e 20 (26 – 8,8%) foram os que apresentaram os maiores números de alterações cromossômicas, com 18 ganhos e 3 perdas, 20 ganhos e 12 perdas, 25 ganhos e 1 perda e 19 ganhos e 7 perdas, respectivamente. Os casos 10 (7 – 2,4%), 13 (7 – 2,4%), 17 (6 – 2%) e 18 (4 – 1,4%) apresentaram os menores números de imbalances cromossômicos, sendo 3 ganhos e 4 perdas, 4 ganhos e 3 perdas, 3 ganhos e 3 perdas e 2 ganhos e 2 perdas, respectivamente.

Os ganhos de cópias de DNA (187) foram mais freqüentes do que as perdas (108) com um número médio por caso de $9,4 \pm 2,3$ e $5,4 \pm 1,7$, respectivamente, evidenciando uma diferença de, aproximadamente 58% para as regiões com maior número de cópias. Neste sentido, recentes estudos (STRUSKI *et al.*, 2002; RASMUSSEN *et al.*, 2002; CHIEN *et al.*, 2001) enfatizam que os ganhos genômicos normalmente superam as perdas cromossômicas, contribuindo assim para entender que diversos proto-oncogenes ou oncogenes ainda apresentam o seu papel pouco esclarecido e que devem ser objetivos de maiores investigações.

Tabela III. Alterações cromossômicas observadas nos casos de carcinoma das células escamosas da laringe.

Caso	Crom 1	Crom 2	Crom 3	Crom 4	Crom 5	Crom 6	Crom 7	Crom 8	Crom 9	Crom 10	Crom 11	Crom 12
01	-1p13	+2p25	+3q29	+4q35			-7q11	+8q11-q12				+12p13
02	+1q21.1~qter (A)	+2p25			+5q35			+8q24 -8q11~q13			-11q22~q24	
03	+1p36.3 +1q21.1~qter (A)	+2p11~p16 (A)				+6q22			+9q34.1~qter		-11q22.3 -11q22~qter	
04	+1p36 -1q43	-2q24~q36		+4p16 +4q12		-6p22~pter	+7p22 +7q11~q36	+8p23			+11p11~p15 +11q12	+12q24
05	+1p22~p36		-3p13~p29		-5p12~p13 +5q13~q15	+6q21~q22	-7p14~p22 -7q11		-9p21~p24 +9q33~q34	+10q25	-11q	+12p11
06	-1p13~p21	+2p25	-3p14~p26 +3q	+4p13~p16	+5q33~35	-6p11 +6p21~p25 +6q21~q22	+7q36	+8q21~q24	-9p24 +9q21~q34	-10q11~q21	-11p11~p13 -11q12~q23 +11p15 +11q	
07	+1q21	-2q37~qter	-3q29~qter		-5q35.3	+6q22.3	-7q36	-8q24.3		-10p15~pter		-12q24~qter
08		+2q37~qter	+3q26~qter	+4q35~qter	+5p +5q34~qter	+6p25~pter +6q27~qter	+7p22 +7q36		+9q34~qter	+10p11~pter +10q25~qter	+11q25	+12p13
09		+2q37~qter			+5q35~qter	-6p11		-8p13				+12q24
10	-1q43~q44		-3p26				-7p21~p22	-8p23~pter				
11	-1p13.1~p13.2							-8p23 -8q23				+12p24
12				+4p16		-6q25~qter	+7q21~q22	+8p11~p21		+10p11	-11q11~pter	+12p11~p12
13	-1q33~q35		-3p14~p21				+7p12(A)					
14	-1p36~pter		-3p21		-5p15~pter -5q35~qter			-8q24.2~qter		-10p11 -10q11~q26	+11p11.2(A)	+12p11
15				+4q35						+10q26.3		+12p12~pter +12q24(A)
16	+1p36 +1q	+2p11~p13	+3q26	-4p12		+6p25			-9p22~pter +9q34.3			
17	+1q32.1(A)											
18			+3q26~qter									
19	+1q42~q44		-3p26 +3q29			+6q27	+7p23 -7q36		+9q34(A)			+12p11 +12q24.3
20	+1p32.3 +1q23~qter		+3p12~p14 +3q29	+4q35		+6p21.3~pter	-7q22	+8p23.3	+9q34(A)	+10p15 -10q21.1~q26.3		-12q13 +12q15~q24.3

Crom 1 – Crom 12 : Cromossomo 1 – Cromossomo 11; + : Ganho; - : Perda; p : Braço curto; q : Braço longo; (A) Amplificação gênica

Tabela III. Alterações cromossômicas observadas nos casos de carcinoma das células escamosas da laringe - continuação.

Caso	Crom 13	Crom 14	Crom 15	Crom 16	Crom 17	Crom 18	Crom 19	Crom 20	Crom 21	Crom 22	Crom X
01				-16q11~q13	+17p25				+21q22		+Xp21~pter +Xq13-q21 +Xq26~q28
02	+13q33~qter (A)			-16	-17p11			+20q13			+Xq28
03	+13q12.1~q12.3 +13q34			-16p11.2-p13.3 -16q12.1~qter	-17p13						+Xp11.4-p21 +Xq22.3
04	+13q34	+14q32.3 (A)				+18p11.3 (A) +18q11-q12	+19p13	+20p13-q11	+21q22.3 (A)	+22q11	+Xp11-q13
05				-16q12	-17p13	-18q21			-21q		-Xp11 -Xp21-p22 +Xq28
06		+14q32	-15q11~q22	+16p12~p13 +16q22~q24	+17p13~pter +17q23~q25	+18p11	-19p -19q13	+20q13	+21q22	+22q13.1 (A)	-Xp11 -Xq12-q23
07		-14q32	+15q26.3~qter	-16q24~qter	-17q25~qter	-18q23	-19p13~pter			-22q13	+Xp11-p22
08		+14q	+15q26~qter	+16q24	+17p12~pter +17q25~qter	+18p11 +18q23	+19q13	+20	+21q21~qter	-22q	+Xq28~qter
09				+16p12 +16q23~qter		+18q12-q22		+20p12~pter +20q12~qter			+Xq27
10				+16q22~qter	+17						+Xq21~qter
11	+13q24-q32			-16p11~p13.2 -16q13-q22	+17p12-p13 +17q23~q25			-20p12~p13 -20q13-q22			+Xp22~pter
12				+16p13				-20q11.2~qter		-22q13.3~qter	-Xq28
13		-14q22~q24.3			+17p11~p12			+20p11.2-p13 +20q11~q13(A)			
14		-14q24.1~qter		-16p13~pter -16q24~qter	-17p11~p13 -17q21.3~qter	-18q23~qter	+19p13	+20q11(A)			-Xq28
15	+13q34			-16q11~q13		+18q23~qter			+21q11.2		
16	+13q12		-15q26~qter	+16p13~pter +16q	-17p12~pter			+20p13		-22q13.3~qter	+Xp11.4-q22
17	+13q34(A)			-16p11.2~p13 -16q	-17p13~pter			+20q13			
18				-16q12~q22						-22q13.3	+Xq22.3~q23
19		-14q24.3~q32.3	+15q26.3	+16q23~q24			+19p13(A)	+20p13 +20q13	+21q22(A)		
20	+13q33~qter		+15q15	+16p13-q24 -16q12~q21	-17p12~pter +17q24	+18p11.3	+19q13.4	+20p11.2~pter(A) +20q11.2~qter		-22q11.2	-Xp11.2 +Xq27~qter

Crom 13 – Crom X: Cromossomo 13 – Cromossomo X; +: Ganho; -: Perda; p: Braço curto; q: Braço longo; (A) Amplificação gênica

Tabela IV. Frequências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas observadas em tumores da laringe por caso.

Casos	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	10	3	8	3	9	5	18	3	7	12	20	12	4	13	25	1	9	2	3	4	5	7
%	3,4	1	2,7	1	3,1	1,7	6,1	1	2,4	4,1	6,8	4,1	1,4	4,4	8,5	0,3	3,1	0,7	1	1,4	1,7	2,4
TG	13		11		14		21		19		32		17		26		11		7		12	
%	4,4		3,7		4,7		7,1		6,4		10,8		5,8		8,8		3,7		2,4		4,1	

Casos	12		13		14		15		16		17		18		19		20		Total	
	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	6	5	4	3	4	14	7	1	11	5	3	3	2	2	13	3	19	7	187±4,8	108±3,7
%	2	1,7	1,4	1	1,4	4,7	2,4	0,3	3,7	1,7	1	1	0,7	0,7	4,4	1	6,4	2,4	63	37
TG	11		7		18		8		16		6		4		16		26		295±5,7	
%	3,7		2,4		6,1		2,7		5,4		2		1,4		5,4		8,8		100,0	

G: Ganho; P: Perda; TP: Total parcial; TG: Total geral; %: Porcentagem; ±: Desvio Padrão

Tabela V. Frequências, absoluta e relativa, das alterações cromossômicas observadas em tumores da laringe por cromossomo

Cromossomos	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	12	7	7	2	8	7	8	1	6	4	10	4	8	7	6	7	7	3	6	5	6	7	13	2
%	4,1	2,4	2,4	0,7	2,7	2,4	2,7	0,3	2,0	1,4	3,4	1,4	2,7	2,4	2	2,4	2,4	1	2	1,7	2	2,4	4,4	0,7
TG	19		9		15		9		10		14		15		13		10		11		13		15	
%	6,4		3,1		5,1		3,1		3,4		4,7		5,1		4,4		3,4		3,7		4,4		5,1	

Cromossomos	13		14		15		16		17		18		19		20		21		22		X	
	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P
TP	9	0	3	4	4	2	11	15	10	9	8	3	5	3	15	3	6	1	2	6	16	7
%	3,1	0	1	1,4	1,4	0,7	3,7	5,1	3,4	3,1	2,7	1	1,7	1	5,1	1	2	0,3	0,7	2	5,4	2,4
TG	9		7		6		26		19		11		8		18		7		8		23	
%	3,1		2,4		2		8,8		6,4		3,7		2,7		6,1		2,4		2,7		7,8	

G: Ganho; P: Perda; TP: Total parcial; TG: Total geral; %: Porcentagem; ±: Desvio Padrão

Em 50% (10/20) dos pacientes com CEC laríngeo apresentaram regiões com ampliações gênicas, sendo que 7 casos (70%) tiveram mais de uma região cromossômica com amplificação gênica.

A seguir, a Tabela VI relaciona os casos com mais de uma região com amplificação gênica, confrontando a idade e o estadiamento do tumor dos indivíduos investigados, para permitir uma melhor compreensão da participação dos eventos de amplificação com a evolução da doença.

Tabela VI. Regiões cromossômicas que apresentaram mais de um *locus* com amplificação gênica.

Caso	Idade (anos)	Locí com ampliações	TMN
02	46	1q21; 13q33	I
17	47	1q32; 13q34	I
03	43	1q21; 2p11-p16	II
20	51	9q34; 20p11	II
14	37	11p11.2; 20q11	III
19	55	9q34; 19p13; 21q22	III
04	69	14q32; 18p11.3; 21q22.3	IV

Dentre todas as alterações cromossômicas observadas os ganhos mais evidentes foram em 1q21→qter, enquanto que as regiões de perdas foram em 3p21, 11q23, 16p16, 16q12, 17p13 e 22q13. Estes dados reforçam a possibilidade de que essas regiões genômicas podem conter oncogenes e genes supressores de tumor, respectivamente.

