

ADAUTO ALMEIDA NETO

**PAPILOMAVÍRUS HUMANO E O POLIMORFISMO DO
CÓDON 72 (ALELO-G) DO GENE *TP53* NO CARCINOMA
ESCAMOSO ORAL**

UFPE

ADAUTO ALMEIDA NETO

**PAPILOMAVÍRUS HUMANO E O POLIMORFISMO DO
CÓDON 72 (ALELO-G) DO GENE *TP53* NO CARCINOMA
ESCAMOSO ORAL**

**Dissertação apresentada para a obtenção do grau de
mestre em Patologia Geral.**

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Aurora Karla de L. Vidal

**Colaboradores: Prof^a. Dr^a Maria Tereza Cartaxo
Muniz e Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas**

**Recife – PE
2007**

Almeida Neto, Aauto

Papilomavírus humano e o polimorfismo do códon 72 (Alelo-G) do gene TP53 no carcinoma escamoso oral / Aauto Almeida Neto. – Recife : O Autor, 2007.

80 folhas : il., fig., tab., graf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia geral

Inclui bibliografia, apêndices e anexos

1. Papiloma vírus humano. 2. Carcinoma escamoso oral. 3. Polimorfismo. 4. TP 53 5. Ubiquitina proteossomal I. Título.

616.07

CDU (2.ed.)

UFPE

616.07

CDD (22.ed.)

CCS2008-01



Universidade Federal de Pernambuco
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

AUTOR: ADAUTO ALMEIDA NETO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA GERAL

**NOME DA TESE: INVESTIGAÇÃO DO PAPILOMA VIRUS (HPV) EM LESÕES
EPITELIAIS MALIGNAS E NÃO MALIGNAS DE MUCOSA ORAL.**

ORIENTADOR: ROBERTO JOSÉ VIEIRA DE MELLO

**TESE DEFENDIDA E APROVADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
PATOLOGIA.**

DATA: 27 de agosto de 2007

BANCA EXAMINADORA:

PROFª LIRIANE BARATELLA EVÊNCIO

PROFª JUREMA FREIRE LISBOA DE CASTRO

PROFª MARIA TEREZA CARTAXO MUNIZ

SUMÁRIO

	Páginas
Lista de Tabelas	V
Lista de Figuras	VI
Lista de abreviações	VIII
Agradecimentos	IX
Dedicatória	XI
Resumo	12
Abstract	13
1. Introdução	14
2. Revisão da Literatura	16
2.1. Câncer oral	16
2.2. O HPV e o CEC oral	18
2.3. O HPV e o gene <i>TP53</i>	27
2.3.1. O gene <i>TP 53</i>	27
3. Objetivos	34
4. Materiais e métodos	35
4.1. População alvo/seleção da amostra	35
4.2. Coleta de material Biológico	35
4.3. Extração do DNA	35
4.4. Amplificação para p53	36

4.5. Determinação dos polimorfismos para p53	36
4.6. Detecção do DNA-HPV	37
4.7. Aspectos Éticos	37
4.8. Análise Estatística	37
5. Resultados	39
5.1 Dados demográficos de pacientes e controles	38
5.2 Amplificação do DNA através da Reação em Cadeia com a Polimerase (PCR)	40
5.2.1. Identificação do polimorfismo do gene <i>TP53</i>	41
5.2.2. Identificação do HPV	42
5.2.3. Análise estatística	43
6. Discussão	48
7. Conclusões	52
8.Referências bibliográficas	53
9. Anexos	66
9.1 – Anexo1: Termo de consentimento livre e esclarecido	67
9.2 – Anexo 2: Protocolo de pesquisa - Questionário	68
9.3 – Anexo 3: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas em Humanos HUOC/UPE	70
9.4 – Anexo 4: Parecer do Comitê de ética em pesquisa da UPE aprovando o projeto inicial e a coleta das amostras	71
9.5 – Anexo5: Caracterização das amostras	72

Lista de Tabelas

Resultados

5.1	39
Tabela 1. Dados referentes ao sexo, idade, etnia, tabagismo, etilismo e uso de prótese dos pacientes.	40
Tabela 2. Dados referentes ao sexo, idade, etnia, tabagismo, etilismo e uso de prótese dos controles.	41
5.2	41
5.2.1	41
Tabela 3. Distribuição dos genótipos das 24 amostras com CEC oral e dos 21 controles.	42
Tabela 4. Distribuição dos alelos das 24 amostras com CEC oral e dos 21 controles.	42
Tabela 5. de indivíduos das 24 amostras de CEC oral e dos 21 controles que apresentam pelo menos 1 alelo arginina (CC (Arg) e CG (Arg/Pro)).	43
Tabela 6. Frequência de indivíduos das 24 amostras de CEC oral e dos 21 controles que apresentam pelo menos 1 alelo prolina (GG (Pro) e CG (Arg/Pro)).	43
Tabela 7. Tabela dos valores estatísticos significantes das variáveis investigadas.	45
Gráfico 1. Gráfico descritivo da variável gênero	45
Gráfico 2. Gráfico descritivo da variável tabagismo	45
Tabela 8. Tabela descritiva das variáveis investigadas.	46
Tabela 9. Tabela descritiva das variáveis investigadas.	47

Lista de figuras

Revisão de literatura

2.2	18
Figura 1. Ciclo de vida do vírus HPV (Modificado de zur HAUSEN, 2002).	18
Figura 2. Mapa genômico do BPV-1, que representa o protótipo da família de papilomavírus.	20
Figura 3. Via proteolítica ubiquitina-proteossomal (modificado de Mitch e Goldberg, 1996).	29
Figura 4. A alteração do códon 72. A citosina é trocada por guanina, formando uma arginina na cadeia polipeptídica. (adaptado de MATLASHEWSKI, 1987).	30
Resultados	39
5.2	41
Figura 1. Gel de agarose a 2% mostrando a genotipagem de alguns pacientes com CEC oral. Na linha observa-se um GG (Pro), na linha 6 um CG (Arg/Pro) e na linha 7 um CC (Arg).	43
Figura 2. Gel de agarose a 2% mostrando a genotipagem do TP53 dos controles. A marcação é baseada em Pierce <i>et al</i> , 2000 (296, 169 e 127 ppb).	44

Lista de abreviações

BPV	<i>Bovine papillomavirus</i> (Papilomavírus bovino)
C	<i>Citosina</i>
CEC	Carcinoma Escamoso Oral
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EBV	<i>Epstein-Barr Virus</i> (Vírus Epstein-Barr)
E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7	<i>Early Genes</i> (Genes precoces)
EGF	<i>Epithelial Growth Factor</i> (Fator de crescimento epidérmico)
FOP	Faculdade de Odontologia de Pernambuco
G	Guanina
HCPE	Hospital do Câncer de Pernambuco
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> (Papilomavírus humano)
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L1 e L2	<i>Later Genes</i> (Genes tardios)
LCR	<i>Long Control Region</i> (Região reguladora longa)
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami
Pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	<i>Poymerase Chain Reaction-Restriction</i>

pRb	<i>Fragment Length Polymorphism</i> (Reação em cadeia da polimerase – Restrição do polimorfismo do fragmento extenso) <i>Retinoblastoma Protein</i> (Proteína retinoblastoma)
P53	Proteína 53 Kilodáltons
ORF	<i>Open reading frame</i>
Taq	<i>Thermophylus aquaticus</i>
TP53	<i>Tumor protein 53 kdáltons</i> (Proteína tumoral de 53 kdáltons)
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UPE	Universidade de Pernambuco
URR	<i>Upper Regulatory Region</i> (Região reguladora superior)
UV	Ultra-violeta

Agradecimentos

- À Prof. Dr^a. Maria Tereza Cartaxo Muniz, que, do início ao fim, esteve ao meu lado orientando e fornecendo ajuda incondicional nas extrações dos materiais e na utilização total dos equipamentos do laboratório de Biologia Molecular da UPE. Obrigado por tudo;
- À Prof. Dr^a. Aurora Karla de Lacerda Vidal e ao Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello (Bob), pela paciência e apoio;
- Ao Prof. Antônio Carlos (UFPE), certamente pela resolução decisiva e pela colaboração crucial e marcante no momento final da pesquisa. Obrigado por tudo;
- Ao Prof. Dr. Emmanuel Sávio, FOP, pela solicitude irrestrita ao ceder as dependências do Laboratório de Patologia Bucal Rildege cioly;
- Ao Prof. Dr. José Luis, chefe do LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami), UFPE, que me concedeu a utilização do laboratório de virologia;
- Ao Dr. Prof. Paulo Roberto, do LIKA, pela simpática e importante colaboração com os materiais fornecidos para as PCRs;
- Ao Prof. Flávio Ramos, que com sua destreza e conhecimento apurado, representou indispensável ajuda nas estratégias tecidas na fase experimental e paciência inigualável nas diversas horas de expediente noturno;
- Aos amigos Alexandre e Hildson (Adelmo) que, literalmente, foram os instrumentos práticos que alicerçaram a construção dessa dissertação. Eu aprendi muito com eles;
- Aos demais alunos de iniciação científica do laboratório de Biologia Molecular da UPE, Daniela Migliori e Carol (agradecimento especial, principalmente na 1^a fase de extração de DNA), Rafaela, Helker, Carlos, Renan, Felipe, Maíra, Karina, Laís, Daniela, Arthur, enfim, todos que foram coadjuvantes no processo de acomodação e aprendizado das técnicas de laboratório empregadas;
- Ao querido ex-aluno Ronaldo (UFPE), pelo comprometimento e dedicação na execução das PCRs;

- À Rafael, Lucas (LIKA), Armando, Eduarda (FOP), Marilene, Zenaide, Sidclei, Silvana (MESTRADO UFPE);
- Aos diretores do Colégio Contato, Colégio Boa Viagem, FENFA (Faculdade de Enfermagem de Arcoverde), Colégio Neo Planos, Colégio Decisão e aos meus alunos pela compreensão de aulas perdidas ou, até mesmo, pelos percalços que coexistiram durante toda a pesquisa. Meus sinceros agradecimentos.
- Aos meus amigos das horas mais difíceis, meu mais eloqüente respeito e gratidão;

*Dedico esta pesquisa aos meus amados pais, **Adauto Filho e Graça Marques**, responsáveis pelo fecundo momento do enlace genético do conceito que cresceu e atualmente vislumbra, apaixonadamente, o desejo cada vez mais intenso pela busca incessante das explicações relativas ao surgimento da vida. Minhas origens, minha vida, meu legado. Sou grato eternamente.*

Resumo

O CEC oral representa 90% de todos os tumores malignos que afetam a boca. A infecção por HPV (Papilomavírus Humano) demonstrou ser um fator relevante no desenvolvimento do carcinoma oral, assim como o polimorfismo do Códon 72 (alelo-G) do gene *TP53*, cuja transcrição da proteína supressora tumoral p53 é modificado. A degradação da p53 ocorre em função da interação entre a oncoproteína viral E6 junto ao sistema proteolítico ubiquitina-proteossômica.

O objetivo deste trabalho foi identificar a presença do HPV no CEC oral e verificar a associação com o polimorfismo do códon 53 do gene *TP53*. O grupo experimental foi composto por 24 pacientes com CEC oral, os quais freqüentavam a rotina do Hospital do Câncer de Pernambuco. O grupo controle fora composto por 21 indivíduos que apresentavam o mesmo ambiente familiar e as mesmas relações sociais dos pacientes estudados. O material biológico foi obtido pela esfoliação da mucosa oral e o DNA extraído através do método de Salting Out. A detecção do HPV foi realizada por PCR a partir da utilização dos *primers* GP5 + GP6+. A identificação do polimorfismo do códon 72 (alelo-G) foi feita por PCR - RFLP.

Os resultados foram negativos para a presença do HPV. Não foi observada associação entre a presença do polimorfismo alelo-G nos pacientes com CEC oral na amostra avaliada ($X^2 = 4,048$; $P = 0,132$). Os resultados confirmaram que os homens ($X^2 = 5,88$; $P = 0,01$) e fumantes ($X^2 = 8,84$; $P = 0,002$) apresentaram uma maior freqüência de diagnóstico positivo para o CEC oral, assim como foram encontrados valores estatisticamente significativos para a idade dos indivíduos estudados ($X = 5,88$; $P = 0,01$). Os resultados não sugerem uma associação com o polimorfismo do gene *TP53* (alelo-G) e da infecção por HPV com CEC oral. Os resultados para o sexo e tabagismo estão de acordo com a literatura científica.