As alterações cromossômicas foram observadas em todos os cromossomos, sendo que o cromossomo 1 (19 – 6,4%), 16 (26 – 8,8%), 17 (19 – 6,4%), 20 (18 – 6,1%) e X (23 – 7,8%) foram os que apresentaram as maiores quantidades de alterações, com 12 ganhos e 7 perdas, 11 ganhos e 15 perdas, 10 ganhos e 9 perdas, 15 ganhos e 3 perdas e 16 ganhos e 7 perdas, respectivamente.

Os cromossomos 14 (7 – 2,4%), 15 (6 – 2%) e 21 (7 – 2,4%) apresentaram os menores índices de imbalanços, sendo 3 ganhos e 4 perdas, 4 ganhos e 2 perdas e 6 ganhos e 1 perda, respectivamente. O número médio de ganhos e perdas por cromossomo foi de $12,8 \pm 3,3$, sendo $8,2 \pm 1,3$ e $4,7 \pm 1,1$, respectivamente, evidenciando uma diferença de 74% para as regiões com aumento no número de cópias.

A Figura 5 evidencia o perfil do CGH cromossômico obtido durante a análise de aproximadamente 200 metáfases, onde 3.625 cromossomos foram analisados, sendo que a média de cromossomos avaliados por par de homólogos foi de $157,6 \pm 20,3$.

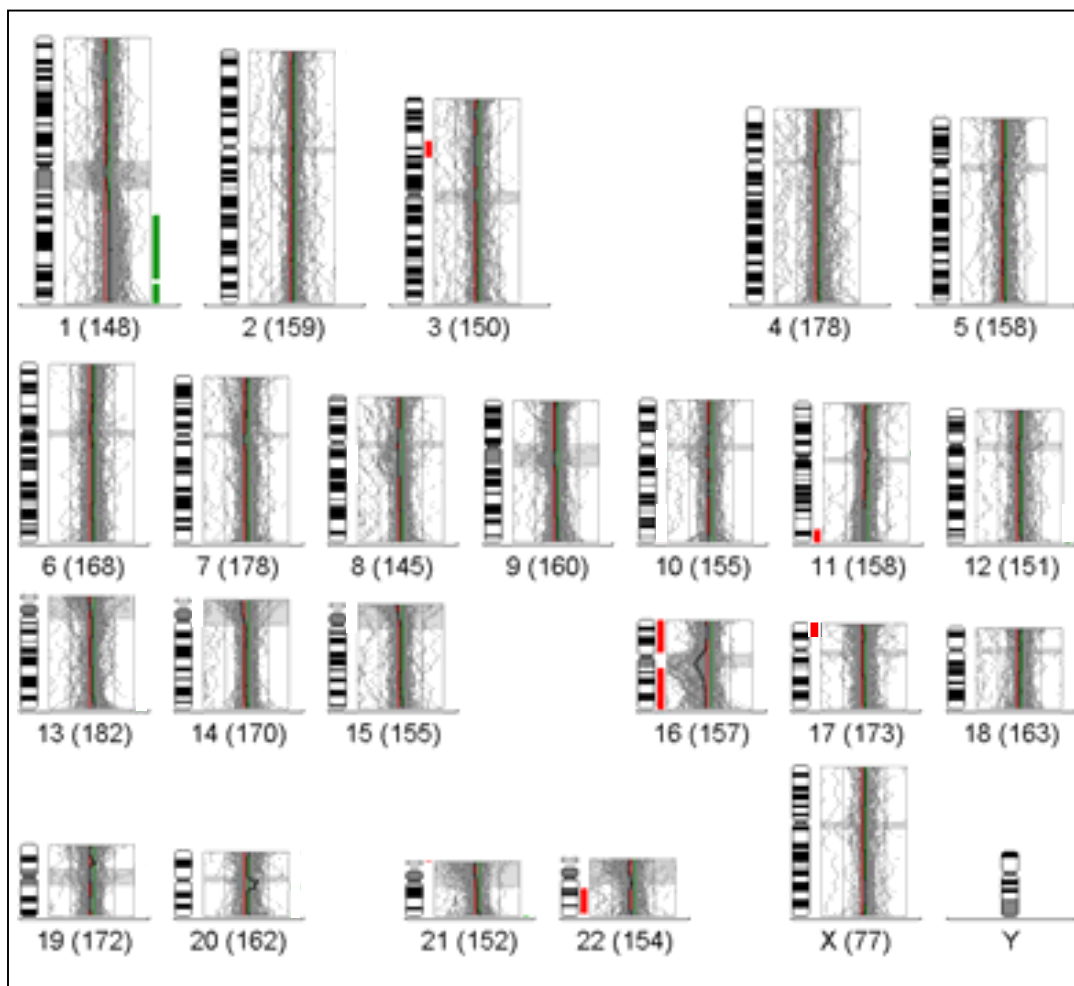


Figura 5. Perfil do CGH cromossômico metafásico evidenciando as regiões com ampliações ou ganhos (regiões verdes) e perdas cromossômicas (regiões vermelhas) de pacientes com CEC da laringe. Os números contidos nos parênteses correspondem à quantidade de cromossomos avaliados por cada par de homólogo. O cromossomo Y não foi avaliado.

A Figura 6 destaca a quantidade de alterações observadas nos cromossomos avaliados. Nestas condições, a quantidade de cromossomos investigados é suficiente para a análise de *loci* envolvidos nas alterações, permitindo considerar que as regiões gênicas envolvidas possam caracterizar a natureza e o perfil dos imbalances cromossômicos do CEC da laringe. Por outro lado, pode-se identificar o cromossomo X como “outlier”, recomendando sua exclusão durante as análises estatísticas.

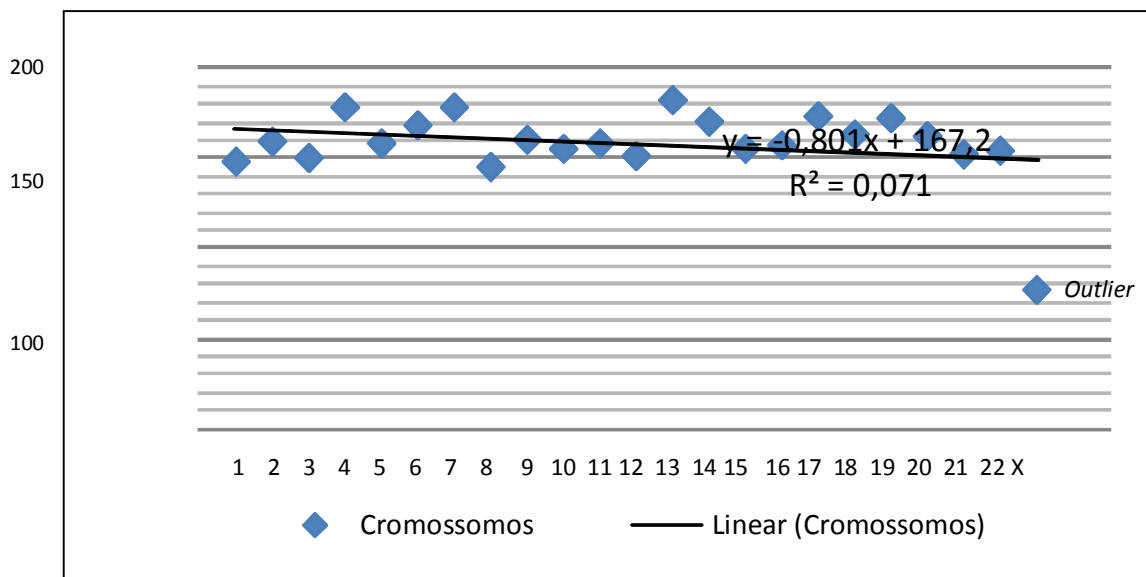


Figura 6. Quantidade total de cromossomos analisados pela técnica de hibridação genômica comparativa em indivíduos com CEC da laringe.

A Figura 7 apresenta o perfil linear do CGH cromossômico em barras, resultante do somatório de todas as metáfases avaliadas. Observe que as regiões com amplificações gênicas ou ganhos cromossômicos estão em destacadas em verde, enquanto que as regiões cromossômicas que apresentam perdas estão evidenciadas em vermelho, de acordo com a metodologia de avaliação cromossômica.

A análise do perfil linear do CGH cromossômico de todos os casos analisados destaca perdas cromossômicas mais intensas do que os ganhos. Neste caso, identificamos o papel expressivo de perdas nas regiões supressoras de tumores.

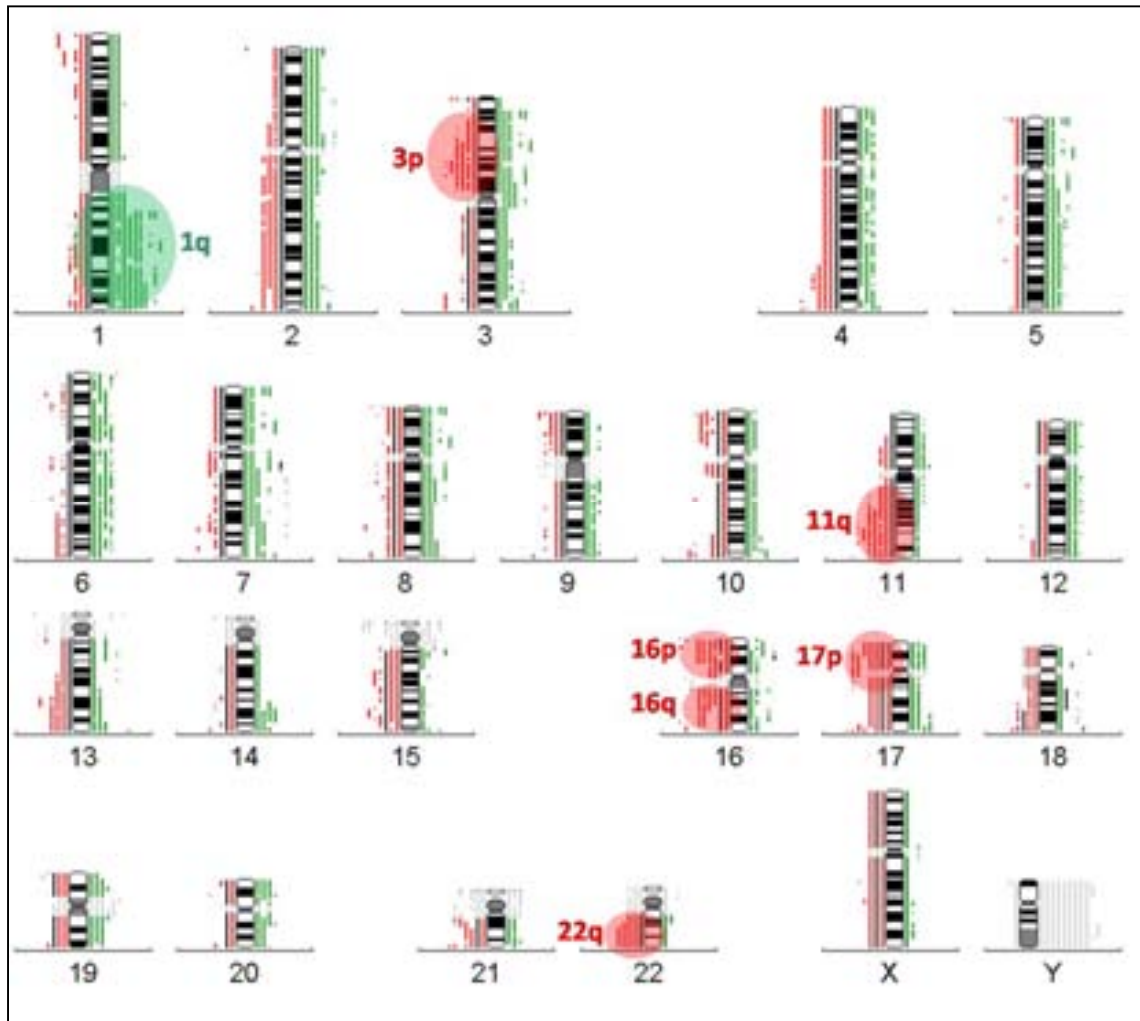


Figura 7. Perfil CGH cromossômico em barras evidenciando as principais regiões com ganhos e perdas cromossômicas dos pacientes com CEC de laringe.