Palavras - chave: HPV, *TP53*, CEC oral, Polimorfismos.

Abstract

The oral squamous cells carcinoma represents 90% of all the malignant tumors that affect the oral cavity. The infection for HPV (Human Papiloma virus) demonstrated a relevant factor in the development of the oral carcinoma, as well as the polymorphism of the codon 72 of the gene *TP53*, whose the transcription of the tumoral suppressor protein p53 is modified. The degradation of the protein occurs in function of the viral oncoprotein E6 interaction with the ubiquitin-proteassome proteolytic system.

The objective of this work was to identify the presence of the HPV in the oral carcinoma and to verify the association with *TP53* (codon 72) polymorphism. The experimental group was composed of 24 patients with oral squamous carcinoma who were attended in the Cancer's Hospital of Pernambuco. It had been studied 21 controls, which had been grouped in accordance with the familiar and ambient proximity of the patients. The biological material was gotten by the exfoliation of the oral mucosa and the DNA extracted through the method of Salting Out. The detection of the HPV was carried out by PCR having used itself primers GP5+ GP6+. The identification of the polymorphism G-allele was made by PCR-RFLP.

The results had been negative for the presence of the HPV. It was not observed association between the presence of the polymorphism and the oral squamous carcinoma in the evaluated sample ($X^2=4.048$; $p=0.132$). The results had also confirmed that men ($X^2=5.88$; $p=0.01$) and smokers ($X^2=8.84$; $P=0.002$) presented a larger frequency of positive diagnosis for the oral carcinoma, as well as were found related significant value to the age of the studied individuals ($X=5.88$; $p=0.01$).

The results not suggest an association with the *TP53* (codon 72) polymorphism and HPV infection with the oral squamous carcinoma. The results for the sex and tabagysm are the according with literature. Key words: HPV, *TP53*, oral squamous carcinoma, Polymorphism

1. Introdução

O HPV é um vírus epiteliotrófico que está associado a diversas alterações de mucosa, desenvolvendo verrugas, lesões papilomatosas e sua prevalência como fator carcinogênico é demonstrada em vários estudos científicos que abordam a malignização celular. O HPV é, dessa forma, um vírus oncogênico. Sua biologia determina uma importância decisiva nos estudos bioquímicos relacionados ao câncer.

As oncoproteínas virais E6 e E7 são responsáveis pela associação do vírus a alguns genes de importância no mecanismo de controle do ciclo celular. Os genes denominados de protooncogenes são responsáveis pelo mecanismo de divisão das células. O descontrole biológico desses genes explica a imortalização celular, o que determina o desenvolvimento das neoplasias que podem evoluir para lesões de parênquima mais complexas, causando, dessa forma, os cânceres. Os genes que determinam tal malignização são chamados de oncogenes.

O controle da atividade dos genes que está associada ao ciclo de divisão celular é exercido por genes denominados de supressores tumorais. Dentre os genes mais estudados, o *TP53*, localizado no cromossomo 17, é um dos mais conhecidos como fator coadjuvante na investigação das neoplasias. Os inúmeros achados científicos revelam a participação do gene *TP53* como protagonista de vários tipos de cânceres.

O polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* denominado de alelo-G está relacionado ao desenvolvimento de câncer de pulmão e outras neoplasias. O envolvimento desse gene com outros fatores sinérgicos explica o mecanismo biológico que determina a formação dos tumores em vários tipos de neoplasias.

O câncer bucal situa-se entre os dez mais comuns cânceres, apresentando a maior taxa de mortalidade dentre as neoplasias do segmento cabeça e pescoço. No Brasil, o câncer oral varia de uma

região geográfica a outra, possivelmente devido à influência dos fatores de risco aos quais está exposta cada população. O carcinoma de células escamosas da boca tem se revelado um paradigma científico curioso. Atualmente, são múltiplas as pesquisas que envolvem os detalhes da presença viral do HPV nas neoplasias orais, assim como os possíveis polimorfismos genes supressores no desenvolvimento de neoplasias de cabeça e pescoço. A identificação do vírus HPV e o polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* no desenvolvimento do câncer de cavidade oral foram os objetivos principais dessa pesquisa. Achados quantitativos e qualitativos referentes a essa relação sugerem uma importante referência para o conhecimento da sinergia desses co-fatores e da presença deles como carcinógenos potenciais. É importante compreender que outros fatores ambientais também apresentam relevância na manifestação das neoplasias: clima, hábitos como o tabagismo e o etilismo, as condições sócio-econômicas em geral, a utilização de próteses e a exposição ao sol. Todas essas variáveis apresentam importância crucial e devem complementar o estudo referente às neoplasias.

2. Revisão de literatura

2.1. Câncer oral

O carcinoma escamoso celular (CEC) oral está entre as dez formas mais comuns de câncer observados no mundo (VIDAL *et al*, 2004, MCMURRAY *et al*, 2003, CASTRO *et al*, 2004, TERAÍ *et al*, 2001, KOJIMA *et al*, 2002) e, no Brasil, são registrados índices elevados de incidência da doença que vêm crescendo ao longo dos últimos 60 anos. Segundo a Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil para 2006, o câncer oral apresentará 10.060 casos estimados entre homens e 3.410 entre as mulheres. O CEC oral é uma denominação que inclui os cânceres de lábio e de cavidade oral (mucosa oral, gengivas, palato duro, língua e assoalho da boca) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). O câncer de lábio é mais freqüente em pessoas brancas, e registra maior ocorrência no lábio inferior em relação ao superior. O câncer em outras regiões da boca acomete principalmente tabagistas e os riscos aumentam quando o tabagista é também etilista (BOUDA *et al* 2000). Em Pernambuco, a representação espacial das taxas brutas de incidência para cada 100.000 homens estima, para o ano 2006, a taxa de 7,41 que terá a doença, baseada no registro de 310 novos casos no Estado, sendo 110 na capital, enquanto que a incidência para cada 100.000 mulheres registra uma estimativa de 3,6 que terão a doença, sendo 160 casos novos no Estado e 30 na capital (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O CEC oral representa 90% de todos os tumores malignos que afetam a cavidade oral (VIDAL *et al* 2004, KOJIMA *et al* 2004). O câncer oral permanece como um problema de saúde pública, em função da ainda crescente quantidade de pessoas que fazem a associação maléfica entre o tabagismo e o álcool, sendo estes os principais carcinógenos desencadeantes do carcinoma oral. Fatores etiológicos (suceptibilidade genética individual) incluindo o tabaco (75% dos indivíduos com câncer oral fumam), o uso do betel, consumo do álcool, a

carência de uma dieta de frutas e de vegetais frescos, agentes infecciosos (Cândida, vírus, bactérias), a deficiência do sistema imunológico e a exposição à luz solar, enfim, são muitos fatores de ação sinérgica que estão relacionados com o câncer de boca (CASTRO *et al*, 2004, SCULLY, 2002).

A situação do tratamento de câncer de boca é particularmente grave, visto que a maioria dos casos ainda é diagnosticada tardiamente, a taxa de mortalidade de indivíduos na faixa economicamente ativa é alta e o tratamento desses casos implica mutilações, que, muitas vezes, inabilita o paciente para reintegração familiar, social e profissional, temporária ou definitivamente. (PARISE, 2000).

Uma importante constatação, proveniente de estudos epidemiológicos da doença, mostra aumento do desenvolvimento do CEC oral em pacientes menores de 45 anos de idade, a partir da década de 80 (TERAI *et al*, 2001). O comportamento desse tumor em adultos jovens é controverso, havendo relatos de maior anaplasia e pior prognóstico, em comparação a habitual faixa etária. Consoante com diversos autores, o CEC oral ocorre mais comumente em pacientes acima dos 60 anos de idade, com história de tabagismo e alcoolismo (VIDAL *et al*, 2004, STOREY *et al*, 1998, CASTRO *et al*, 2004, SCULLY *et al*, 2002, TERA I *et al*, 2001, NAIR *et al*, 2005). A sua ocorrência em indivíduos jovens pode apresentar mecanismos moleculares distintos, assim como a participação de outros fatores de risco, fazendo referência aos vírus HPV e Epstein-Barr (EBV), ambos com ação oncogênica (MÜNGER *et al*, 2004, MALAWASI *et al*, 2004), além da possível correlação do vírus com polimorfismos presentes em genes de supressão tumoral, como gene *TP53* e o *RB*, cuja ação carcinogênica tem se revelado um importante referencial nos estudos de neoplasias malignas em outros órgãos (zur HAUSEN, 2002).

A oncogênese está diretamente associada a possíveis alterações sofridas pelos genes que regulam o crescimento celular e que são denominados de protooncogenes (ROBBINS *et al*, 2001, KARLSEN *et al*,

1996). A multiplicação desenfreada de clones expansivos e/ou atípicos decorre de descontrole gênico na transcrição de proteínas relacionadas à divisão celular, assim como a ação sinérgica de outros co-fatores envolvidos com as alterações dos protooncogenes, explicam as diversas e diferentes manifestações clínicas que afetam o organismo como um todo (ROBBINS *et al*, 2001).

2.2 O HPV e o carcinoma oral

Os papilomavírus humanos (HPV) são vírus da família *Papovaviridae*, capazes de induzir lesões de pele ou mucosa, as quais mostram um crescimento limitado e habitualmente regridem espontaneamente. Também induz tumores epiteliais e fibroepiteliais nos seus hospedeiros naturais, além de apresentar um tropismo específico em células epiteliais escamosas (zur HAUSEN, 2002). (figura 1)

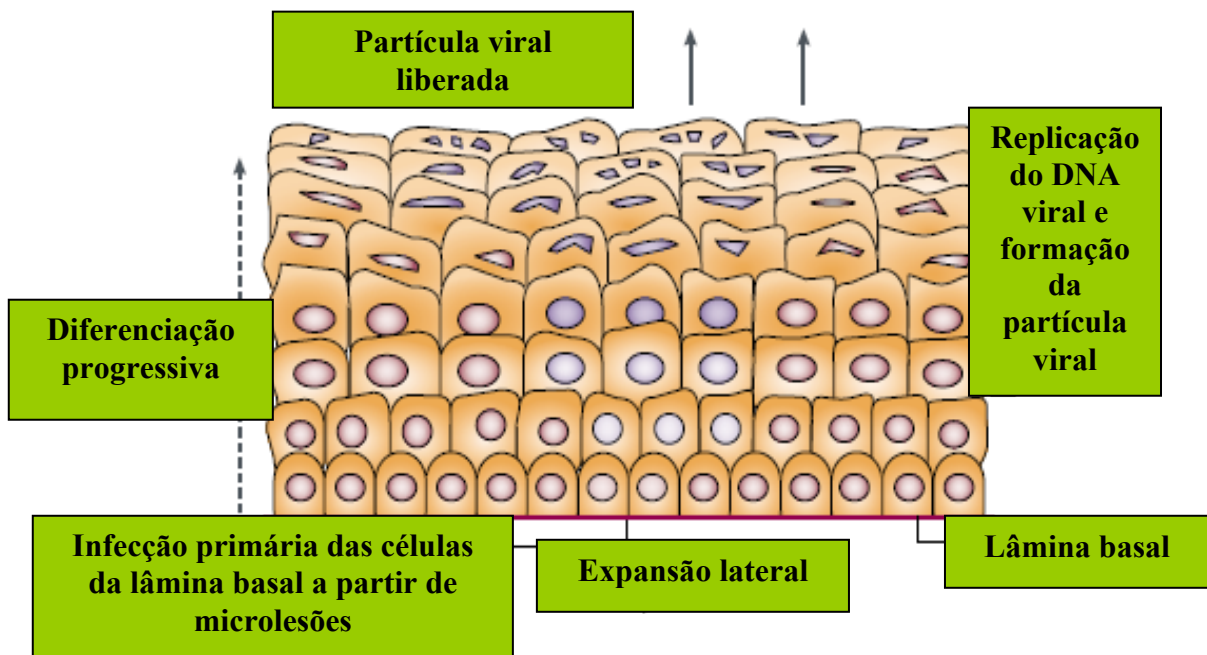


Figura 1. Ciclo de vida do vírus HPV (Modificado de zur HAUSEN, 2002).

A infecção ocorre em função das microlesões características da lâmina basal. As células infectadas vão se dividindo lateralmente, até que se inicia um processo de migração adentrando na camada de

diferenciação das células suprabasais. Os genes virais são ativados e replicados e novos capsídeos protéicos são produzidos. As partículas virais são liberadas para a superfície e, posteriormente, irão infectar outros tecidos (zur HAUSEN, 2002).

O ciclo do papilomavírus de outras famílias virais: a infecção requer uma validade das células epidérmicas ou das células epiteliais da mucosa que ainda estão aptas a se proliferarem (células da lâmina basal). Nessas células, a expressão do gene viral é largamente suprimida, embora a expressão limitada dos específicos genes, tais como as ações do E5, E6 e E7, resulta na desenfreada proliferação das células infectadas e da sua expansão lateral. Posteriormente, invade o interior das camadas suprabasais e a expressão dos genes de ação tardia é iniciada. O genoma circular viral é, dessa forma, replicado nas formas protéicas estruturais. Nas camadas superficiais da epiderme ou da mucosa, as partículas virais são multiplicadas (zur HAUSEN, 2002).

As lesões causadas pelo HPV contêm características histológicas fundamentais como infecções cutâneas queratinizadas e grânulos de queratohialina, os quais são predominantes na camada do epitélio queratinizado e ocasionalmente predominantes nas inclusões basofílicas intranucleares detectadas na camada superior da epiderme (ROSEMBLATT, 2005). Existem mais de 200 subtipos diferentes de HPV, entretanto, somente os subtipos de alto risco estão relacionados a tumores malignos (SOARES *et al*, 2002, SOUTO *et al*, 2004).

O HPV é um pequeno vírus de DNA circular, de fita dupla, não-envelopado, epiteliotrópico, com cerca de 8.000 pares de bases e com estrutura física e organização gênica bem conhecida (ROSEMBLATT 2005, VIDAL *et al* 2004). O genoma é dividido em regiões gênicas denominadas seqüências abertas de leitura, ou *open reading frames* (ORF). O genoma de todos os HPVs contém aproximadamente oito ORFs (esquadro de leitura – *open reading frame*), que são transcritos em mensagens policistrônicas de uma única hélice de DNA e que estão localizados na mesma fita de DNA (CAVALCANTI, 2006). Estas ainda podem ser separadas funcionalmente em três regiões principais: a primeira é uma região regulatória, não codificadora, de 400 a 1000 pares

de bases que é conhecida pelas denominações *long control region* (LCR) ou *upper regulatory region* (URR), situada entre os genes L1 e E6 (CAVALCANTI, 2006). É nesta região pouco conservada que estão localizados os genes reguladores e iniciadores da replicação viral. A segunda é chamada de região precoce ou E (*early*), constituída pelos ORF E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que estão envolvidos na replicação viral, no controle da transcrição e na oncogênese (CAVALCANTI, 2006). E a terceira região denominada tardia (*late*), codifica as proteínas L1 e L2 do capsídeo viral (CAVALCANTI, 2006). A região reguladora *upstream* (URR) concentra seqüências reguladoras importantes na replicação viral e na transcrição. Assim como no BPV-1, a expressão gênica é dividida em precoce e tardia. (figura 2)

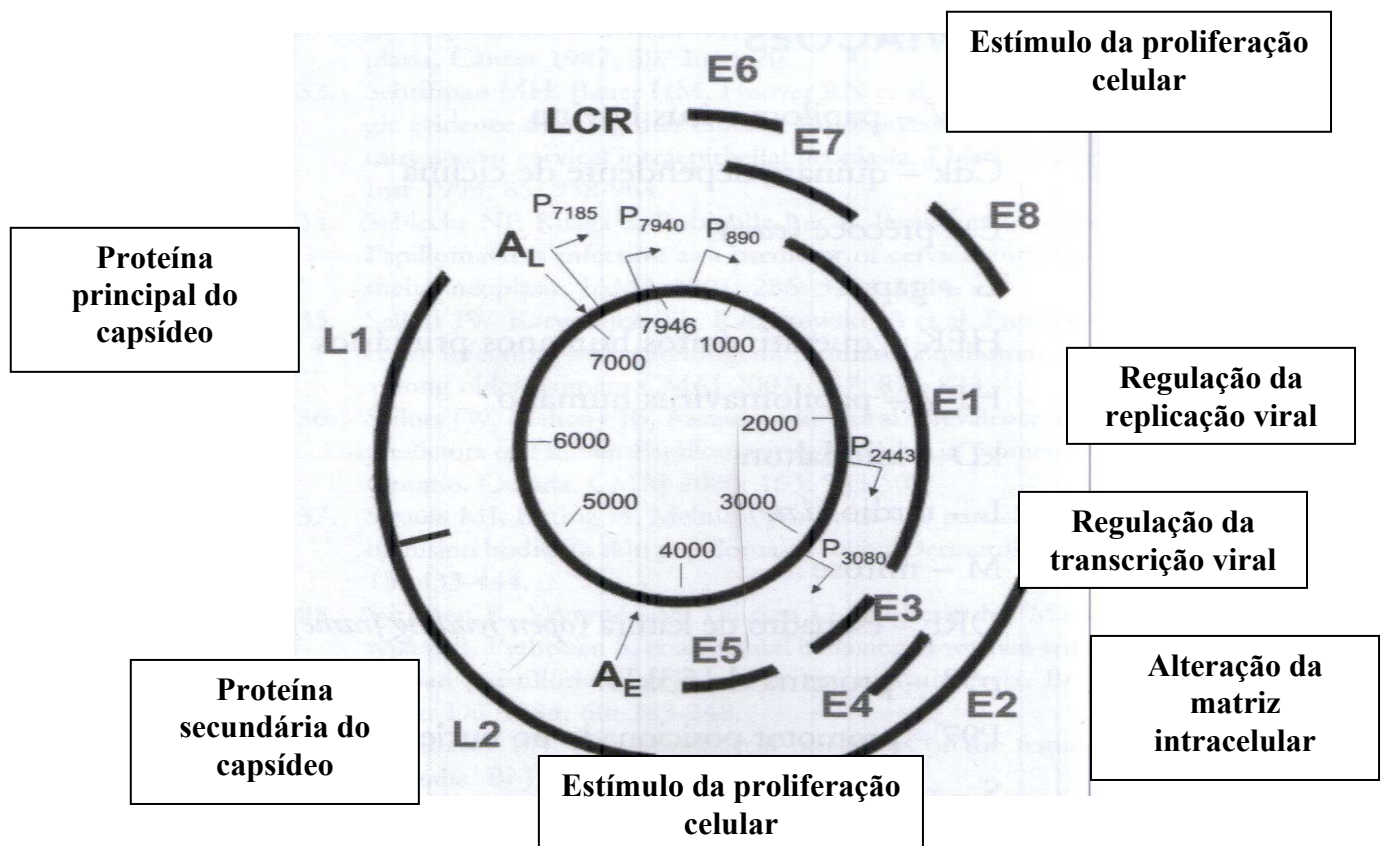


Figura 2: Mapa genômico do BPV-1, que representa o protótipo da família de papilomavírus (Modificado de ROSEMBLATT *et al*, 2005)

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

A proteína E6 do HPV apresenta aproximadamente 150 aminoácidos na cadeia polipeptídica que apresenta uma aparente massa molecular de 18 kD. A principal característica estrutural de todas as proteínas E6 do HPV é a presença de 4 domínios Cys-X-X-Cys, os quais permitem a formação de dois dedos de zinco. Esses domínios conservados nas proteínas E6 dos vírus da família Papoviridae resultam em atividade defectível em todos os ensaios. Esses domínios dos dedos de zinco são precedidos por um domínio hidrofílico amino-terminal, são separados por um hidrofóbico domínio e são seguidos por um curto domínio carboxi-terminal, que no caso do vírus HPV mucosotrópico de alto risco contém um domínio PDZ-ligante que contém uma sítio de sobreposição de uma proteína quinase A (PKA) (THOMAS, *et al* 1999).

A proteína E6, embora pequena, induz muitas modificações importantes na célula hospedeira, apresentando efeito antiapoptótico. Para isso interage e induz a degradação das proteínas pró-apoptóticas Bak e p53 (proteína supressora de 53 kD). A proteína E6 também induz à alteração da transcrição de genes celulares pela sua ligação com a p300, à ativação da telomerase e à desestabilização cromossômica, além de aumentar a integração de DNA estranho ao genoma celular (zur HAUSEN, 2000; MACMURRAY *et al*, 2001).

Os telômeros são estruturas especializadas existentes na porção terminal dos cromossomos das células eucarióticas, compostos por repetições da seqüência TTAGG (VENTURI *et al*, 2004). Os telômeros

protegem os cromossomos da quebra enzimática do DNA, replicação incompleta, previnem recombinações e fusões aberrantes, e asseguram a completa replicação do cromossomo durante a divisão celular (VENTURI *et al.*, 2004). Os telômeros humanos, de células somáticas, sofrem um encurtamento progressivo durante a divisão celular, onde há uma perda da seqüência terminal do DNA decorrente da replicação (VENTURI *et al.*, 2004). A perda progressiva do telômero causa senescência (VENTURI *et al.*, 2004).

Quando há grande encurtamento do telômero, a célula pára de se dividir, uma vez que ele é reconhecido como o “relógio mitótico”, sendo responsável pela capacidade replicativa celular. Entretanto, células germinativas e células tronco escapam do encurtamento do telômero por expressar telomerase, uma enzima que sintetiza DNA telomérico (VENTURI *et al.*, 2004).

A p53, por sua vez interpreta o encurtamento do telômero como “erros de DNA” e impede a célula de continuar a replicar levando-a a um estado de senilidade. E como, normalmente, não há telomerase na célula, ela pára de se dividir. O estado senil da célula é considerado um mecanismo de proteção anti-tumoral (VENTURI *et al.*, 2004).

A proteína E7, que também apresenta atividades transformantes, contém 98 aminoácidos, com sítios de fosforilação para a caseína quinase II nos resíduos 31 e 32 e um domínio dedo de zinco entre os aminoácidos 40 e 98. Já foram descritas várias interações entre E7 e proteínas celulares, como fatores que regulam o crescimento celular, especialmente aqueles que atuam na transição de G1 à fase S da mitose. Sua ligação à proteína da família Rb (pRb, p107 e p130), a desacetilases de histonas (HDAC), a quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e seus inibidores e a ciclinas E e A induz a proliferação celular, a imortalização e a transformação. As proteínas E6 e E7, em conjunto, são capazes de imortalizar queratinócitos e induzir a síntese de DNA de células quiescentes, sendo necessárias e suficientes a imortalização celular, embora insuficientes ao desenvolvimento do fenótipo maligno (BAKER *et al.*, 1987; MÜNGER *et al.*, 1989; SYRJÄNEN *et al.*, 1999; zur HAUSEN, 2000; MACMURRAY *et al.*, 2001).

Têm sido identificados HPV em várias lesões. Na cavidade oral, 24 tipos (HPV-1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 35, 45, 52, 55, 57, 59, 69, 72 e 73) são associados com lesões não-malignas e 12 tipos (HPV-2, 3, 6, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 57) com lesões malignas (VIDAL *et al*, 2004, SCULLY 2002, SCULLY *et al*, 2000, TERAÍ *et al* 2001, BOUDA *et al*, 2004). Desses, HPV-6 e HPV-11 apresentam um baixo risco de associação com malignidade e são chamados de benignos ou de baixo risco, enquanto outros tais como HPV-16 e HPV-18 estão fortemente associados com malignidade e são chamados de malignos ou oncogênicos ou de alto risco (TERAI *et al*, 2001, BOUDA *et al*, 2004).

O HPV, assim como o EBV, por exemplo, pode interferir na ação da p53, bem como na expressão da telomerase, trecho cromossômico que está associado ao controle do crescimento celular, induzindo à proliferação das células neoplásicas (HIGA *et al*, 2002, SCULLY 2002, SCULLY *et al* 2000, TERAÍ *et al* 2001, BOUDA *et al* 2000, MÜNGER *et al* 2004, OLIVEIRA *et al* 2003, VENTURI *et al*, 2004). Segundo OLIVEIRA *et al* (2003), as oncoproteínas virais, por exemplo, a E7 do HPV-16, são capazes de ligarem-se pRb, um outro gene que regula a transição G1/S do ciclo de divisão celular, e, portanto, inibindo a ação anti-tumoral do gene (gene de expressão supressora). Como conseqüência, as células são imortalizadas. Essa relação demonstra outro possível mecanismo pelo qual o HPV poderia contribuir para a carcinogênese (OLIVEIRA *et al*, 2003).