O número de cromossomos específicos avaliados difere quando se compara os pares de homólogos. Nesses casos, os cromossomos que apresentavam sobreposição, depósitos de corantes ou modificações morfológicas resultantes do preparo das amostras ou outros artefatos que dificultaram a sua avaliação, foram desconsiderados no momento da construção do perfil linear do CGH cromossômico. A Tabela VII apresenta as principais regiões gênicas envolvidas nos imbalances cromossômicos dos 20 pacientes com CEC da laringe com os respectivos genes descritos na literatura

Tabela VII. Principais regiões cromossômicas apresentando imbalances observados por CGH cromossômico em pacientes com CEC da laringe.

Imbalance	Região Cromossômica	Gene	Classificação	Órgãos Alvo	Autores
Ganhos	1q21→qter	<i>arg</i>	Oncogenes	Diversos	Chien <i>et al.</i> , 2001
		<i>pbx-1</i>			
Perdas	3p21→p28	<i>FHIT</i>	Supressores tumorais	Laringe	Yuge <i>et al.</i> , 2005
	11q23	<i>ets-1</i>	Proto-Oncogene	Leucemia	Savage <i>et al.</i> , 1987 Stafford <i>et al.</i> , 2008
				Cavidade Oral	Inoue <i>et al.</i> , 2004
	16p16	<i>TMS-1</i>	?	Mama	Conway <i>et al.</i> , 2000
	16q12	<i>Wwox</i>	Supressor tumoral	Laringe	Kuroki <i>et al.</i> , 2002 Aqeilan <i>et al.</i> , 2007
	17p13→pter	<i>p53</i>	Supressor tumoral	Diversos	Russo <i>et al.</i> , 2006 Ronchetti <i>et al.</i> , 2004 Vielba <i>et al.</i> , 2003
22q13	?	?	Laringe	Dos Reis <i>et al.</i> , 2002 Keser <i>et al.</i> , 2008	

Foi considerado a provável classificação em oncogenes (regiões de ganhos) ou supressores tumorais (regiões de perdas) associados aos tumores nos órgãos alvos após consulta no GENE BANK® - Banco de dados do Genoma Humano pertencente à biblioteca Norte Americana.

Os Ganhos Cromossômicos: Proto-oncogenes e Oncogenes no desenvolvimento do carcinoma da laringe

As oncoproteínas são capazes de estimular a proliferação celular mediante diversos mecanismos de controle da divisão celular. A maioria dos oncogenes se origina de proto-oncogenes, que são genes envolvidos nos quatro mecanismos básicos que regulam o crescimento celular normal: (a) fatores de crescimento, (b) receptores dos fatores de crescimento, (c) transdutores de sinal e (d) fatores de transcrição nuclear (INOUE *et al.*, 2004).

Ganhos em 1q21 →qter

CHIEN e colaboradores (2001) ao investigarem os imbalances cromossômicos em 50 pacientes portadores de retinoblastoma encontraram ganhos mais significativos nas regiões de 1q31 (52%) e 6p22 (44%).

A instabilidade cromossômica está associada a esses imbalances e que o mapeamento cromossômico em 1q31 pode ser um fator importante para o desenvolvimento do tumor da retina, sendo um dos eventos subseqüentes à perda do gene *RB*. Nas 20 amostras de CEC da laringe avaliadas neste estudo, observamos 35% (7/20) dos casos apresentaram ganhos na região 1q21 →qter, sendo que aproximadamente, 43% (3/7) dos ganhos foram considerados como ampliações gênicas.

A participação dos oncogenes *arg* e *pbx-1* tem sido descrita em diversos tumores, incluindo câncer de próstata, pulmão, cavidade oral, dentre outros, no entanto, os mecanismos de ação relacionados ao processo de tumorigênese ainda necessitam de maiores esclarecimentos (INOUE *et al.*, 2004).

As Perdas Cromossômicas: Um enfoque na supressão tumoral do Carcinoma das Células Escamosas da laringe

Os genes supressores tumorais codificam proteínas que, normalmente, bloqueiam a proliferação celular descontrolada, que leva ao câncer. Em geral, isto é feito utilizando as diversas vias de regulação do ciclo celular. Mutações no gene *TP53* aparecem na progressão de displasias para lesões pré-invasivas. Adicionalmente, perdas gênicas ocorridas em uma fase mais tardia, como exemplo, deleções em 11q, 13q, 14q e 18q, assim como a redução na ação da proteína p27 (inibidora das CDKs) estão relacionadas a um pior prognóstico na evolução do câncer (INOUE *et al*, 2004).

Perdas em 3p → p28

Os resultados desta avaliação revelam que, dos 12 pacientes (60%) com alterações cromossômicas envolvendo o cromossomo 3, onde 6 pacientes (50%) apresentaram perdas na região do braço curto do cromossomo 3, evidenciando que esta região é uma provável candidata a conter genes supressores tumorais, e que portanto, deve ser melhor investigada.

Segundo YUGE e colaboradores (2005) a perda parcial ou total da região 3p é um evento comum em casos de CEC da laringe. No entanto, apenas o gene *FHIT* tem sido descrito para esta região. O produto deste gene está em pequenas quantidades na situação precursora da lesão. Os autores afirmam o decréscimo na transcrição do gene *FHIT* devido à deleção ou metilação em 42% dos casos de CEC da laringe e em 23% das lesões displásicas. O papel do *FHIT* ainda é pouco conhecido, no entanto, a perda da sua expressão em lesões pré-malignas da laringe tem se tornado cada vez mais evidente.

Perdas em 11q23

Uma grande variedade de neoplasias tem sido associada com anormalidades citogenéticas envolvendo o braço longo do cromossomo 11. Uma quantidade considerável de genes tem sido mapeados em 11q23, incluindo o proto-oncogene *ets-1*. Os mecanismos de ativação do proto-oncogene *ets-1* envolvem aberrações cromossômicas do tipo translocações, deleções ou ampliações (SAVAGE *et al.*, 1987).

Os mecanismos envolvidos na patogênese das neoplasias pela ação do *ets-1* ainda não estão bem conhecidos, por outro lado, assim como nas leucemias, a participação desse proto-oncogene deve ser melhor esclarecida (STAFFORD *et al.*, 2008).

Nesta avaliação, 65% (13/20) dos pacientes apresentaram imbalances cromossômicos envolvendo o cromossomo 11, sendo que, aproximadamente, 47% (6/13) apresentaram deleção na região 11q23, processo descrito como uma possibilidade de ativação do proto-oncogene *ets-1*, que desempenha um papel significativo no processo de tumorigênese.

Perdas em 16p16

Aproximadamente 45% das amostras de CEC de laringe estudadas apresentaram perdas em 16p. Estes achados permitem considerar que a perda de genes desta região pode estar associada às condições que contribuíram para a evolução do tumor. Este fato refere-se à situação em que 37,5% (3/8) dos pacientes apresentam estadiamento IV.

CONWAY e colaboradores (2000) têm descrito a participação da região 16p na etiologia do câncer de mama. O braço curto do cromossomo 16 é portador do *TMS1* (alvo de silenciamento por metilação induzida, do inglês - *target of methylation-induced silencing*).

Neste sentido, a supressão desta região confere uma sobrevida vantajosa para as células escaparem do mecanismo apoptótico, constituindo assim, uma importante via de metilação anormal nos processos de tumorigênese.

Perdas em 16q12

Em 55% dos casos estudados (11/20) foram observados deleções envolvendo o braço longo do cromossomo 16. Apesar de poucos relatos na literatura, seus resultados destacam-se a participação do cromossomo 16 em tumores laríngeos parece ter significado clínico.

AQEILAN e colaboradores (2007) e KUROKI e colaboradores (2002) têm apresentado um supressor tumoral denominado *Wwox*, descrito como o segundo sítio frágil humano mais comum (*FRAX16D*) localizado em 16q23.

O gene *Wwox* codifica uma proteína que contém dois domínios oxidoredutase e outro desidrogenase-redutase, sendo alteradas por deleções ou translocações em diversos tipos de tumores, incluindo câncer de mama, próstata, esôfago, faringe, estômago e carcinoma pancreático.

Perdas em 17p13 → pter

Neste estudo, 4 pacientes (20% de todos os pacientes avaliados) apresentaram perdas envolvendo simultaneamente as regiões 11q e 17p, caracterizando uma associação ocasionada pela hipossuficiência dos produtos gênicos dessas regiões para a perda do controle do ciclo celular. Deleções ou mutações na região 17p podem promover uma perda funcional da proteína p53. As alterações nesta proteína têm sido altamente exploradas por diversos pesquisadores em vários tipos de tumores (VIELBA *et al.*, 2003).

Segundo Inoue e colaboradores (2004) o gene *TP53* codifica uma proteína que quando ligada ao DNA, induz a produção de outras proteínas reguladoras do ciclo celular junto ao complexo das ciclinas G1-CDK2. Portanto, a proteína p53 impede, indiretamente, que a célula progrida no ciclo celular, inclusive a replicação do DNA. Adicionalmente, a proteína p53 inibe a expressão do gene *bcl-2* e promove a síntese da proteína Bax, ou seja, contribui para a morte celular programada ou apoptose. Esta via de regulação da apoptose está apresentada na Figura 8, retratando os principais passos da atividade da proteína p53 e demais supressoras tumorais.

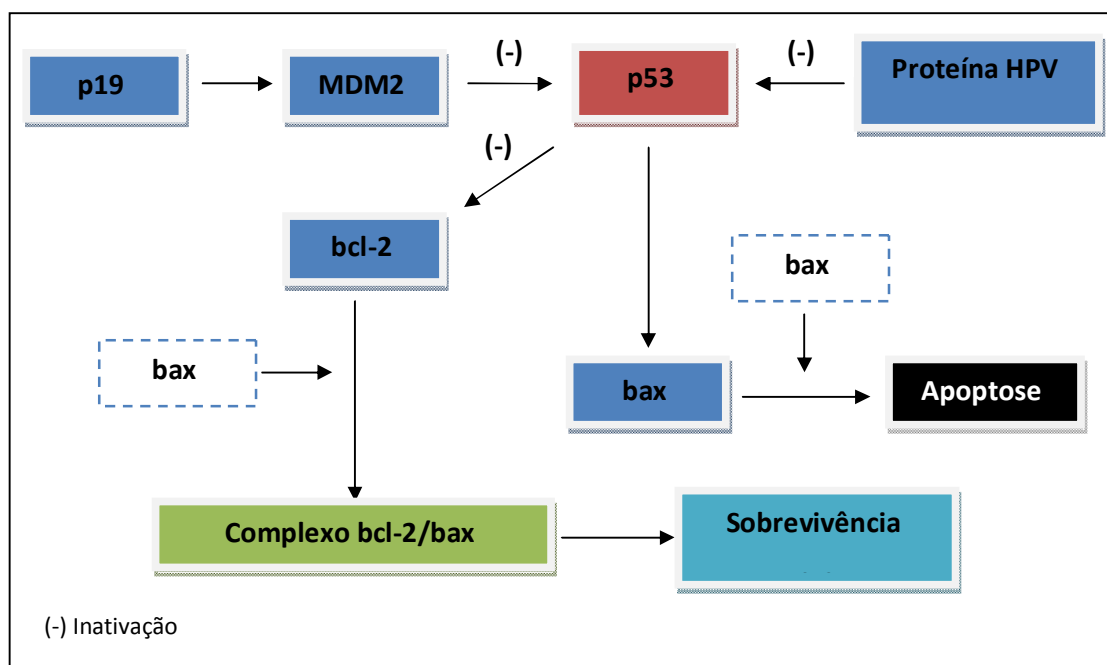


Figura 8. Regulação do mecanismo de apoptose, adaptado por Inoue e colaboradores (2004). O gene *p19* induz a formação da proteína MDM2 que, assim como a proteína viral do HPV E6, é capaz de se ligar e inativar a proteína p53. O produto gênico de *p53* inibe o gene *bcl-2*, o que impede a formação do complexo protéico bcl-2/Bax.