O papilomavírus na mucosa oral normal deve ser investigado através de estudos sobre a história natural da infecção do HPV na cavidade oral. A prevalência do papilomavírus na mucosa oral normal é controversa (BARBOSA *et al* 1991, BOUDA *et al* 2000). Observou-se na mucosa oral normal uma grande variação nas taxas detectadas de HPVs (em torno de 22% a 60% e de 0% até 81,1% em estudos induzindo vários métodos e com um número limitado de indivíduos), o que parece depender da população a ser examinada e da escolha do método (da SILVA *et al*, 2004, VENTURI *et al*, 2004). Foi sugerido que a prevalência do HPV na mucosa oral normal incluiu infecções subclínicas

e/ou latentes, e que a infecção com um baixo número de cópias do vírus é comum na cavidade oral (BOY *et al*, 2006).

A prevalência do papilomavírus humano nas lesões não malignas (papilomas de células escamosas, condilomas e verruga vulgar) da cavidade oral, obtiveram resultados significantes no trabalho realizado por CASTRO, (2006) através dos métodos IHQ(Imunohistoquímica), ISH(Hibridização *in situ*), HSB(Hibridização *southern blot*) e PCR(Reação em cadeia da polimerase), com predomínio para as formas de baixo risco.

A hibridização *in situ* (ISH) envolve um tipo específico de marcador radioativo para DNA que é complementar para detecção das seqüências de DNA do HPV. Foi o ensaio inicial escolhido para identificação do HPV antes de outras técnicas moleculares mais sensíveis inventadas (HA *et al*, 2004). Enquanto esses estudos estavam despertando o interesse dos investigadores, a validade da prevalência dos dados provenientes desses estudos é improvável. A sensibilidade desse ensaio foi encontrada por ser na ordem de 20-50 cópias por célula (Syrjanen *et al*, 1998). Entretanto, ISH depende da consistência da seqüência presente na amostra e atualmente é reconhecido que a presença do HPV DNA nas amostras de cavidade oral é inconsistente. (HA *et al*, 2004).

PCR é conhecida por ser o mais sensível ensaio de detecção do HPV DNA em quaisquer tipos de amostras (HA *et al*, 2004). *Primers* universais para conservar seqüências de DNA em HPV foram designados para reconhecimento da região L1 (também conhecidos como MY09/MY11) (HA *et al*, 2004)

A biologia do papilomavírus está diretamente associada à indução de tumores epiteliais e fibroepiteliais nos seus hospedeiros naturais, além de apresentar um tropismo específico em células epiteliais escamosas (CASTRO *et al*, 2006). A infecção produtiva do vírus, dentro da célula hospedeira, pode ser dividida em dois estágios: precoce e tardio (CORRENTI *et al*, 2004; DEDIVITIS *et al*, 2004). Tais estágios estão relacionados às etapas da diferenciação celular e é essencial sobressaltar que as lesões causadas pelo HPV contêm características

histológicas fundamentais: a) infecções cutâneas queratinizadas (aumento da epiderme, normalmente com presença de papilomatose) e b) grânulos de queratohialina (os quais são predominantes nas inclusões basofílicas intranucleares detectadas na camada superior da epiderme) (ROSEMBLATT *et al*, 2005).

O tropismo do HPV nas células epiteliais escamosas é evidenciado pelas funções de replicação viral, síntese vegetativa de DNA viral, produção de proteínas do capsídeo viral e formação dos viriões, dirigidos aos queratinócitos durante o processo de diferenciação. A expressão gênica tardia, a síntese de proteínas do capsídeo, a síntese vegetativa do DNA e a formação de viriões, ocorrem somente em células epiteliais escamosas em diferenciação terminal (CASTRO *et al*, 2004).

No HPV-31, as proteínas precoces (E) são expressas pelo promotor P_{97} , antes da replicação produtiva viral, enquanto as proteínas tardias (L) são expressas pelo promotor P_{742} durante a síntese de viriões (BOUDA *et al*, 2000, RONCO *et al*, 1998, REDEL *et al*, 2002). As proteínas E1 e E2 são necessárias para a replicação viral do DNA e formam um complexo em torno da origem de replicação (OLIVEIRA, 2003). A E2 tem sido sugerida como um repressor do promotor viral precoce, funcionando como controle no mecanismo de replicação. A E4 é expressa como proteína de fusão, com cinco aminoácidos da região N-terminal da E1 (fusão E1 e E4). A função do gene E5 ainda não é bem conhecida e provavelmente esteja associada à síntese de uma proteína membranal com atividade transformadora. As proteínas E6 e E7 são as principais responsáveis pela transformação nos HPVs de alto-risco e atuam na modulação de atividades de proteínas celulares que regulam o ciclo celular (ROBINS *et al*, 2001). Os genes tardios L1 e L2, como no BPV-1, codificam proteínas do capsídeo viral (OLIVEIRA *et al*, 2003).

A presença de HPV em mucosa normal apresenta dados bastante conflitantes em razão da variedade de métodos e dos grupos de pacientes pesquisados, sendo a reação de cadeia da polimerase (PCR) a técnica mais utilizada para a detecção do DNA do HPV em boca (SCULLY, 2002; CASTRO *et al*, 2006; HA *et al*, 2004). Em relação a sua prevalência em mucosa normal, o HPV é detectado duas a três vezes mais

em lesões pré-cancerosas e quase cinco vezes mais no carcinoma oral (FEHRMANN *et al*, 2003; FERREIRA *et al*, 2004). As formas clinicamente diagnosticadas, que apresentam relação direta ou indireta com o HPV, são:

- o papiloma escamoso, denominação genérica, usada para incluir crescimentos papilares e verrucosos. É a lesão papilar mais comum da mucosa bucal, constituindo aproximadamente 3% das lesões da boca. Sua etiologia está relacionada com o HPV-6 e 11. Esses subtipos virais têm sido identificados em até 50% dos papilomas orais (PARISE 2000).

O condiloma acuminado, é uma proliferação induzida por vírus do epitélio escamoso estratificado da genitália, região perianal, boca e laringe. Parece estar associado ao HPV-6, 11, 16 e 18, entre outros. É considerada uma doença sexualmente transmissível (DST), com lesões desenvolvendo-se no local do contato sexual ou em regiões que sofreram traumas.

A verruga vulgar é o resultado de infecção pelo HPV, cuja identificação clínica existe há mais de dois mil anos. A etiologia viral das verrugas foi demonstrada em 1907 por Ciuffo, que induziu a sua transmissão através de um filtrado livre de células. A verruga consiste em uma hiperplasia do epitélio escamoso estratificado não maligno, induzida por vírus e focal. Está associada ao HPV-2, 4 e 40. A verruga vulgar é contagiosa e pode espalhar-se por outras partes da pele ou das membranas mucosas de uma pessoa, por auto-inoculação. Não é comum na mucosa oral, mas extremamente comum na pele (PARISE apud SCULLY e PORTER, 2000).

A hiperplasia epitelial focal (doença de Heck ou Papiloma Focal ou Hiperplasia epitelial de Vírus) foi identificada como entidade distinta em 1965, sendo as lesões descritas inicialmente em índios americanos, nos Estados Unidos e no Brasil, e em esquimós. É uma lesão proliferativa localizada e induzida por vírus no epitélio escamoso oral, sendo produzida por subtipos do HPV (PARISE apud SCULLY e PORTER, 2000).

O CEC oral, em estágios precoces, é usualmente assintomático. A não ser que o paciente apresente algia (dor) ou sangramentos locais, o

que em geral ocorre em fases mais avançadas, podendo ser percebida quando ela atingir dimensões consideráveis, apesar de a cavidade oral ser local de fácil acesso ao exame físico (PARISE apud SCULLY e PORTER, 2000). O crescimento da neoplasia também pode ser gradual e ter início como uma lesão pré-maligna (eritroplasia ou leucoplasia). A mucosa bucal passa por alterações seqüenciais até conter um carcinoma espinocelular invasivo. A língua é sítio de acometimento de cerca de três quartos dos cânceres de toda a mucosa oral. Nessa região, suas formas mais comuns de apresentação clínica são a exofítica e a infiltrativa. A borda lateral é o subsítio mais freqüentemente acometido, especialmente na junção entre o terço médio e posterior, observando-se que muitas vezes o tumor estende-se para o assoalho adjacente, com invasão de sua musculatura e conseqüente fixação do órgão. Lesões do terço posterior da língua bucal também podem progredir através do músculo estiloglosso para o processo estilóide, avançar através da base da língua ou do assoalho da boca e atingir a orofaringe (ROSEMBLATT, 2005).

Na maioria dos casos, o câncer do lábio ocorre no vermelhão do lábio inferior, logo após a linha de contato com o lábio superior. Nessas localizações, a neoplasia está mais freqüentemente associada a ulcerações e desenvolvimento precoce de metástases (PARISE, 2000).

2.3 O HPV e o gene *TP53*

2.3.1.O gene *TP 53*

O gene supressor tumoral p53 encontra-se situado no braço curto do cromossomo 17 (região p13.1), tendo como seu produto de transcrição uma proteína nuclear de 53 kilodaltons (kD), denominada proteína 53 (p53) (HSIEH *et al*, 2001, KINGSLEY *et al*, 2006). No homem, apresenta peso molecular de 20 Kb, sendo constituído por 11 éxons. As regiões situadas entre os éxons 5 e 9 são denominadas de sítios específicos de mutação (HSIEH *et al*, 2001, KINGSLEY *et al*, 2006).

A proteína p53 por sua vez, é uma fosfoproteína nuclear constituída por 375 aminoácidos. A forma funcionalmente ativa

(selvagem ou *wild type*), apresenta uma estrutura molecular tetramérica, ou seja, com quatro subunidades básicas idênticas que se juntam, constituindo a forma funcionalmente ativa da molécula (HSIEH *et al*, 2001, KINGSLEY *et al*, 2006). Cada unidade básica da proteína p53 é formada por quatro domínios que representam unidades funcionais distintas: a) o primeiro segmento (região amino terminal) é composto por 80 aminoácidos, relacionado com a capacidade de transativação de outros genes; b) o segundo domínio (localizado entre os aminoácidos 100 e 300), representa a parte central sendo responsável pela capacidade de ligação com a molécula de DNA; c) na porção carboxi-terminal, localizam-se os sítios de dimerização e d) a região de tetramerização das quatro unidades básicas da molécula p53 (BEROUD *et al* 1998).

A proteína p53 foi descrita pela primeira vez em 1979 como uma fosfoproteína nuclear, formando um complexo com o antígeno T do vírus símio 40 (SV-40), sendo inicialmente referida como proteína oncogênica e em 1989 como gene supressor tumoral. Quando uma célula apresenta um alelo do gene p53 normal e outro mutado, a função da proteína p53 fica comprometida, visto que a maioria dos tetrâmeros da molécula apresentará pelo menos uma das subunidades alterada, como por exemplo, a troca de um aminoácido. A forma ativa da proteína p53 tem vida média muito curta (em torno de 6 minutos), devido a sua rápida degradação, o que torna extremamente difícil a sua detecção (BÉROUD *et al*, 1998).

Ao contrário, as formas mutadas ou inativas tendem a acumular-se no núcleo das células, podendo ser facilmente detectadas por métodos imunológicos como a imunocitoquímica, imuno-histoquímica, Western blot ou citometria de fluxo (BÉROUD *et al*, 1998). O termo "guardião do genoma" atribuído à proteína p53 é decorrente da sua função como "policia molecular", monitorando a integridade do genoma e impedindo a proliferação de células com DNA mutado. No caso de lesão no DNA por agentes físicos tais como radiação ultravioleta, raios gama ou ainda, por produtos químicos mutagênicos, o gene p53 é ativado, levando à transcrição da proteína p53. O acúmulo dessa proteína no núcleo da célula inibe o ciclo mitótico no início da fase G1 e ativa a transcrição de

genes de reparo do DNA, impedindo desta forma a propagação do erro genético para as células filhas. No entanto, se o reparo do DNA não for efetuado de forma satisfatória, a proteína p53 dispara o mecanismo de morte celular programada denominado apoptose (ROBINS *et al*, 1991, BÉROUD *et al*, 1998).