Durante a avaliação dos 20 pacientes portadores do CEC de laringe, foi observado que 8 pacientes (40% de todos os casos estudados) apresentavam perdas na região 17p, onde certamente a produção da proteína p53 poderá estar comprometida. Este achado

evidencia a participação ativa da deleção em 17p em pacientes com carcinoma das células escamosas da laringe.

Perdas em 22q13

Freqüentemente a perda da heterozigose tem sido descrita como um dos importantes passos nos diversos tipos de câncer, incluindo CEC de laringe. Deleções somáticas envolvendo regiões cromossômicas específicas estão fortemente associadas com a inativação de alelos de genes supressores de tumor (Dos Reis *et al.*, 2002).

A presença de supressores tumorais na região 22q tem sido relatada nos estudos de avaliação da tumorigênese em câncer da cavidade oral e laringe. Keser e colaboradores (2008) apresentam novos sítios para a investigação de oncogenes, que potencialmente apresentam evidentes participações na iniciação e progressão dos tumores da laringe.

Os resultados da avaliação dos casos de CEC da laringe evidenciam 40% (8/20) de casos com imbalances cromossômicos envolvendo a região 22q13, sendo que destes 75% (6/8) apresentam perdas cromossômicas

CONCLUSÕES

A natureza multifatorial do CEC da laringe é certamente uma situação de forte evidência. Contudo, os imbalances cromossômicos assumem um papel importante na ativação e inativação dos oncogenes e supressores tumorais, respectivamente. Apesar de que numericamente, os ganhos (63%) cromossômicos superam as perdas (37%), sugerindo um maior número de ativação de oncogenes, quando comparados com a inibição de supressores tumorais. No entanto, esta condição não parece ser correta.

No final, nota-se que os ganhos ocorrem em diversas regiões cromossômicas, de maneira aleatória e sem repetição entre as 20 amostras avaliadas, enquanto que as regiões que apresentaram perdas foram mais seletivas, ocorrendo, na maioria das vezes, na mesma região cromossômica de amostras diferentes, sugerindo maior consistência de que as deleções observadas sejam eventos associados com o processo de tumorigênese. Este fato pode ser claramente observado na Figura 7, onde destaca apenas uma grande região de ganho (1q21→qter) e seis regiões envolvendo perdas cromossômicas (3p21→p28, 11q23, 16p16, 16q12, 17p13→pter e 22q13), caracterizando que as deleções são eventos mais evidentes no CEC da laringe.

As técnicas de hibridação genômica comparativa têm contribuído para melhorar a compreensão das alterações genéticas no carcinoma das células escamosas da laringe para a identificação de regiões genômicas que podem conter oncogenes e genes supressores tumorais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A laringe é um dos sítios anatômicos de maior incidência de tumores epiteliais malignos na região da cabeça e pescoço. No Brasil, ocorreram aproximadamente 2.400 óbitos pela doença no ano de 2000, em sua maioria carcinomas de células escamosas, correspondendo a 2% do total de óbitos por câncer no país. Estima-se que nos Estados Unidos apareçam, aproximadamente, 12.000 casos novos/ano (INOUE *et al.*, 2004).

O fumo é considerado o principal fator predisponente para esta doença, mas também existe uma forte correlação com o álcool. Também existe associação entre o carcinoma de células escamosas e alguns tipos de HPV, principalmente o HPV-11 e HPV-16 (JOHNSTON *et al.*, 1999).

Considerando o número de pessoas expostas ao tabaco, ao álcool e ao HPV, existem poucos casos de laringe. Isto sugere que existam fatores genéticos significativos que influenciam no desenvolvimento neoplásico. As condições genéticas certamente estão associadas a uma maior ou menor susceptibilidade ao aparecimento do câncer na laringe, bem como ao prognóstico destes pacientes. Os possíveis marcadores tumorais estão relacionados às alterações funcionais no nível celular (Mc KAIG *et al.*, 1998).

Como exemplo, com a inativação da proteína p53, há uma maior susceptibilidade ao aparecimento do câncer, pois um dos mecanismos de defesa celular está deficiente. Esta inativação ocorre principalmente por perda da heterozigose e/ou por mutações pontuais. Nos carcinomas de células escamosas da laringe, as mutações mais comuns são, em ordem decrescente, as substituições GC por AT, GC por TA e AT por GC. Adicionalmente, condições de polimorfismo ($p53^{AA}$) associadas à presença de proteínas dos HPVs (E6/E7) aumentam a susceptibilidade ao CEC da laringe (SILVA, 2003).

Em estudos sobre carcinomas epidermóides na laringe, a proteína p53 mutada mostrou-se correlacionada a uma menor sobrevida, sendo que a elevação da p53 mutada está associada à proliferação rápida e maior probabilidade de metástases e recorrência, enquanto que outros estudos demonstraram não haver qualquer significado prognóstico (SPAFFORD *et al.*, 1996).

As diversas condições genéticas responsáveis pelo aparecimento do câncer, geralmente, estão associadas aos genes envolvidos com proteínas que regulam o ciclo, o crescimento e a diferenciação celular: supressores tumorais e oncogenes. A identificação de marcadores relacionados ao risco de disseminação regional e à distância, seria de grande auxílio no planejamento terapêutico. Além disso, podem proporcionar uma melhor compreensão da doença e conseqüentemente o desenvolvimento novas abordagens terapêuticas (HARRIS *et al.*, 1991).

Nesta avaliação genético-molecular de indivíduos diagnosticados com carcinoma das células escamosas da laringe, considerando a presença do genoma de HPV, polimorfismo de susceptibilidade do gene *p53*, instabilidade genômica – LOH e MIS e regiões de imbalances cromossômicos, associados ao quadro clínico, etnia, sexo, história individual de exposição aos fatores ocupacionais, ambientais e hábitos de vida.

Em relação ao polimorfismo no gene *TP53*, os resultados foram 65% de homozigotos *p53^{AA}* e 35% de heterozigotos *p53^{PA}*. Em 20% dos pacientes foi observada a presença de genoma HPV associada às células tumorais, tendo sido genotipados os subtipos virais HPV 16, HPV 11 e 45 como co-infecção. Os dois casos positivos para HPV apresentaram genótipo homozigoto para arginina em *TP53*. Os resultados deste estudo corroboram os dados publicados na literatura pertinente, que correlacionam a susceptibilidade aumentada para

CEC da laringe em indivíduos homozigotos para $p53^{AA}$ e a maior susceptibilidade destes à carcinogênese vírus-induzida. Por outro lado, a presença de genoma HPV 11 em células da laringe acentua o papel deste subtipo viral nas lesões neoplásicas do epitélio laríngeo.

Apesar do uso de marcadores de microssatélites ter-se demonstrado uma importante ferramenta na investigação de perdas e ganhos alélicos, como fatores que predispõe a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor, algumas considerações devem observadas.

Amostras de pacientes com CEC da laringe usualmente apresentam uma alta heterogeneidade de imbalances cromossômicos. Contudo, poucos imbalances são comumente detectados por CGH, podendo ser correlacionados aos marcadores tradicionais de instabilidade genômica, como LOH e MIS. Nesta avaliação, do painel de oito marcadores polimórficos, recomendados para a investigação em tumores da laringe, não houve nenhuma correlação com os resultados obtidos por CGH.

Neste sentido, a análise prévia dos imbalances cromossômicos se torna viável e indispensável. Os marcadores tumorais identificados até o momento têm aplicação clínica limitada. Não apenas a diversidade observada no comportamento biológico dos tumores, em diferentes subsítios anatômicos e em diferentes estadiamentos, mas também a diversidade encontrada nos pacientes explica a dificuldade para identificar bons marcadores tumorais quanto ao prognóstico e evolução da doença.

Os resultados mostram que nas regiões 8p21 e 8p22 foram encontradas 20% de MIS, em ambas, e 5% de LOH para 8p21. Para as regiões 17q22 e 11p15 foi observada as mesmas frequências de MIS, 30%. Foram encontrados ainda, 20% de LOH e 5% de MIS em 3p13 e

30% de LOH correspondente a região 9p21. Para a região 17p13.1 observou-se que 20% de LOH e 35% de MIS.

A alta frequência de MIS observada sugere que a carcinogênese do CEC da laringe segue o mecanismo de fenótipo mutante. Metodologias com maior poder de screening genômico devem ser incorporadas como ferramentas adicionais na estimativa do prognóstico da progressão tumoral e, conseqüentemente, na melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

Os resultados da análise por CGH mostram que as principais regiões de ganhos foram observadas em 1q21→qter, enquanto que as perdas cromossômicas ocorreram em 3p21→p28, 11q23, 16p16, 16q12, 17p13→pter e 22q13.

Em 1q21→qter pode apresentar vários fatores importantes para o desenvolvimento de tumores. Nesta região encontram-se os oncogenes: *arg* e *pbx-1*. Um aumento na expressão desses genes tem sido fortemente associado com o aparecimento de neoplasias.

Na região 3p21→p28 destaca-se o gene supressor de tumor *FHIT*. Apesar de o seu papel ser pouco conhecido, o decréscimo na transcrição do gene *FHIT* devido à deleção ou metilação em lesões pré-malignas da laringe tem se tornado cada vez mais evidente.

No cromossomo 16, em 16p16 e 16q12, destacam-se os genes supressores tumorais *TMS-1* e *Wwox*, respectivamente. Descritos mais recentemente, porém a perda na expressão de *TMS-1* pode estar associada às condições que contribuem para a evolução do tumor. Este fato refere-se à situação em que 37,5% dos pacientes com CEC de laringe apresentam estadiamento IV. Adicionalmente, o gene *Wwox*, supressor tumoral presente na região 16q12, codifica uma proteína que contém dois domínios oxidoredutase e outro desidrogenase-redutase. Alterações na proteína *Wwox* têm sido descrita em diversos tipos

de tumores, incluindo câncer de mama, próstata, esôfago, faringe, estômago e carcinoma pancreático.

As técnicas de hibridação genômica comparativa têm contribuído para melhorar a compreensão das alterações genéticas no carcinoma das células escamosas da laringe, sobretudo para a caracterização da relação entre estágios precursores de câncer laríngeo, assim como, para a identificação de regiões genômicas que podem conter oncogenes e genes supressores tumorais.

Deste modo, o melhor entendimento dos papéis dos genes supressores de tumor e dos oncogenes nos mecanismos relacionados com os processos de diferenciação celular, vem a contribuir no melhor entendimento da gênese dos tumores de cabeça e pescoço, sobretudo no carcinoma das células escamosas da laringe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCG - Associação de Combate ao Câncer em Goiás. 1995. Câncer em Goiânia: Incidência e Mortalidade (1988-1993). ACCG, Goiânia. p. 77.
- ALMADORI G.; GALLI J.; CADONI C. 2002. Human Papillomavirus infection and cyclin D1 gene amplification in laryngeal squamous cell carcinoma: biologic function and clinical significance. *Head and Neck*. 24(6): 597-04.
- ALVAREZ I.A.; LAZO O.S.; GONZALEZ S.R.; TAPIA P.R.; BATALLA F.N.; NIETO C.S. 1997. Using Polymerase Chain Reaction to Human Papillomavirus. In: Oral and Pharyngolaryngeal Carcinomas. *American Journal of Otolaryngology*. 18(06):375-81.
- ANDERSON M.W.; REYNOLDS S.H.; YOU M.; MARONPOT R.M. 1992. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* (98):13-24.
- ANKATHIL R.; MATHEW A.; JOSEPH F.; NAIR M.K. 1996. Is oral cancer susceptibility inherited? Report of five oral cancer families. *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.* 32B(1):63-67.
- AQEILAN R.I.; TRAPASSO T.; HUSSAIN S.; COSTINEAN S.; MARSHALL D.; PEKARSKY Y.; HAGAN J.P.; ZANESI N.; KAOU M.; STEIN G.S.; LIAN J.B.; CROCE C.M. 2007. Targeted deletion of *Wwox* reveals a tumor suppressor function. *PNAS* 104(10): 3949-54.
- AUSTIN D.F. & REYNOLDS P. 1996. Laryngeal Cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni JR: *Cancer Epidemiology and Prevention*, 2ed. Oxford University Press, New York. p.619-36.
- BAI S.; FEI S.; ZHANG X. 1998. Loss of heterozygosity on chromosome RB1.20 locus and p110RB1 protein state in squamous cell carcinomas of larynx. *Cancer Research*. 33(2):110-12.
- BENHAMOU S.; BOUCHARDY C.; PAOLETTI C.; DAYER P. 1996. Effects of CYP2D6 activity and tobacco on larynx cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomark. Prev.* (5):683-86.

- BIBBO M. & SILVA-FILHO A.M. 1998. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. In Villa, L.L. (Eds). Aspectos moleculares da oncogênese por Papilomavirus. Revinter. p58.
- BLOT W.J.; MCLAUGHLIN J.K.; WINN D.M.; AUTIN D.F.; GREENBERG R.S.; PRESTON MARTIN S.; BERNSTEIN L.; CHOENBERG J.B.; STEMHAGEN A.; FRAUMENI J.F. 1988. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Research*. (48):3282-87.
- BOCKMUHL U.; ISHWAD C.S.; FERRELL R.E.; GOLLIN S.M. 2001. Association of 8p23 deletions with poor survival in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 124(4):451-5.
- BOFFETTA P.; GRIDLEY G.; GUSTAVSSON P.; BRENNAN P.; BLAIR A.; EKSTROM A.M.; FRAUMENI J.F. 2000. Employment as butcher and cancer risk in a record-linkage study from Sweden. *Cancer Causes Control*. 11(7):627-33.
- BONDY M.L.; SPITZ M.R.; HALABI S.; FUEGER J.J.; SCHANTZ S.P.; SAMPLE D.; HSU T.C. 1993. Association between family history of cancer and mutagen sensitivity in upper aerodigestive tract cancer patients. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* (2):103-06.
- BOSCH F.X.; MANOS M.; MUÑOZ N.; SHERMAN M.; JANSEN A.M.; PETO J.; SCHIFFMAN M.H.; MORENO V.; KURMAN R.; SHAH K.V. 1995. Prevalence of Human Papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* (87):796-02.
- BOSCH F.X.; MUÑOZ N.; DE SANJOSÉ S.; NAVARRO C.; MOREO P.; ASCUNCE N.; GONZALEZ L.C.; TAFUR L.; GILI M.; LARRAÑAGA I.; VILADIU P.; DANIEL R.W.; ALONSO DE RUIZ P.; ARISTIZABAL N.; SANTAMARIA M.; GUERRERO E.; SHAH K.V. 1993. Human Papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ: A case-control study in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* (2):415-22.

- BOUDA M.; GORGOULIS V.G.; KASTRINAKIS N.G.; GIANNOUDIS A.; TSOLI E.; DANASSI-AFENTAKI D.; FOUKAS P.; KYROUDI A.; LASKARIS G.; HERRINGTON C.S.; KITTAS C. 2000. "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod. Pathol.* 13(6):644-53.
- BUNDGAARD T.; BENTZEN S.M.; WILDT J.W. 1995a. Consumption of tobacco and alcohol as prognostic factors in oral cancer. *Ugeskr Laeger.* 157(35):4819-22.
- BUNDGAARD T.; WILDT J.; FRYDENBERG M.; ELBROND O.; NIELSEN J.E. 1995b. Case-control study of squamous cell cancer of the oral cavity in Denmark. *Cancer Causes Control.* 6(1):57-67.
- CAIRNS J. 1995. The cost of prevention. *BMJ.* 311(7019):15-20.
- CALVERT G.M.; WARD E.; SCHNORR T.M.; FINE L.J. 1998. Cancer risks among workers exposed to metalworking fluids: a systematic review. *Am J Ind Med.* 33(3):282-92.
- CASON J.; KAYE J.N.; BEST J.M. 1995. Non-sexual acquisition of human genital papillomaviruses. *Papillomavirus Report.* (6):01-07.
- CEROVAC Z.; SARCEVIC B.; KRALJ Z.; BAN J. 1996. Detection of Human Papillomavirus (HPV) Type 6, 16 and 18 in head and neck squamous cell carcinomas by In Situ Hybridization. *Neoplasma,* 43(4):185-94.
- CHIEN G.; YUEN P.W.; KWONG D.; KWONG Y.L. 2001. Comparative genomic hybridization analysis of nasopharyngeal carcinoma: consistent patterns of genetic aberrations and clinicopathological correlations. *Cancer Genet Cytogenet.* (126): 63-67.
- CONWAY K.E.; MCCONNELL B.B.; BOWRING C.E.; DONALD C.D.; WARREN S.T.; VERTINO P.M. 2000. TMS-1, a Novel Proapoptotic Caspase Recruitment Domain Protein, Is a Target of Methylation-induced Gene Silencing in Human Breast Cancers. *Cancer Research* (60):6236-42.

- COTRAN R.S.; KUMAN V.; ROBBIN S.L. 1989. Pathologic basis of disease. WB Saunders Comapny, Philadelphia. p824.
- D’COSTA J.; SARANATH D.; DEDHIA P.; SANGHVI V.; MEHTA A.R. 1998. Detection of HPV-16 Genome in Human Oral Cancers and Potentially Malignant Fron Índia. Oral Oncology. (34):413-20.
- da CRUZ A.D.; MCARTHUR A.G.; da SILVA C.C.; CURADO M.P.; GLICKMAN B.W. 1994. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking and Cesium-137 dose in the Goiânia (Brazil) radiological accident. Mutation Res. (313):57-68.
- DE STEFANI E.; CORREA P.; OREGGIA F.; LEIVA J.; RIVERO S.; FERNANDEZ G.; DENEOPELLEGRINI H.; ZAVALA D.; FONTHAM E. 1987. Risk factors for laryngeal cancer. Cancer. (60):3087-91.
- DE STEFANI E.; DENEOPELLEGRINI H.; MENDILAHARSU M.; RONCO A. 1999. Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract--I. Foods. Oral Oncol. 35(1):17-21.
- DE STEFANI E.; OREGGIA F.; RIVERO S.; FIERRO L. 1992. Hand-rolled cigarette smoking and risk of cancer of the mouth, pharynx, and larynx. Cancer. (70):679-82.
- DIAS F.L.; KLIGERMAN J.; CERVANTES O.; TAVARES M.R.; CARVALHO M.B.; FREITAS E.Q. 2001. Diagnóstico e tratamento do câncer da laringe – Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. p14.
- DOS REIS P.P.; POLI-FREDERICO R.C.; DOS SANTOS R.M.; NISHIMOTO I.N.; KOWALSKI L.P.; ROGATTO S.R. 2002. Distinct regions of loss of heterozygosity on 22q in different sites of head and neck squamous cell carcinomas. Med Sci Monit. 8(3):BR89-94.
- EINSTEIN M.H. & GOLDBERG G.L. 2002. Human Papillomavirus and cervical neoplasia. Cancer Invest. 20 (7-8):1080-85.

- ELUF-NETO J.; BOOTH M.; MUÑOZ N.; BOSCH F.X.; MEIJER C.J.L.M.; WALBOOMERS J.M.M. 1994. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br. J. Cancer.* (69):114-19.
- FERREIRA C.G. & ROCHA J.C. 2004. *Oncologia Molecular.* São Paulo: Atheneu. p456.
- FOULKES W.D.; BRUNET J.S.; KOWALSKI L.P.; NAROD A.S.; FRANCO E.L. 1995. Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: A case-control study. *Int. J. Cancer.* (63):769-73.
- FRANCESCHI S.; MUÑOZ N.; BOSCH F.X.; SNIJDERS P.J.F.; WALBOOMERS J.M.M. 1991. Nutrition and cancer of the oral cavity and pharynx in North-East Italy. *Int. J. Cancer.* (47):20-25.
- FRANCESCHI S.; MUÑOZ N.; BOSCH F.X.; SNIJDERS P.J.F.; WALBOOMERS J.M.M. 1996. Human papillomavirus and cancers of upper aerodigestive tract: A review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* (5):567-75.
- FRANCO E.L.; VILLA L.L.; SOBRINHO J.P.; PRADO J.M.; ROUSSEAU M.C.; DESY M.; ROHAN T.E. 1999. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J. Infect. Dis.* 180(5):1415-23.
- GOLDSTEIN A.M.; BLOT W.J.; GREENBERG R.S.; SCHOENBERG J.B.; AUSTIN D.F.; PRESTON-MARTIN S.; WINN D.M.; BERNSTEIN L.; MCLAUGHLIN J.K.; FRAUMENI J.F. 1994. Familial risk in oral and pharyngeal cancer. *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.* 30B(5):319-22.
- GOLLIN S.M. 2001. Chromosomal alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck: window to the biology disease. *Head Neck.* (23):238-44.

- GUBERAN E.; USEL M.; RAYMOND L.; FIORETTA G. 1993. Mortality and incidence of cancer among a cohort of self employed butchers from Geneva and their wives. *Br. J. Ind. Med.* 50(11):1008-16.
- HA CUBIE A. 2001. Rapid real time PCR to distinguish between high risk human papillomavirus types 16 and 18. *Clin Pathol: Mol Pathol.* (54):24-9.
- HARRIS C.C. 1987. Tobacco smoke and lung disease: Who is susceptible? *Ann. Intern. Med.* (105):607-09.
- HARRIS C.C. 1991. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res. suppl.* (51): 5023-44.
- HOLLSTEIN M.; SIDRANSKY D.; VOGELSTEIN B.; HARRIS C.C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science.* 253(5015):49-53.
- IARC. 1986. Tobacco smoking. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, International Agency For Research on Cancer. Lyon. (38):122-34.
- IARC. 1988. Alcohol drinking. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, International Agency For Research on Cancer. Lyon. (44):112-22.
- IARC. 1992. Occupational exposures to mists and vapours from sulfuric acid and other strong inorganic acids and other industrial chemicals. In: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, International Agency For Research on Cancer. Lyon. (54):119-23.
- IARC. 1995. Human Papillomaviruses. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, International Agency For Research on Cancer. Lyon. (64):152-64.
- INCA/MS. 2005. Instituto Nacional do Câncer / Ministério da Saúde. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro. p232.