A oncoproteína E6 presente no vírus HPV de alto risco é conhecida por ligar-se e por induzir uma degradação da proteína p53 de supressão tumoral através da rota da ubiquitina (KATIYAR, 2003) (figura 3).

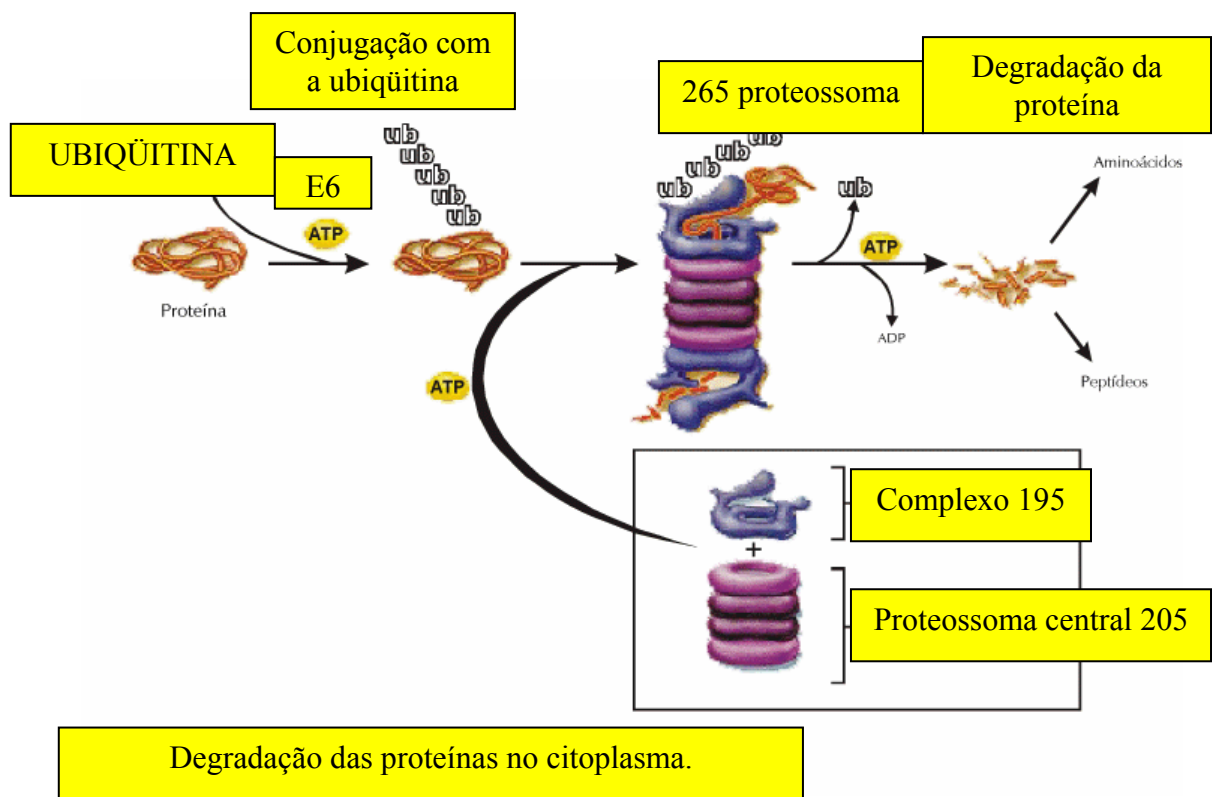


Figura 3. Via proteolítica ubiquitina-proteossomal (modificado de Mitch e Goldberg, 1996).

A degradação da proteína p53 pelo sistema da ubiquitina é causada por um polimorfismo comum do gene *TP53*, que codifica o aminoácido prolina ao invés da arginina na cadeia polipeptídica da proteína citada. Essa alteração ocorre no códon 72 do éxon 4 do gene (KATIYAR *et al*, 2003). Recentemente, foi demonstrado que a presença do homozigoto arginina no códon 72 reproduzido pela proteína p53 foi sete vezes mais

susceptível à degradação proteolítica causada pela E6, observada no câncer cervical, que àquelas que apresentavam o homozigoto prolina ou o heterozigoto arginina/prolina. Na Índia, a prevalência do HPV no desenvolvimento do câncer uterino e na cavidade oral tornou-se um dos mais altos do mundo (KATIYAR *et al* 2003) (figura 4).

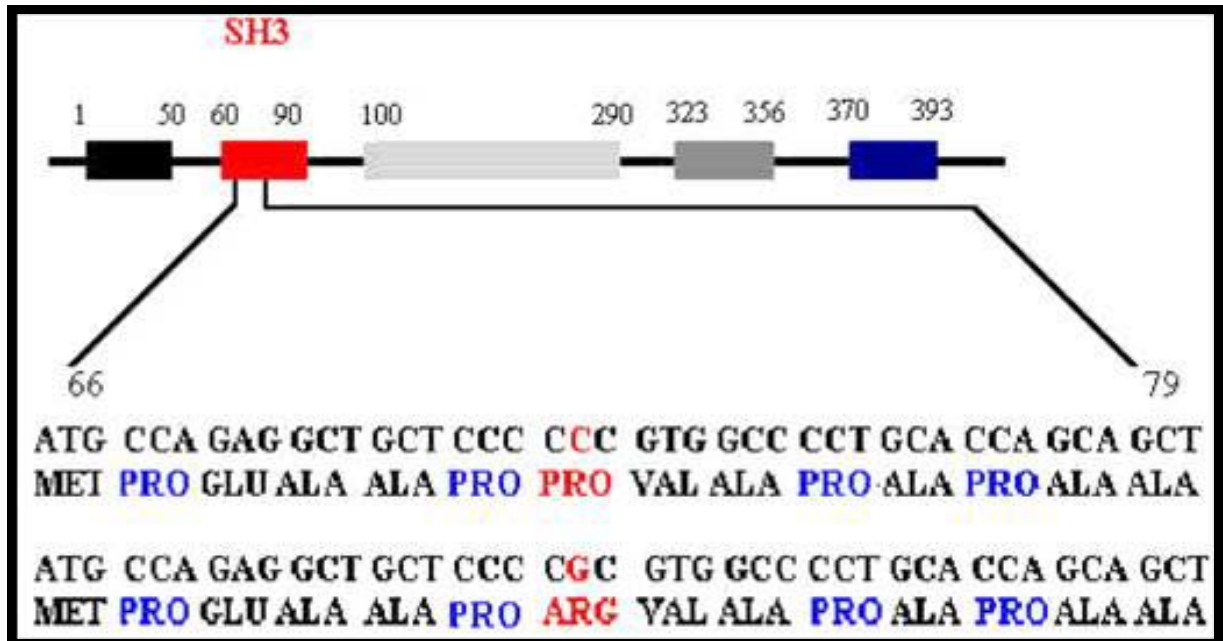


Figura 4. A alteração do códon 72. A citosina é trocada por guanina, formando uma arginina na cadeia polipeptídica. (adaptado de MATLASHEWSKI, 1987).

Os HPVs de alto risco podem induzir anormalidades pela interação de suas proteínas E6 e E7 com proteínas de circuito regulatório do ciclo celular, como a p53 e a pRB, respectivamente (zur HAUSEN, 2002). A proteína p53 desempenha um papel central na regulação das diferentes vias de sinalização que controlam as respostas celulares aos danos sofridos pelo DNA, causados por diferentes agentes. A importância da p53 nas respostas celulares aos danos do DNA é demonstrada pelo fato de que as mutações no seu gene codificador *TP53* (*tumor protein 53*) revelam a alteração genética mais comumente encontrada em cânceres humanos. Já foram detectadas mais de 15 mil mutações inativadoras em alelos do gene *TP53*. Aproximadamente 50% dos cânceres humanos

possuem mutações no *TP53* e acredita-se que em parte dos 50% restantes, a via de sinalização da p53 esteja comprometida por outros mecanismos (VOUSDEN, 2002). Como a ação gênica está associada a diversos outros fatores protéicos de ativação e inativação, como a proteína inibidora HDM2 (forma humana do gene *murine double minute 2 protein*), componente-chave na regulação da estabilidade da p53, as oncoproteínas E6 e E7 nas formas de HPV de alto risco alteram a expressão gênica e a atividade de diversas proteínas celulares incluindo as proteínas supressoras de tumor p53 e pRB, que são inativadas pelas oncoproteínas, E6 e E7, nessa ordem. A proteína E6 inativa a p53 induzindo a sua degradação (proteólise) através de um mecanismo que envolve a ubiquitinação desta última proteína. As proteínas E6 não possuem uma atividade enzimática intrínseca e exercem a sua função através da interação com proteínas celulares. Para degradar a proteína p53, as proteínas E6 ligam-se ubiquitina-ligase celular, denominada E6-AP (*E6 associated-protein*). Este complexo é capaz de se associar a p53 e recrutar o complexo de enzimas envolvidas na ubiquitinação que, por sua vez, ubiquitinam resíduos de lisina na p53, iniciado o seu processo de degradação via proteossoma celular. Acredita-se que a indução da degradação da p53 pela proteína viral E6 seja um evento-chave na imortalização celular promovida pelo HPV (FEHRMANN *et al*, 2003; ZUR HAUSEN, 2004).

O seqüestramento da p53 e da pRB e a conseqüente perda de regulação do ciclo celular parecem ser os mecanismos principais que explicam o efeito oncogênico dos HPVs. Dessa forma, é razoável supor que a inativação dos genes *TP53* e *pRB* por outros mecanismos, como mutações de ponto ou deleções, deve ser necessária nos processos de malignização sem infecção pelo vírus. Pode-se confirmar que estudos epidemiológicos mostram que há uma relação inversa entre infecção por HPV e mutações em *TP53* em carcinomas cervicais. Os tumores HPV negativos apresentam maior número de mutações no gene *TP53* e aqueles tumores que apresentam o genoma viral integrado ao genoma celular apresentam *TP53* no estado selvagem. Esses dados permitem compreender as alterações nas funções do gene *TP53* tem grande

participação no processo carcinogênico. Na presença de HPVs de alto risco, a perda da atividade apoptótica de *TP53* ocorre pela formação do complexo com E6, levando à degradação da proteína. Na ausência do vírus, a inativação de *TP53* ocorre por mutação estrutural ou regulatória ou perda alélica. Em tumores com HPVs de risco intermediário, cuja capacidade de transformação é menor que os HPVs de alto risco, há uma alta incidência de mutações em *TP53*, provavelmente como um efeito auxiliar na carcinogênese. Portanto, o seqüestramento de p53 por E6 é análogo à inativação por mutação (FEHRMANN *et al*, 2003; ZUR HAUSEN, 2004).

Nos últimos anos há um aumento considerável dos polimorfismos conhecidos no mecanismo carcinogênico. Estudos moleculares revelam que o polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* que resulta na substituição de uma arginina por uma prolina, cuja observação é comum em americanos africanos e em caucasianos (WU, 2005). A relação entre o polimorfismo do códon 72 e o risco de câncer de pulmão apresentou resultados conflitantes. Entretanto, um largo estudo de uma série de casos mostrou recentemente um aumento no risco de câncer de pulmão associado com o alelo variante prolina (WU, 2005).

As alterações genéticas citadas envolvem tanto a amplificação e ativação de protooncogenes quanto mutações que levam à perda e/ou inativação dos alelos de genes supressores de tumor (FERREIRA, 2004). Uma ou mais mutações podem ser herdadas ou podem surgir como consequência da exposição a carcinógenos ambientais ou agentes infecciosos (FERREIRA, 2004).

A oncologia viral tem contribuído para o surgimento de aproximadamente 20% de todos os cânceres humanos e, em alguns tumores, como câncer de cérvix uterino e hepatocarcinoma, os vírus são o principal agente causal (FERREIRA, 2004, FEHRMANN *et al*, 2003). Os oncogenes são formas alteradas dos protooncogenes, que podem diferir tanto na estrutura quanto na função da proteína codificada pelo seu homólogo normal e que estão envolvidos no processo de

transformação maligna. Os oncogenes foram inicialmente identificados em vírus capazes de induzir tumores em animais ou de transformar células cultivadas *in vitro* (ROSEMBLATT, 2005)

Os oncogenes presentes no genoma viral recebem a designação *v-onc* (oncogenes virais) enquanto aqueles presentes no núcleo das células animais são denominados de *c-onc* (oncogenes celulares). A ação viral já é comprovada em vários tipos de cânceres estudados e apresenta-se como um dos carcinógenos essencialmente importantes nas lesões malignas e não malignas de cavidade oral (FERREIRA 2004).