- INOUE D.P.; AMAR A.; CERVANTES O. 2004. Marcadores tumorais no câncer da laringe. *Rev. Bras. Cir. Pesc.* (34):07-14.
- JAMES L. & VARLEY J. 1996. Preparation, labelling and detection of DNA from archival paraffin-embedded tumor samples. *Am. J. Pathol.* (145): 1301-08.
- JARMUZ M.; SZYFTER K.; GRENMAN R.; GOLUSINSKI W.; SZYFTER W. 2000. Usefulness of chromosome alteration analysis in cell lines derived from laryngeal tumors for evaluation of laryngeal neoplasms. *Otolaryngol Pol.* 54(5):567-72.
- JIN C.; JIN Y. 2006. Laryngeal squamous cell carcinoma. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* p65.
- JIN Y.; MERTENS F.; JIN C.; AKERVALL J.; WENNENBERG J.; GORUNOVA L. 1995. Nonrandom chromosome abnormalities in short-term cultured primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* (55):3204–10.
- JOHNSTON D.; HALL H.; DI LORENZO T.P.; STEINBERG B.M. 1999. Elevation of the epidermal growth factor receptor and dependent signaling in human papillomavirus-infected laryngeal papillomas. *Cancer Res.* (59):968-74.
- KALLIONIEMI A.; KALLIONIEMI O.P.; SUDAR D.; RUTOVITZ D.; GRAY J.W.; WALDMAN F.; PINKEL D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetics analysis of solid tumors. *Science.* (258):818-21.
- KARLSEN F.; KALANTARI M.; JENKINS A.; PETTERSEN E.; KRISTENSEN G.; HOLM R.; JOHANSSON B.; HAGMAR B. 1996. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of Human Papillomavirus. *J. Clinical Microbiol.* 34(09):2095-00.
- KE L.D.; ADLER-STORHIZ K.; MITCHELL M.F.; CLAYMAN G.L.; CHEN Z. 1999. Expression of Human Papillomavirus E7 mRNA in human oral and cervical neoplasia and cell lines. *Oral Oncology* (35):415-20.

- KESER I.; TORAMAN A.D.; OZBILIM G.; GUNEY K.; LULECI G. 2008. DNA gains and losses of chromosome in laryngeal squamous cell carcinoma using comparative genomic hybridization. *Yonsei Med J.* 31;49(6):949-54.
- KOUTSKY L. 1997. Epidemiology of genital Human Papillomavirus infection. *Am. J. Medicine*, (102):03-08.
- KOWALSKI L.P.; MIGUEL R.E.V.; ULBRICH F.S. 2000. In: *A Atuação da Fonoaudiologia no Câncer de Cabeça e Pescoço*. São Paulo: Lovise. p112.
- KUJAWSKI M.; ALTO Y.; JASKULA-SZTUL R.; SZYFTER W.; SZMEJA Z.; SZYFTER K.; KNUUTILA S. 1999. DNA copy number losses are more frequent in primary larynx tumors with lymph node metastases than in tumors without metastases. *Cancer Genet Cytogenet.* 114(1):31-34.
- KUROKI T.; TRAPASSO F.; SHIRAISHI T.; ALDER H.; MIMORI K.; MORI M.; CROCE C.M. 2002. Genetic Alterations of the Tumor Suppressor Gene WWOX in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research.* (62):2258-60.
- LA VECCHIA C.; LUCCHINI F.; NEGRI E.; BOYLE P.; MAISONNEUVE P.; LEVI F. 1992. Trends of cancer mortality in Europe, 1955-1989: I. Digestive sites. *Eur. J. Cancer.* (28):132-35.
- LAZARUS P. & PARK J.Y. 2000. Metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncology.* 36(5): 421-31.
- MADEN C.; BECKMANN A.M.; THOMAS D.B.; MCKNIGHT B.; SHERMAN K.J.; ASHLEY R.L.; COREY L.; DALING J.R. 1992. Human papillomaviruses, herpes simplex viruses, and the risk of oral cancer in men. *Am. J. Epidemil.* (135):1093-02.
- MAIER H.; TISCH M.; ENDERLE G.; DIETZ A.; WEIDAUER H. (1997. Occupational exposure to paint, lacquer and solvents, and cancer risk in the area of the upper aero-digestive tract. *HNO.* 45(11):905-08.

- MALAUGHLIN J.K.; GRIDLEY G.; BLOCK G.; WINN D.M.; PRESTON-MARTINS S.; SCHOEMBERG J.B.; GREENBERG R.S.; STEMHAGEN A.; AUSTIN D.F.; ERSHOW A.G.; BLOT W.J.; FRAUMENI J.F. 1988. Dietary factors in oral and pharyngeal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* (80):1237-43.
- MARCZYNSKI B.; KRAUS T.; ROZYNEK P.; RAITHEL H.J.; BAUR X. 2000. Association between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in DNA of workers highly exposed to asbestos and their clinical data, occupational and non-occupational confounding factors, and cancer. *Mutat Res.* 468(2):203-12.
- MARTIN M. 2003. Real-Time PCR-Based System For Simultaneous Quantification Of Human Papillomavirus Types Associated With High Risk Of Cervical Cancer *Journal of clinical Microbiology.* p3228.
- MATZOW T.; BOYSEN M.; KALANTARI M.; JOHANSSON B.; HAGMAR B. 1998. Low detection rate of HPV in oral and laryngeal carcinomas. *Acta Oncologica.* 37(01):73-9.
- MCKAIG, R.G.; BARIC, R.S.; OLSHAN, A.F. 1998. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head and Neck.* 20 (3):250-65.
- MERRITT W.D.; WEISSLER M.C.; TURK B.F.; GILMER T.M. 1990. Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 116(12):1394-8.
- MEYER T.; ARNDT R.; STOCKFLETH E.; FLAMMANN H.T.; WOLF H.; REISCHL U. 1995. Strategy for typing human papillomaviruses by RFLP analysis of PCR products and subsequent hybridization with a generic probe. *Biotechniques.* 19(4):632-9.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2004. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA. p254.

- MIRACCA E.C.; YAMAMOTO L.; CONTADO D.; SILVA T.M.S.; KOWALSKI L.P.; NAGAI M.A. 2000. Distinct chromosomal deleted regions defining different subsets of head and neck tumors. *Diagn. Mol Pathol.* 9(4):229-33.
- MITELMAN F. 2000. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res.* (462): 247–53.
- MOY R.L.; ELIEZRI Y.D.; NUOVO G.J.; ZITELLI J.Á.; BENNETT R.G.; SILVERSTEIN S. 1989. Human papillomavirus type 16 DNA in periungueal squamous cell carcinoma. *J. Am. Med. Assoc.* (261):2669-74.
- MUÑOZ N.; BOSCH F.X.; DE SANJOSÉ S.; TAFUR L.; IZARZUGAZA I.; GILI M.; VILADIU P.; NAVARRO C.; MARTOS C.; ASCUNCE N.; GONZALEZ L.C.; KALDOR J.M.; GUERRERO E.; LÖRINCZ A.; SANTAMARIA M.; ALONSO DE RUIZ P.; ARISTIZABAL N.; SHAH K. 1992. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: A population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int. J. Cancer.* (52):743-49.
- NAWROZ H.; VAN DER RIET P.; HRUBAN R.H.; KOCH W.; RUPPERT J.M.; SIDRANKY D. 1994. Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* (54):1152-55.
- NEGRI E.; FRANCESCHI S.; BOSETTI C.; LEVI F.; CONTI E.; PARPINEL M.; LA VECCHIA C. 2000. Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer. *Int. J. Cancer.* 86(1):122-27.
- NIV A.; SION-VARDI N.; GATOT A.; NASH M.; FLISS D.M. 2000. Carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *J. Laryngol. Otol.* 114(1):41-6.
- NODA T.; SASAGAWA T.; DONG Y.; FUSE H.; NAMIKI M.; INOUE M. 1998. Detection of Human Papillomavirus (HPV) DNA. In: *Archival Specimens of Benign Prostatic Hyperplasia and Prostatic Cancer Using a Highly Sensitive Nested PCR Method.* *Urol. Res.*(23):123-28.

- NORONHA M.JR. & DIA F.L. 1997. Câncer da laringe: uma abordagem multidisciplinar. Revinter. Rio de Janeiro. p197.
- OGURA H.; WATANABE S.; FUKUSHIMA K.; MASUDA Y.; FUJIWARA T.; YABE Y. 1993. Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinomas of the respiratory and upper digestive tracts. Jpn. J. Clin. Oncol. (23):221-25.
- OLIVEIRA M.P.V. 2005. Implicações do Polimorfismo do Códon 72 do Gene p53 no Carcinoma Laríngeo. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. p150.
- OWENS W.; FIELD J.K.; HOWARD P.S.; STELL P.M. 1992. Multiple cytogenetic aberrations in squamous cell carcinomas of the head and neck. Eur J Cancer Oral Oncol. (28B):17-22.
- PAPADIMITRAKOPOULOU V.A. 2000. Carcinogenesis of head and neck cancer and the role of chemoprevention in its reversal. Curr Opin Oncol. (12):240–45.
- PARKIN D.M.; PISANI P.; FERLAY J. 1993. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. Int. J. Cancer. (54):594-06.
- PARKIN D.M.; WHELAN S.L.; FERLAY J.; RAYMOND L.; YOUNG J. 1997. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. II. IARC Scientific Publications no. 143. International Agency for Research on Cancer. Lyon. (32):125-33.
- PINTOS J.; FRANCO E.L.; OLIVEIRA B.V.; KOWALSKI L.P.; CURADO M.P.; DEWAR R. 1994. Mate, coffee, and tea consumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Southern Brazil. Epidemiology. (5):583-90.
- PIPER J.; RUTOVITZ D.; SUDAR D.; KALLIONIEMI A.; KALLIONIEMI O.P.; WALDMAN F.M.; GRAY J.W.; PINKEL D. 1995. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. Cytometry. (19):10-26.
- PISANI P.; PARKIN D.M.; FERLAY J. 1993. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. Int. J. Cancer. (55):891-03.

- POU A.M.; RIMELL F.L.; JORDAN J.Á.; SHOEMAKER D.L.; JOHNSON J.T.; BARUA P.; POST J.C.; EHRLICH G.D. 1995. Adult respiratory papillomatosis: Human papillomavirus type and viral coinfections as predictors of prognosis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* (104):758-62.
- RASMUSSEN T.; HUDLEBUSCH H.R.; KNUDSEN L.M.; JOHNSEN H.E. 2002. FGFR3 dysregulation in multiple myeloma: frequency and prognostic relevance. *Br J Haematol.* 117(3):626-28.
- RIHKANEN H.; PELTOMAA J.; SYRJANEN S. 1994. Prevalence of human papillomavirus (PVH) DNA in vocal cords without laryngeal papilomas. *Acta Otolaryngol. Stockh.* (114):348-51.
- RONCHETTI D.; NEGLIA C.B.; CESANA B.M.; CARBONI N.; NERI A.; PRUNERI G.; PIGNATARO L. 2004. Association between p53 gene mutations and tobacco and alcohol exposure in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* (130):303-06.
- RUSSO A.; CORSALE S.; AGNESE V.; MACALUSO M.; CASCIO S.; BRUNO L.; SURMACZ E.; DARDANONI G.; VALERIO M.R.; VIENI S.; RESTIVO S.; FULFARO F.; TOMASINO R.M.; GEBBIA N.; BAZAN V. 2006. TP53 mutations and S-phase fraction but not DNA-ploidy are independent prognostic indicators in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Cell Physiol.* (206):181-88.
- SANTOS O.S.N.; ROMANOS V.T.M.; WIGG D.M. 2002. Introdução à virologia humana. In: ROMANOS, M.T.V.; SANTOS, N.S.O.; MIRANDA, M.M.F.S. (Eds). *Virose oncogênicas*. Guanabara Koogan. p204.
- SASIADEK M.; STEMBALSKA-KOZLOWSKA A.; SMIGIEL R.; KRECICKI T.; BLIN N.; MIRGHOMIZADEH F. 2001. Microsatellite and chromosome instability in squamous cell laryngeal carcinoma. *Int J Oncol.* 19(2):401-5.

- SAVAGE P.D.; HANSON C.A.; KERSEY J.H. 1987. Identification of a restriction fragment length polymorphism involving the oncogene ETS-1 on chromosome 11q23. *Blood*. (70):327-29.
- SCHLADE-BARTUSIAK K.; STEMBALSKA A.; RAMSEY D. 2005. Significant involvement of chromosome 13q deletions in progression of larynx cancer, detected by comparative genomic hybridization. *J Appl Genet*. 46(4): 407-13.
- SCHWARTZ S.M.; MAO E.J.; BECKMANN A.M.; TICKMAN E.; FITZGIBBONS D.; DOODY D.; ASHLEY R.L.; DALING JR. 1995. Sexual history, human papillomavirus and herpes simplex virus infection, and oral cancer risk: Preliminary results from a population-based study. Abstract presented at the 14th International Papillomavirus Conference. p58.
- SIDRANSKY D. 1997. Cancer of the head and neck. In: DeVita VT, Jr Hellman S, Rosenberg AS (eds) *Cancer: Principles and Practice of Oncology 5ed*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. p740.
- SILVA, A.M.T.C. 2003. Avaliação Epidemiológica do Câncer da Laringe na população de Goiânia no período de 1988 a 1998. Registro de Câncer de Base Populacional do Hospital Araújo Jorge – Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Goiânia, Goiás: Universidade Federal de Goiás. p148.
- SOMERS K.D.; MERRICK M.A.; LOPEZ M.E.; INCOGNITO L.S.; SCHECHTER G.L.; CASEY G. 1992. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer Res*. 52(21):5997-00.
- SOUTO R.; FALHARI J.P.B.; DA CRUZ A.D. 2005. O Papilomavirus Humano: Um Fator Relacionado Com a Formação de Neoplasias. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 51(2):155-60.
- SPAFFORD M.F.; KOEPPE J.; PAN Z.; ARCHER P.G.; MEYERS A.D.; FRANKLIN W.A. 1996. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with

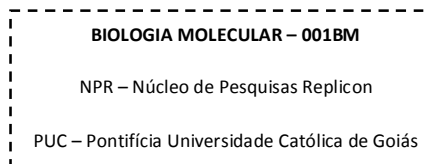
survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* (122):627-32.

- SPECTOR D.L.; GOLDMAN R.D.; LEINWAND L.A. 1998. Comparative genomic hybridization. In: *Sub cellular Localization of Genes and their Products. Cells. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. (3):112.1-11.
- SPITZ M.R.; HOQUE A.; TRIZNA Z.; SCHANTZ S.P.; AMOS C.I.; KING T.M.; BONDY M.L.; HONG W.K.; HSU T.C. 1994. Mutagen sensitivity as a risk factor for second malignant tumors following malignancies of the upper aerodigestive tract. *J. Natl. Cancer Inst.* (86):1681-84.
- STAFFORD N.D.; FRACS MB; ASHMAN J.N.E.; MACDONALD A.W.; ELL S.R.; MONSON J.R.T.; GREENMAN J. 2008. Genetic Analysis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Surrounding Mucosa. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* (125):1341 – 48.
- STICH H.F. & ROSIN M.P. 1983. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int. J. Cancer.* (31):305-08.
- STICH H.F.; CRUTIS R.; PARIDA B.B. 1982. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: Tobacco Chewers. *Int. J. Cancer.* (30):553-59.
- STOREY A.; THOMAS M.; KALITA A.; HARWOOD C.; GARDIOL D.; MANTOVANI F.; BREUER J.; LEIGH I.M.; MATLASHEWSKI G.; BANKS L. 1998. Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated cancer. *Nature.* (393):229-34.
- STRUSKI S.; DOCO-FENZY M.; CORNILLET-LEFEBRVE P. 2002. Compilation of published comparative genomic hybridization studies. *Cancer Genet. Cytogenet.* (135):63–90.

- SUNWOO J.B.; HOLT M.S.; RADFORD D.M.; DEEKER C.; SCHOLNICK S.B. 1996. Evidence for multiple tumor suppressor genes on chromosome arm 8p in supraglottic laryngeal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 16(3):164-69.
- TAVANI A.; LA VECCHIA C.; GALLUS S.; LAGIOU P.; TRICHOPOULOS D.; LEVI F.; NEGRI E. 2000. Red meat intake and cancer risk: a study in Italy. *Int J. Cancer*. 86(3):425-28.
- THOMPSON T.C.; TIMME T.L.; KADMON D.; PARK S.H.; EGAWA S.; YOSHIDA K. 1993. Genetic predisposition and mesenchymal-epithelial interactions in ras+myc-induced carcinogenesis in reconstituted mouse prostate. *Mol. Carcinog*. 7(3):165-79.
- TOLBERT P.E.; SHY C.M.; ALLEN J.W. 1991. Micronuclei and other nuclear anomalies. In: *Buccal Smears: A Field Test in Snuff Users*. *Am. J. Epidemiol.* (134):840-50.
- TRIZNA Z. & SCHANTZ S.P. 1992. Hereditary and environmental factors associated with risk and progression of head and neck cancer. *Otolaryngol. Clin. North Am.* (25):1089-03.
- VIELBA R.; BILBAO J.; ISPIZUA A.; ZABALZA I.; ALFARO J.; REZOLA R.; MORENO E.; ELORRIAGA J.; ALONSO I.; BAROJA A.; DE LA HOZ C. 2003. p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* (113): 167-72.
- VILLA L.L.; CABALLERO O.L.; LEVI J.E.; PENA S.D.; SIMPSON A.J. 1995. An approach to human papillomavirus identification using low stringency single specific primer PCR. *Mol. Cell Probes.*, 9(1):45-48.
- WATTS S.L; BREWER E.E; FRY T.L. 1999. Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral Med. Oral Pathol.*, (71):701-07.
- WCRF/AIRC. 1997. Food, nutrition and prevention of cancer: A global perspective. American Institute for Cancer Research, Washington, DC. p234.
- WUNSCH-FILHO V. 2004. The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil. *São Paulo Medical Journal*. 112(5):188-94.

- YUGE T.; NIBU K.; KONDO K.; SHIBAHARA J.; TAYAMA N.; SUGASAWA M. 2005. Loss of FHIT expression in squamous cell carcinoma and premalignant lesions of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* (114):127-31.

ANEXOS

Anexo I**Protocolo de isolamento e purificação de DNA genômico (Biópsia)**

- 1. Amostras:** biópsias de pacientes com carcinoma da laringe, armazenadas a -20°C .
- 2. Kit utilizado:** Kit de purificação de DNA genômico *Wizard*[®] (*Wizard*[®] *Genomic DNA Purification Kit - Promega Corporation, EUA*).

3. Armazenamento

As amostras foram encaminhadas ao laboratório (NPR) pela equipe do RCBP, em tubos *ependorff*, com a biópsia fresca. Imediatamente, as amostras foram identificadas e armazenadas a -20°C em freezer.

4. Maceração

As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, antes de serem submetidas à extração e purificação do DNA pelo kit *Wizard*[®].

5. Protocolo do fabricante**5.1. Preparo do tecido**

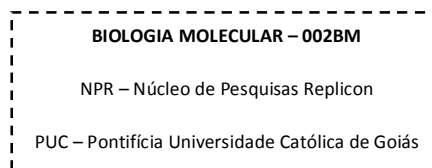
Adicionar 10-20mg de tecido fresco em 600 μl de solução de lise nuclear (*Nuclei lysis solution*) gelada. Incubar a 65°C por 30 minutos.

5.2. Lise e precipitação protéica

1. Adicionar 3µl de solução de RNase (*RNase solution*) na solução lisada e misturar. Incubar a 37°C por 30 minutos. Resfriar a temperatura ambiente.
2. Adicionar 200µl de solução de precipitação protéica (*Protein precipitation solution*). Levar ao vortex e resfriar em gelo por 5 minutos.
3. Centrifugar a 14.000RPM por 4 minutos.

5.3. Precipitação e reidratação do DNA

1. Transferir o sobrenadante para um tubo *ependorff* fresco contendo 600µl de isopropanol à temperatura ambiente.
2. Misturar gentilmente por inversão.
3. Centrifugar a 14.000RPM por 1 minuto.
4. Remover o sobrenadante e adicionar 600µl de etanol a 70% à temperatura ambiente e misturar.
5. Centrifugar a 14.000RPM por 1 minuto.
6. Aspirar o etanol e secar o *pellet* ao ar por 15 minutos.
7. Reidratar o DNA em 100µl de solução de reidratação de DNA (*DNA rehydration solution*) por 1h a 65°C ou *overnight* a 4°C.
8. Quantificar o DNA.
9. Estocar a amostra extraída em *freezer* a -20°C.

Anexo II**Protocolo de isolamento e purificação de DNA genômico (sangue periférico)**

- 1. Amostras:** sangue periférico coletado de pacientes com carcinoma da laringe.
- 2. Kit utilizado:** Kit de purificação de DNA genômico Wizard® (Wizard® Genomic DNA Purification Kit - Promega Corporation, EUA).

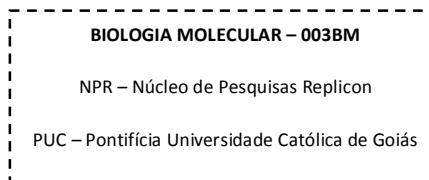
3. Armazenamento

As amostras foram encaminhadas ao laboratório (NPR) pela equipe do RCBP, em tubos falcon, com sangue periférico heparinizado. Imediatamente, as amostras foram identificadas e centrifugadas à 5000RPM durante 15 minutos, a fim de se obter o *buff coat* (anel leucocitário) que são isoladas em tubos criotubos para serem utilizadas na extração.

4. Protocolo do fabricante**4.1. Realização da técnica**

1. Adicionar 300µL de anel leucocitário 900µL de solução de Lise Celular homogeneizando por inversão, e incubar por dez.
2. Centrifugar a 14000 r.p.m. e logo depois descartar o sobrenadante e homogeneizar levemente.
3. Adicionar 300µL de solução de Lise Nuclear e realizar um spin.

4. Adicionar 100µL de solução de Precipitação de Proteínas, fazer um spin de 20 segundos e centrifugar a 14000 r.p.m. por 3 minutos.
5. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e adicionar 300µL de Isopropanol e centrifugar 14000RPM por quatro minutos.
6. Descartar o sobrenadante e adicionar 300µL de Etanol a 70%. Homogeneizar e centrifugar novamente a 14000RPM por quatro minutos.
7. Aspirar o Etanol e deixar o tubo invertido em repouso por três horas.
8. Reidratar o DNA em 100µl de solução de reidratação de DNA por 1h a 65°C ou overnight a 4°C.
9. Quantificar o DNA.
10. Estocar a amostra extraída em freezer a –20°C.