Atualmente, a maior descoberta sobre a etiologia do câncer humano tem sido o reconhecimento de que o câncer cervical é consequência de infecção por alguns tipos de HPV mucosotrópicos e alterações genéticas identificadas (VIDAL 2004, FERREIRA 2004, TERAÍ *et al* 2001, ROSEMBLATT 2005, de MOURA-GALLO *et al* 2004, CASTRO *et al* 2006). A prevalência existente entre o HPV e possíveis alterações genéticas que relacionam as oncoproteínas virais com os códons dos genes em questão, principalmente o *TP53*, sugere um envolvimento real do HPV na iniciação e progressão da neoplasia oral, mas que ainda apresenta resultados conflitantes (ROSEMBLATT 2005, de MOURA-GALLO, de SOUZA *et al*, 2004, SOUTO *et al*, 2005).

3. Objetivos

GERAL

- Verificar a implicação do HPV e do polimorfismo alelo-G no códon 72 do gene *TP53* em indivíduos com CEC oral e indivíduos sãos.

ESPECÍFICOS

1. Descrever o perfil epidemiológico dos indivíduos da amostra, buscando a associação de fatores de risco e vírus para o desenvolvimento dos cânceres orais diagnosticados;
2. Investigar a presença de HPV nas lesões de CEC oral dos pacientes e em área sã de mucosa, correspondente, do grupo controle;
3. Determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo alelo-G do gene *TP53* em pacientes e controles;
4. Avaliar o papel do polimorfismo alelo-prolina do gene *TP53* na etiopatogênese do CEC oral nas amostras estudadas.

4. Materiais e métodos

4.1 População alvo/seleção da amostra

Foram incluídos pacientes diagnosticados para carcinoma escamoso celular, atendidos na rotina do Hospital do Câncer de Pernambuco – HCPE e um grupo controle foi composto por indivíduos sem histórico de câncer, que prioritariamente fossem acompanhantes dos indivíduos alvo, pois estão teoricamente sujeitas as mesmas condições socioeconômicas. Os dois grupos foram avaliados através de um questionário epidemiológico (Anexo 1).

4.2 Coleta de material Biológico

Foram realizadas duas coletas por citologia esfoliativa com o uso de *citobrush*. A primeira foi armazenada em um tubo falcon contendo 2ml de solução de lise de membrana, para iniciar a lise da membrana celular e conservar o material em condições apropriadas para as técnicas moleculares.

4.3 Extração do DNA

A extração do DNA das amostras foi realizada pelo método “salting out”, descrito por MILLER *et al*, (1988). O protocolo utilizado tem como procedimento inicial de extração para material coletado por esfoliação de mucosa, colocar o mesmo material no tubo falcon já com 2 ml de solução de lise de membrana. O passo seguinte foi a lise de núcleo, proporcionada pela adição de solução de 200µL de lise nuclear e 50µL de SDS (dodecil sulfato sódio) a 10%, e posterior incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, uma nova adição do tampão de lise de núcleo (150µL), vortex vigoroso e mais 10 minutos de incubação a temperatura ambiente. Em seguida foi feita a lise das proteínas celulares, através da adição de 10 µL de proteínase K(20g/ µL) e incubação por 2h a 65°C ou *overnight* a 37°C. Para a precipitação e remoção das proteínas lisadas foram adicionados 175µL de solução de NaCl (5,3M), e centrifugação a 13.000rpm por 15 minutos. O sobrenadante, onde se localiza o DNA, foi transferido para outro tubo, com posterior adição de 1mL de etanol absoluto, para precipitar o ácido

nucléico. A amostra foi submetida à centrifugação por 13.000 rpm no intervalo de 10 minutos, para a formação do *pellet* de DNA. Depois, o sobrenadante foi descartado e adicionado ao tubo 1mL de etanol a 70% para iniciar a reidratação do DNA. O sobrenadante foi novamente descartado, para ser adicionado de 30µL a 100µL de solução de reidratação, TE (Tris EDTA, pH 8).

4.4 Amplificação para p53

As genotipagens foram realizadas através do método PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*), de acordo com os métodos de Pierce *et al*, 2000 adaptado.

As regiões do DNA contendo o polimorfismo no gene *TP53* foram amplificadas usando os pares de *primers*: 5'- ATC TAC AGT CCC CCT TGC CG -3' e 5'- GCAACTGACCGTGCAAGTCA-3'. A amplificação do DNA genômico foi efetuada em reação de 24 µL, num *ependorff* de 200µL, contendo 13,5µL de H₂O autoclavada; 2,5µL de PCR Buffer (10X) [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3)]; 2,0µL de dNTP (1 mM); 1,0µL de MgCl₂ (50mM); 2,5µL de *primer* 1 (2,5 pmol); 2,5µL de *primer* 2 (2,5 pmol) e 1,25 unidades (5U/µL) de enzima DNA Taq Polimerase (Master Mix), em termociclador de gradiente 96 poços da Eppendorff. Os parâmetros da PCR foram os seguintes: uma etapa inicial de desnaturação de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 95°C/1' (desnaturação), 62°C/1'30" (anelamento), e 72°C/1' (extensão), e uma extensão final por 7 min a 72°C, para garantir uma extensão completa de todos os produtos de PCR

4.5 Determinação dos polimorfismos para p53

Para a mutação no códon 72 do gene *TP53*, 10µL do produto da PCR foram digeridos em 0,2µL (10U/µL) da enzima de restrição *BstU I* 8µL de buffer (10X) (Qbiogene), a 36°C por 6h no mínimo ou overnight. Após digestão os amplicons foram separados em gel de agarose a 2% e, como a mutação altera o sítio de restrição para a referida enzima, forneceram a seguinte leitura: fragmentos de 169pb e 127pb – fenótipo

Arg/Arg (selvagem); fragmentos de 296pb – fenótipo Pro/Pro (mutante) e fragmentos de 169pb, 127pb e 296 pb – fenótipo heterozigoto.

4.6 Detecção do DNA-HPV

O DNA extraído de células obtidas das lesões foi amplificado por PCR com a utilização do primer GP5+ /GP6+. O resultado foi observado em gel de agarose 2%, usando solução tampão de Tris-acetato a 40 mmol com EDTA a 1mmol, corados por brometo de etídio a 0,5µg/ml e visualizados em transiluminador de ultravioleta (Ultralum). O produto amplificado produz fragmentos de 150 pares de base.

4.7 Aspectos Éticos

Todos os pacientes foram avaliados e foram informados de todos os critérios para a inclusão no projeto e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de ética e Pesquisa em Seres Humanos do HUOC/UPE (Anexo 3).

4.8 Análise Estatística

O estudo foi do tipo caso controle com amostras independentes constando de dados nominais (genótipo).

Para análise dos resultados foram utilizados os testes Qui-quadrado (C/ ou S/ correção de Yates), o Teste exato de Fisher e o Teste G (Williams).

A hipótese experimental foi observar alterações significativas nas distribuições genóticas entre os grupos teste e controle, bem como uma diminuição no risco ao desenvolvimento de câncer de boca na presença dos genótipos CC (Arg), CG (Arg/Pro) e GG (Pro).

A hipótese nula foi aceita, em função da distribuição genotípica que não apresentou diferença significativa ao nível de $\alpha = 0,05$ nos grupos teste e controle.

As frequências alélicas foram estimadas pelo método de contagem gênica. O equilíbrio genético e prevalência dos diferentes genótipos nos

pacientes e controles foram analisados pelo teste do χ^2 de homogeneidade, com nível de significância de 0,05.

5. Resultados

5.1 Dados quantitativos das populações humanas

Nesta pesquisa, foram analisados 24 pacientes que apresentavam CEC oral, sendo 14 (58,3%) do sexo masculino e 7 do sexo feminino (29,2%), além dos 3 (12,5%) indivíduos sem identificação. As idades dos indivíduos variaram entre 30 a 83 anos, sendo a mediana 60,0 anos e a média 59,3 anos. Dos pacientes investigados, 7 eram brancos (29,2%) e 13 não brancos (54,2%), sendo 4 (16,6%) que não apresentaram identificação. Com relação ao tabagismo, 17 (71%) eram fumantes, enquanto que 3 (12,5%) não utilizam o cigarro. Foram 4 (16,5%) os pacientes que não responderam. Analisando-se o etilismo, 11 (46%) afirmaram consumir bebidas alcoólicas, enquanto 7 (29,2%), não eram etilistas. Foram 6 (24,8%) os pacientes sem registro de respostas. Retratando-se o uso de prótese, 2 (8,3%) foram os pacientes que afirmaram usar e 8 (33,3%) dizem não possuir próteses. São 14 (58,4%) os pacientes que não apresentaram respostas (tabela 1).

Tabela 1. Dados referentes ao sexo, idade, etnia, tabagismo, etilismo e uso de prótese dos pacientes.

Parâmetros	Grupos	Total de pacientes (%)
Sexo	Masculino	14 (58,3%)
	Feminino	7 (29,2%)
Idade*	**SI	3 (12,5%)
	≥ 41	20 (83,3%)
	< 41	1 (4,16%)
Etnia	SI	3 (12,5%)
	Branco	7 (29,2%)
Fumante	Não branco	13 (54,2%)
	SI	4 (16,6%)
	Sim	17 (71%)
Etilista	Não	3 (12,5%)
	SI	4 (16,5%)
	Sim	11 (46%)
Uso de prótese	Não	7 (29,2%)
	SI	6 (24,8%)
	Sim	2 (8,3%)
	Não	8 (33,3%)
	SI	14 (58,4%)

* idade média do grupo é de 59,3 anos.

**SI = sem identificação/sem respostas

No que se refere aos controles, foram analisados 21 controles, envolvendo pessoas que não apresentavam o CEC oral. Destas, 3 pessoas eram do sexo masculino (14,3%) e 12 do sexo feminino (57,2%). As demais analisadas, 6 (28,5%) não apresentaram identificação. As idades dos indivíduos variaram entre 21 a 68 anos, sendo a mediana 35,0 anos e a média 37,2 anos. Com relação à etnia, 4 (19%) eram brancos, 9 (43%) não brancos e 4 (19%) não apresentavam identificação. Já com relação ao tabagismo, 4 (19%) eram fumantes, 10 (47,6%) não fumantes e 7 (33,4%) não apresentaram respostas. Em se tratando do etilismo, 5 (23,8%) responderam ser usuários de bebidas alcoólicas, 9 (42,9%) não consomem e 7 (33,3%) não responderam. O uso de prótese não foi verificado nos pacientes que se submeteram à pesquisa. Foram 8 (38%) que afirmaram não usar próteses dentárias. Enquanto que 13 (62%) indivíduos não responderam.

Tabela 2. Dados referentes ao sexo, idade, etnia, tabagismo, etilismo e uso de prótese dos controles.

Parâmetros	Grupos	Total de controles(%)
Sexo	Masculino	3 (14,3%)
	Feminino	12 (57,2%)
Idade*	**SI	6 (28,5%)
	≥ 41	7 (33,3%)
	< 41	13 (61,9%)
	SI	1 (4,76%)
Etnia	Branco	4 (19%)
	Não branco	9 (43%)
Fumante	SI	8 (38,0%)
	Sim	4 (19%)
	Não	10 (47,6%)
Etilista	SI	7 (33,4%)
	Sim	5 (23,8%)
	Não	9 (42,9%)
Uso de prótese	SI	7 (33,3%)
	Sim	0 (0%)
	Não	8 (38%)
	SI	13 (62%)

* idade média do grupo é de 37,2 anos.