Anexo III**Protocolo de preparo de reagentes para a confecção de géis de poliacrilamida e agarose****1. Introdução**

Com a influência de uma diferença de potencial elétrico, átomos, moléculas e partículas providas de cargas, em solução aquosa, são capazes de migrar na direção do eletrodo de carga oposta. Essa migração, em meio de viscosidade definida, acontecerá em diferentes velocidades, uma vez que as moléculas apresentam cargas e massas variáveis.

A mobilidade eletroforética, definida pela velocidade de migração por unidade de campo elétrico, é um parâmetro característico da molécula em um determinado meio de eletroforese. Este parâmetro é influenciado pela quantidade de cargas e o tamanho da molécula.

Assim, a eletroforese é um método conhecido há muitos anos, mas era utilizada, principalmente, para separar RNA e proteína. Após a década de 70, a eletroforese passou a ser utilizada para a separação de DNA, pois tais moléculas apresentam cargas negativas, devido à presença do grupamento fosfato em sua estrutura. Desta forma, quando submetido a campo elétrico em pH neutro, às moléculas de DNA migram do pólo negativo (cátodo) para o pólo positivo (ânodo). Sob ação de um campo elétrico, se o DNA inserido em uma matriz que apresenta determinada resistência à migração, as moléculas pequenas alcançam maiores distâncias que as grandes, gerando uma migração diferencial dos fragmentos.

A matriz de resistência pode ser constituída de Agarose, que possuem poros que permitem a separação de fragmentos que variam de 200pb a 50kb, e de poliacrilamida, que permitem a separação de fragmentos muito pequenos até de 1000pb.

A força iônica, concentração total de íons, do tampão deve ser baixa, o mínimo para garantir um pH constante, reduzindo-se, desta forma, as correntes iônicas que fluem pelo gel e a dissipação térmica excessiva.

2. Protocolo de PAGE a 8%

A acrilamida é um monômero neurotóxico potente com ação cumulativa. Por isso, para trabalhar com acrilamida é necessário utilizar todos os procedimentos de segurança.

Reagentes	[] Inicial	[] Final	Volume (45mL)
Acrilamida	40%	8	9,0
Água deionizada	-	-	31,5
TBE 10x (pH 8,0)	10X	1	4,5
APS 10%*	10%	0,1	0,450
TEMED**	-	-	0,045

* Persulfato de Amônio a 10%: 10g de APS em q.s.p. 100mL de água deionizada.

** TEMED:

3. Protocolo de Preparação para o Gel de Agarose (AGE) a 1%

Reagentes	[] Inicial	[] Final	Quantidade	Quantidade
Agarose (estoque)	-	-	0,35g	2,0g
TBE 10X	10X	1X	3,5mL	20mL
Água deionizada (q.s.p.)	-	-	35mL	200mL
Volume Total	-	-	35mL	200mL

P.S. Utilizar um Becker ou Balão Volumétrico com capacidade suficiente para o Volume Total escolhido (ex.: Becker de 50mL para V.T. de 35mL).

4. Preparo: AGE a 1% - Volume Total de 35mL

1. Diluir 3,5mL de TBE 10X em 30,0mL de água deionizada e homogeneizar;
2. Acrescentar 0,35g de Agarose (stock) à solução e completar com água q.s.p.* 35mL;
3. Aquecer a solução em microondas até dissolvê-la e tornar-se límpida não permitir a formação de bolhas na solução (5 ciclos de 30segundos);
4. Depois de límpida aguardar que a solução atinja a uma temperatura de 55°C;
5. Montar a cuba em uma superfície plana;
6. Adicionar a solução em uma cuba e colocar o pente de aplicação;
7. Aguardar a solidificação do gel e preparar a solução a ser aplicada.

*q.s.p.: quantidade suficiente para (completar com o solvente até o volume desejado)

Anexo IV

BIOLOGIA MOLECULAR – 004BM
 NPR – Núcleo de Pesquisas Replicon
 PUC – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Protocolo de coloração por Nitrato de Prata (AgNO₃)**1. Solução de Fixação (17,5:1) - preparar no momento do uso**

Reagentes	Volume
Álcool Etílico P.A.	84mL
Ácido Acético P.A	4,8mL
Água deionizada	211,2mL
Volume Final	300mL

2. Solução de Coloração de Nitrato de Prata (AgNO₃) - 0,17%

Reagentes	Volume
AgNO ₃ (estoque)	0,34g
Água deionizada. (q.s.p.)	200mL
Volume Final	200mL

3. Solução de Revelação - preparar no momento do uso

Reagentes	Volume
Formaldeído 37% ⁽¹⁾	0,81mL
NaOH 30% ⁽²⁾	30mL
Água deionizada	269,19mL
Volume Final	200mL

- ⁽¹⁾ Adicionar o Formaldeído apenas no momento da aplicação sobre a Solução de Revelação.
- ⁽²⁾ Pesar 1g de NaOH (estoque) e adicionar água deionizada q.s.p. 30mL. Armazenar em frasco âmbar.

- Preparar as Soluções de Fixação e de Revelação em Becker de 500mL.

4. Procedimento:

1. **Em um recipiente de plástico limpo e seco adiciona-se a solução fixadora (300mL);**
2. Desprender o gel dos vidros e colocá-lo no recipiente com a Solução de Fixação e agitar por 20 minutos;
3. Desprezar a Solução de Fixação no Becker, segurando o gel nas extremidades com os dedos e adicionar 200mL da Solução de Coloração sobre a parede do recipiente, com cuidado para não manchar o gel. Deixar por 25 minutos em rotação;
4. Desprezar a Solução de Coloração fixando o gel no fundo do recipiente e lavar com água deionizada por 1minuto.
5. Desprezar a água. Aplicar o Formaldeído a 37% na Solução de Revelação e em seguida, adicioná-la sobre a parede do recipiente com cuidado para não manchar o gel.
6. Homogeneizar e aguardar o surgimento das bandas amplificadas.
7. Ao final de aproximadamente 8 minutos desprezar a Solução de Revelação e reutilizar a Solução de Fixação até a secagem e/ou captura de imagens do gel.

Método de Coloração Rápida por Nitrato de Prata (AgNO₃)

1. Solução de Fixação 25:1 - Preparo no momento do uso

Reagentes	Volume
Álcool Etílico P.A.	50mL
Ácido Acético P.A	2mL
Água deionizada	248mL
Volume Final	300mL

2. Solução de Nitrato de Prata (AgNO₃)

Reagentes	Volume
Nitrato de Prata (estoque)	7,5g
Água deionizada (q.s.p.)	50mL
Volume Final	50mL

3. Solução de Revelação (Preparo no momento do uso)

Reagentes	Volume
NaOH (estoque)	4,5g
Formaldeído a 37% ⁽¹⁾	3mL
Água deion. (q.s.p.)	200mL
Volume Final	200mL

- ⁽¹⁾ Adicionar o Formaldeído somente no instante da revelação.

4. Procedimento:

1. Depositar o gel sobre um recipiente limpo e seco contendo 150mL de Solução de Fixação;
2. Adicionar 2mL da Solução de Nitrato de Prata sobre a solução e agitar por 5 minutos;
3. Desprezar a Solução de Fixação, segurando o gel com os dedos. Lavar 2X com água deionizada por 20 segundos cada lavagem;
4. Adicionar a Solução de Revelação com cuidado, aplicando na parede do recipiente sem manchar o gel;
5. Aguardar a revelação das bandas por cerca de 5 minutos.
6. Desprezar a Solução de Revelação e adicionar a Solução de Fixação (150mL) e aguardar até o momento de captura de imagens e/ou secagem do gel.

Anexo V

BIOLOGIA MOLECULAR – 005BM
 NPR – Núcleo de Pesquisas Replicon
 PUC – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Protocolo para preparação dos reagentes utilizados no estudo.

<i>Acrilamida 30%</i>	
<i>Reagente</i>	<i>Quantidade</i>
Acrilamida	29g
<i>N, N'</i> - metilenobisacrilamida	1g
Água deionizada q.s.p.	100,0 mL

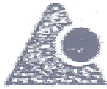
<i>Brometo de Etídeo (EtBr)</i>	
<i>Reagente</i>	<i>Quantidade</i>
Brometo de etídeo	30,8g
Água deionizada q.s.p.	10,0 mL

<i>EDTA (0,5M; pH 8,0)</i>	
<i>Reagente</i>	<i>Quantidade</i>
EDTA (p.m. 372,24)	186,12g
H ₂ O deionizada q.s.p.	100,0 mL
Controlar o pH com NaOH (~20g)	

TBE 10x (Tris-Borato de EDTA)	
<i>Reagente</i>	<i>Quantidade</i>
Tris Base	108g
Ácido Bórico	55g
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	40mL
Água deionizada q.s.p.	10,0 mL

APS a 10% (Persulfato de Amônia)	
<i>Reagente</i>	<i>Quantidade</i>
ACOONH ₄	30,8g
Água deionizada q.s.p.	100,0 mL

Aprovação do Comitê de Ética



ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS

Goiânia, 30 de junho de 1998.

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

Prezada Sra.,

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

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

Colocamo-nos ao seu inteiro dispor para esclarecimentos necessários.

Cordiais Saudações.


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




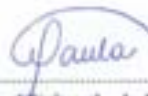



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE

TÍTULO DO TRABALHO: "AVALIAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR DO CARCINOMA DAS CÉLULAS ESCAMOSAS DA LARINGE".

AUTOR(A): CLÁUDIO CARLOS DA SILVA.

TESE Nº 009, DEFENDIDA E APROVADA EM SESSÃO PÚBLICA, NA DATA DE 21 de Outubro de 2009, ÀS 08:30 hs, na SALA DE EVENTOS, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS, CUJA BANCA EXAMINADORA ESTEVE CONSTITUÍDA DOS SEGUINTE PROFESSORES:

 Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz Instituição: PUG /GO	 Prof. Dra. Irlisângela de Paula S. Lacerda Instituição: UFG/GO
 Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres Instituição: UEG/GO	 Prof. Dra. Daniela de Melo e Silva Instituição: PUC/GO
 Prof. Dr. Marcelo W. Baruffi Instituição: UNESP/SP	




SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE Nº 009

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE EM NÍVEL DE DOUTORADO. – Aos vinte e um dias do mês de Outubro do ano de dois mil e nove (21/10/2009), às 08:30 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz - Orientador; Prof.^a. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda ; Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres ; Prof.^a. Dra. Daniela de Melo e Silva e Prof. Dr. Marcelo R. Baruffi, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada na Sala de Eventos, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, procederem à avaliação da defesa de Tese intitulada: “AVALIAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR DO CARCINOMA DAS CÉLULAS ESCAMOSAS DA LARINGE” em nível de doutorado, de autoria de CLÁUDIO CARLOS DA SILVA, discente do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida ao autor da tese que, em 60 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 706/2004 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia e procedidas às correções recomendadas, a Tese foi APROVADA por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de DOUTOR EM BIOLOGIA, na área de concentração em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do

curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGGB da versão definitiva da tese, com as devidas correções. A banca examinadora recomenda a publicação de artigo(s) científico(s) oriundo(s) dessa tese em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de procedidas as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades de pauta, às 12:30 horas a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Tese de Doutorado e para constar eu, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, secretária do PPGGB lavrei a presente Ata, que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.


Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz
Presidente da Banca
Pontifícia Universidade Católica de Goiás


Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres
Universidade Estadual de Goiás


Prof. Dra. Elisângela de Paula S. Lacerda
Universidade Federal de Goiás


Prof. Dra. Daniela de Melo e Silva
Pontifícia Universidade Católica de Goiás


Prof. Dr. Marcelo R. Baruffi
Universidade Estadual Paulista