**SI = sem identificação/sem respostas

5.2 Amplificação do DNA através da Reação em Cadeia com a Polimerase (PCR)

5.2.1. Identificação do polimorfismo do gene *TP53*

Foram realizadas 43 amplificações a partir do DNA extraído de material coletado dos pacientes com CEC oral para identificação do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53*. Dessas, em apenas 24 (55,8%) apresentavam-se com qualidade para análise, sendo as demais excluídas do estudo. Foram realizadas com sucesso 43 amplificações do material coletado dos controles, sendo que 21 (48,8%) obtiveram êxito na visualização do DNA, enquanto que as demais foram excluídas da pesquisa. A numeração das amostras foi feita segundo a relação numérica dos pacientes e controles que foi submetida aos questionários respondidos, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

A genotipagem observada revelou que 12,5% dos indivíduos com CEC oral eram CC (Arg), 71% eram CG (Arg/Pro) e 16,5% eram GG (Pro). Os controles revelaram 38,1% de indivíduos CC(Arg), 47,6% CG (Arg/Pro) e 14,3% GG (Pro) (tabelas 3 e 4) .

Tabela 3. Distribuição dos genótipos das 24 amostras com CEC oral e dos 21 controles.

	<i>CC (Arg)</i>	<i>CG (Arg/Pro)</i>	<i>GG (Pro)</i>	<i>Total</i>
Amostras com CEC oral	3 (12,5%)	17 (71%)	4 (16,5%)	24
Controles	8 (38,1%)	10 (47,6%)	3 (14,3%)	21
Total	11	27	7	45

É importante ratificar que dos indivíduos que apresentavam o CEC oral, 11,5% têm o alelo C, enquanto que 12,5% apresentaram o alelo G. Já para os controles, foram identificados 54,1% de indivíduos com o alelo C 33,3% com o alelo G.

Tabela 4. Distribuição dos alelos das 24 amostras com CEC oral e dos 21 controles.

	<i>C (Arg)</i>	<i>G (Pro)</i>	<i>Total</i>
Amostras com CEC oral	11,5 (48%)	12,5 (52%)	24
Controles	13 (61,9%)	8 (38,09%)	21

Com relação à frequência do alelo G dos indivíduos com CEC oral, 83,3% dos indivíduos estudados apresentavam o alelo, enquanto que nos controles, houve uma frequência de 75% do alelo G.

Tabela 5. Frequência de indivíduos das 24 amostras de CEC oral e dos 21 controles que apresentam pelo menos 1 alelo arginina (CC (Arg/Arg) e CG (Arg/Pro)).

	<i>CC (Arg)</i>	<i>Total</i>
Amostras com CEC oral	20 (83,3%)	24
Controles	18 (75%)	21

Já o alelo Prolina, foi observado 87,5% de frequência nos indivíduos com CEC oral e 54,1% nos controles.

Tabela 6. Frequência de indivíduos das 24 amostras de CEC oral e dos 21 controles que apresentam pelo menos 1 alelo prolina (GG (Pro) e CG (Arg/Pro)).

	<i>GG (Pro)</i>	<i>Total</i>
Amostras com CEC oral	21 (87,5%)	24
Controles	13 (54,1%)	21

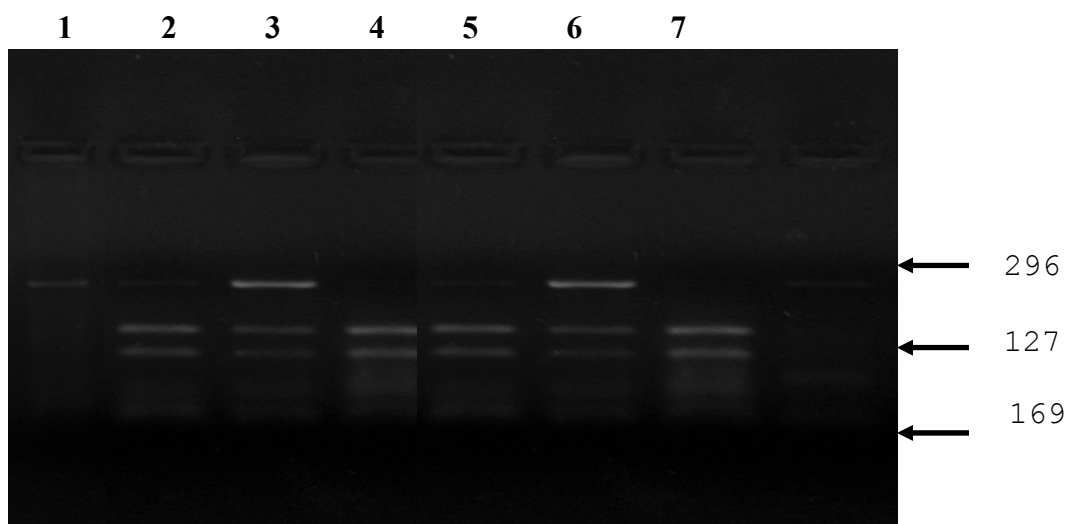


Figura 1. Gel de agarose a 2% mostrando a genotipagem de alguns pacientes com CEC oral. Na linha observa-se um Pro/Pro, na linha 6 um Arg/Pro e na linha 7 um Arg/Arg.

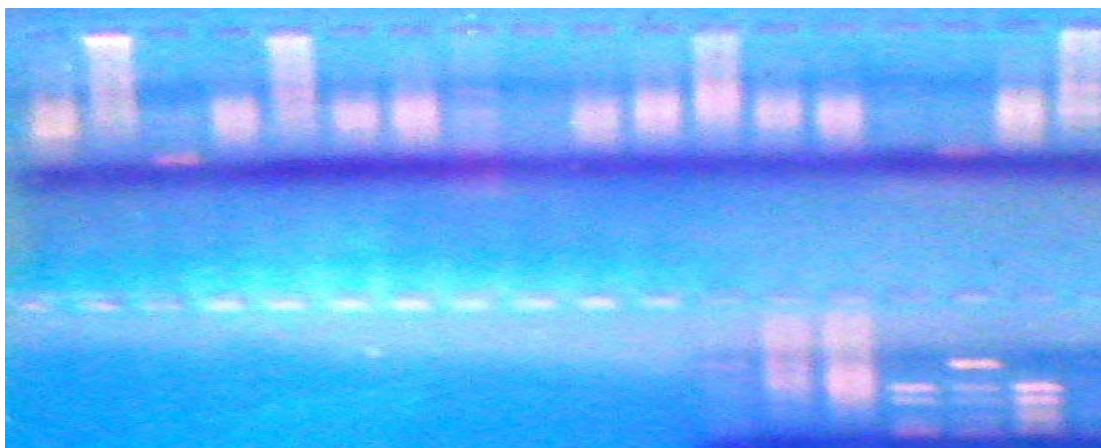


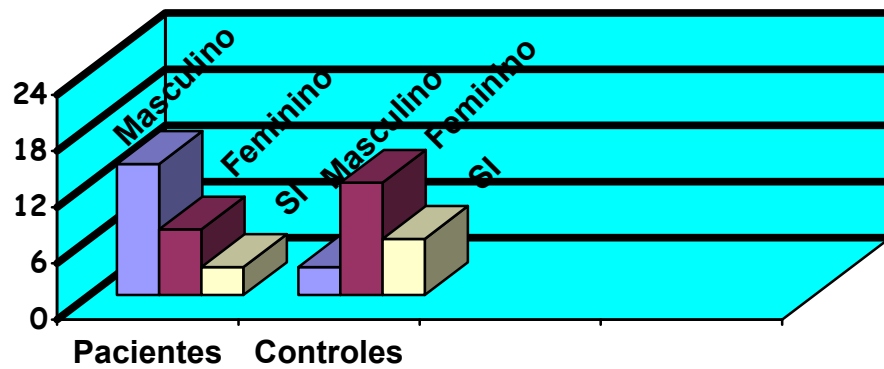
Figura 2. Gel de agarose a 2% mostrando a genotipagem do *TP53* dos controles.

5.2.2. Identificação do HPV

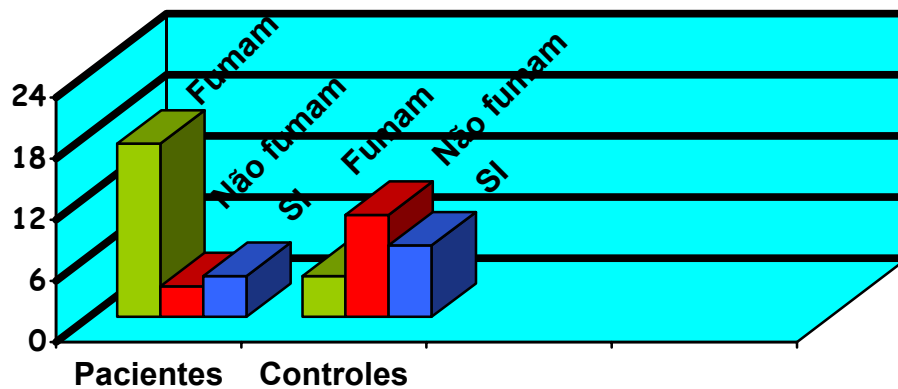
As análises da presença do HPV através da PCR utilizando-se os *primers* GP5+/6+ revelaram uma ausência do vírus, tanto nas amostras dos pacientes com CEC oral, quanto nos controles.

5.2.3. Análise estatística

As variáveis estudadas do perfil epidemiológico da população de pacientes e controles que foram submetidos ao estudo revelaram que houve significância tanto para a idade dos indivíduos ($X= 5,888$; $p=0,0152$), quanto para o tabagismo ($X^2=8,843$; $P= 0,0029$ - Fisher: $p=0,0014$). Foram analisadas estatisticamente as variáveis sexo, etnia, tabagismo, etilismo, uso de prótese, procedência, renda, escolaridade, exposição ao sol, condições médicas e a genotipagem dos pacientes e controles (gráficos 1 e 2).

Gráfico 1. Gráfico descritivo da variável gênero

* SI – sem identificação/sem respostas

Gráfico 2. Gráfico descritivo da variável tabagismo

* SI – sem identificação/sem respostas

Tabela 7. Tabela dos valores estatísticos significantes das variáveis investigadas

Variável investigada	Teste estatístico
Gênero	$X^2= 5,888$; $p=0,0152$
Tabagismo	$X^2=8,843$; $P= 0,0029$ (Fisher: $p=0.0014$)

Tabela 8. Tabela descritiva das variáveis investigadas

Variáveis	Pacientes(24)		Controles(21)		Teste Estatístico
	N	(%)	N	(%)	
Etnia: Branco	7	29,2	4	19,0	X ² Y= 0,016; P=0,8998; E<5 Fisher: p=1
Não Branco	13	54,2	9	43,0	
SI	4	16,6	4	19,0	
Etilismo: SIM	11	46,0	5	23,8	X ² Y 1,143; p=0,2850 (Fisher: p= 0,2852
NÃO	7	29,2	9	42,9	
SI	6	24,8	7	33,3	
Uso Prótese: SIM	2	8,3		0	X ² Y 0,345; p=0,5572; E<5 Fisher: p=0,4771
NÃO	8	33,3	8	38,0	
SI	14	58,4	13	62,0	
Procedência: PE	16	66,7	14	66,7	X ² =0,305; p=0,5809; E<5 Fisher: p=0,4919
Outros Estados	2	8,3		0	
SI	6	25,0	7	33,3	

* SI – sem identificação/sem respostas

Tabela 9. Tabela descritiva das variáveis investigadas

Variáveis	Pacientes(24)		Controles(21)		Teste Estatístico
	N	(%)	N	(%)	
Renda : Sem Renda	4	16,7	7	33,3	$X^2=3,314$; $p=0,1907$; $E<5$
Até 2 salários mín	12	50,0	5	23,8	
Acima 2 salários min	2	33,3	1	4,8	
SI			8	38,1	$GW=2,9805$; $p=0,2253$
Escolaridade: Analfabeto	6	25,0	3	14,3	$X^2= 4,513$; $p=0,2111$; $E<5$
Fundamental 1	6	25,0	1	4,8	
Fundamental 2	4	16,7	1	4,8	$GW= 4,1452$; $p=0,2462$
Médio	3	12,5	5	23,8	
SI	5	20,8	11	47,7	
Exposição ao sol: SIM	14	58,3	10	47,6	$X^2y=0,03$; $p=0,8629$; $E<5$ Fisher: $p=1$
NÃO	6	25,0	0	-	
SI	4	16,7	11	52,4	
Genótipos: Arg/Arg	3	12,5	8	8,1	$X^2=4,048$; $p=0,132$; $E<5$ $GW= 3,8938$; $p=0,1427$
Arg/Pro	17	71,0	10	7,6	
Pro/Pro	4	16,5	3	4,3	
SI	0		0		

* SI – sem identificação/sem respostas

6. Discussão

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus epiteliotrófico presente na etiologia de várias neoplasias, inclusive, de forma bastante discutida, no desenvolvimento do CEC oral (BOUDA *et al*, 2000; TERAJ *et al*, 2001). A relação das oncoproteínas virais, principalmente a E6 com o gene de supressão tumoral *TP53* é comprovada em diversos estudos que, inclusive, esclarecem e explicam a alteração da função gênica que culmina com a imortalização celular (HA *et al*, 2004, FRANKS, *et al*, 1990, MATLASHEWSKI, *et al*, 1987). A proteína p53, que controla o ciclo de divisão das células, é destruída pela ubiquitina proteossomal, em função da interação entre o sítio da enzima com a oncoproteína E6. A partir dessa interação, tem-se a inativação da função apoptótica da proteína supressora, tendo como principal consequência a proliferação irregular das células. (KATIYAR *et al*, 2003, SOARES *et al*, 2002, SUZICH *et al*, 1995, VOUSDEN, 2002).

Os fatores ambientais, os hábitos e até mesmo as condições sócio-econômicas dos indivíduos têm mostrado elementos essenciais na investigação da carcinogênese (ROBINS *et al*, 2001). Dessa forma, investigar os diversos co-fatores que participam como sinérgicos no comprometimento das neoplasias, principalmente no CEC oral, torna-se indispensável na compreensão dos mecanismos neoplásicos, assim como a presença do cigarro, do etilismo, que juntos correspondem aos carcinógenos mais identificados no desenvolvimento dos carcinomas orais (DEDIVITIS *et al*, 2004, VIDAL *et al*, 2004, SCULLY, 2002).

O presente estudo investigou a presença do HPV e o polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* no carcinoma escamoso (CEC) oral de indivíduos atendidos com o diagnóstico de CEC oral e nos controles. Vários são os estudos que relatam uma variedade de achados científicos com resultados distintos, confirmando, dessa forma, a importância de se verificar desde o método laboratorial utilizado, até o número de unidades experimentais da amostra. HA (2004) descreveu uma comparação entre os diversos estudos referentes à presença do HPV mediante os métodos

de investigação. Para HA, a detecção do HPV em mucosas orais normais sugere que nem todos os sub-tipos virais necessariamente induzem à carcinogênese e que seria importante identificar os fatores que os torna indutores da malignização das células. Utilizando o *consensus* PCR, OSTWALD *et al* (1994) obteve apenas uma amostra positiva para o HPV dentre 97 estudadas com relação à mucosa oral normal. Já TERAII *et al* (1999) utilizando L1 *consensus* PCR encontrou positividade viral em 26 das 37 amostras estudadas em seus estudos. Já BOUDA *et al* (2000) desenvolvendo uma *Nested* PCR não encontrou nenhum vírus de 16 amostras relatadas. É importante lembrar que os valores estão relacionados especificamente para as formas 16 e/ou 18 do HPV (HA *et al*, 2004). Por outro lado, analisando-se a prevalência do HPV em lesões pré-malignas de mucosa oral (displasias, ceratoses, leucoplasias e hiperplasias), as discrepâncias são mais evidentes. GREER *et al* (1990) utilizou a imuno-histoquímica identificou apenas 5 casos positivos para o vírus dentre os 190 indivíduos analisados. HA *et al* (2002), fazendo PCR quantitativa identificou 1 caso dentre 102 analisados. E BOUDA *et al* (2000), com a *Nested* PCR, identificou a prevalência do vírus em 29 das 34 amostras estudadas (HA *et al*, 2004). Com relação à prevalência do vírus HPV nos CEC orais, SCHWARTZ *et al* (1998), utilizando o *consensus primer* para L1 e PCR para E6, verificou apenas 22 estruturas virais dentre 193 amostras. Já BALARAM *et al* (1995) usou o *consensus* PCR e observou a presença de 67 casos positivos para o HPV dentre os 91 estudados. Todos esses dados díspares ratificam que a relação do HPV nas lesões de cavidade oral é uma realidade que deve ser cada vez mais investigada. Por outro lado, HIGA (2002) em Okinawa, Japão e KATIYAR (2003) na Índia apresentaram estudos bem significativos retratando a presença do HPV e do polimorfismo alelo-G como fatores etiológicos do CEC oral. HIGA (2002) descreve no Japão uma correlação bastante significativa da presença do HPV nas lesões de malignas de cavidade oral, confirmando a relação direta do vírus com a neoplasia. É notória a presença do polimorfismo e do vírus no CEC oral, todavia os mecanismos de carcinogênese parecem indicar uma pluralidade de outros co-fatores de relevância. Dessa forma, o tabagismo, o etilismo, a exposição ao sol, o uso de prótese, a etnia, o sexo e as condições sócio econômicas

estudadas nessa pesquisa são fatores indispensáveis e relevantes na compreensão da carcinogênese do CEC oral.

Nesta pesquisa, foram analisados 24 pacientes com CEC oral e 21 controles. Os resultados estatísticos revelaram uma significância ($p = 0,0152$) para a presença de CEC oral nos indivíduos do sexo masculino (58,3%). Além disso, foi estatisticamente significativa a presença do tabagismo ($p = 0,0029$) nas amostras de indivíduos com CEC oral. O dado obtido confirma a presença do cigarro como um potencial fator carcinogênico no desenvolvimento do CEC oral (CASTRO *et al* 2006, BOUDA *et al* 2000, VIDAL *et al* 2004, TERAJ *et al* 2001, ROSEMBLATT, 2005, VENTURI *et al*, 2004, TINOCO *et al*, 2004).

Foi feita uma comparação das amostras dos pacientes e dos controles com relação à idade dos indivíduos. A média de idade dos pacientes foi de 59.38, enquanto a média dos controles foi de 37.29. Foi aplicado o teste paramétrico Mann-Whitney que revelou confirmou uma diferença das idades dos dois grupos ($p = 0,0001$), ratificando outras pesquisas que abordam uma média de idade mais avançada dos indivíduos que apresentam o CEC oral (ABREU *et al*, 2004, CORRENTI *et al*, 2004, FEHRMANN *et al*, 2003, MADKAN *et al*, 2007).

O HPV não foi identificado nas amostras de pacientes, nem nos controles. Esse resultado apenas ratifica a necessidade de se conhecer melhor os mecanismos que estão associados ao desenvolvimento do CEC oral. O vírus HPV está claramente associado à etiologia do CEC oral (BOUDA *et al*, 2000). No entanto, a discrepância dos registros científicos e os resultados obtidos nessa pesquisa mostram a necessidade de se aprofundar os estudos, a fim de esclarecer mais precisamente a relação do HPV e do polimorfismo alelo-G no CEC oral.

O gene *TP53* apresenta polimorfismos distintos, localizados nas suas regiões codificadoras e não codificadoras, e, dentre eles, mutação de ponto localizada no códon 72, no éxon 4 tem se revelado como importante indicador da imortalização celular (zur HAUSEN, 2002, MATLASHEWSKI *et al*, 1987). A troca entre os nucleotídeos citosina pela arginina do códon 72 do gene *TP53* tem se verificado em diversos estudos que relacionam o polimorfismo como fator carcinogênico

(MATLASHEWSKI *et al* 1987, MCMURRAY *et al*, 2004). A troca entre as bases determina a expressão um aminoácido prolina e não arginina na cadeia polipeptídica. Essa alteração provoca a formação de uma proteína p53, que é normalmente supressora, e passa a ser degradada pela via ubiquitina proteossomal. Essa alteração explica o descontrole do ciclo celular e a imortalização dos tumores (MATLASHEWSKI *et al*, 1987, MCMURRAY *et al*, 2004).

A presente pesquisa não identificou uma significância estatística para a presença do mutante Pro/Pro (GG) nas amostras estudadas. Foram encontrados em 12,5% das amostras o selvagem Arg/Arg (CC), em 71%, o heterozigoto Arg/Pro (CG) e em 16,5% o mutante Pro/Pro (GG). MATLASHEWSKI (1987) foi um dos pioneiros no estudo que envolve o polimorfismo. Com os avanços da genética molecular, muitos são os polimorfismos associados ao desenvolvimento neoplásico. O polimorfismo alelo-G e o vírus HPV são descritos na carcinogênese do CEC oral e de outros cânceres. A ação sinérgica de ambos é retratada como um mecanismo bioquímico relevante na etiologia dos carcinomas orais, assim como a presença de outros diversos co-fatores que também são confirmados como agentes neoplásicos.

Acredita-se que o número de indivíduos analisados na presente pesquisa tenha sido pequeno e, desta forma, faz-se necessário avaliar um maior quantitativo de amostras para que se avalie o real papel do HPV e do polimorfismo alelo-G do gene *TP53* em pacientes com CEC oral.

7. Conclusões

- ✓ Foi observada a prevalência do CEC oral em homens com mais de 40 anos de idade.
- ✓ Foi confirmada a presença do tabagismo nos pacientes com o CEC oral, indicando seu potencial de ação carcinogênica.
- ✓ Não foi detectada a presença do HPV nas amostras analisadas de pacientes e controles.
- ✓ Não foi observada relação estatística significativa referente ao polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* alelo-G entre pacientes e controles.

8. Referências bibliográficas

1. ANTUNES, ANTÔNIO AZOUBEL; TAKANO, JOHNNY HIDENORI; QUEIROZ, TIAGO COSTA; VIDAL, AURORA KARLA de LACERDA. Perfil Epidemiológico do Câncer Bucal no CEON/HUOC/UPE e HCP. Odontologia Clínica-científica. Recife, v.2, n.3, p.181-186, set./dez., 2003.
2. ABREU, MARILDA A. M. M.; PIMENTEL, DALVA R. N.; SILVA, OLGA M. P.; BLACHMAN, ISAAC T.; MICHALANY, NILCEO S.; HIRATA, CLEONICE H.; WECKX, LUC L.M.;ALCHORNE, MAURICIO M. A.. Carcinoma espinocelular do lábio: avaliação de fatores prognósticos. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. São Paulo, v.70, n.6, p.765-70, nov./dez. 2004.
3. BAKER, CARL C.; PHELPS, WILLIAM C.; LINDGREN, VALERIE; BRAUN, MICHAEL J.; GONDA, MATTHEW A.; HOWLEY, PETER M.. Structural and Transcriptional Analysis of Human Papillomavirus Type 16 Sequences in Cervical Carcinoma Cell Lines. Journal of Virology. Maryland, v.61, n. 4, Apr., p.962-971, 1987.
4. BARBOSA, S. MIGUEL; VASS, WILLIAM C.; LOWY, DOUGLAS R.; SCHILLER, JOHN T. In Vitro Biological Activities of the E6 and E7 Genes Vary among Human Papillomaviruses of Different Oncogenic Potencial. Journal of Virology. Maryland, v.65, n. 1, Jan., p.292-298, 1991.
5. BÉROUD, CHRISTOPHE; SOUSSI, THIERRY. p53 gene mutation: software and database. Nucleic Acids Research. Paris, v.26, n.1, oct., p. 200-204, 1998.
6. BOUDA M, GOROULIS VG; KASTRINAKIS NG; GIANNOUDIS A; TSOLI E; DANASSI-AFENTAKI D; FOUKAS, PERIKLIS; KYROUDI,

ASPASIA; LASKARIS, GEORGE; HERRINGTON, SIMON; KITTAS, CHRISTOS. "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. Modern Pathology. Athens, v.13, n.6, jun. , p. 644-653, 1999.

7. BOY, SONJA; VAN RENSBURG, ESTRELITA JANSE; ENGELBRECHT, SUSAN; DREYER, LEONORA; VAN HEERDEN, MARLENE; VAN HEERDEN, WILLIE. HPV detection in primary intra-oral squamous cell carcinomas – commensal, aetiological agent or contamination? Journal Oral Pathology and Medicine. Pretoria, v. 35, n. 2, feb., p. 86-90, 2006.

8. CARMO, EMILY FRANCINI do; FIORINI, ADRIANA. Principais Técnicas Moleculares para Detecção do Papilomavírus Humano. Sábios-Ver.Saúde e Biologia. Maringá, v.2, n.1, mar./abr., p.29-31, 2007.

9. CARVALHO, M.B. de; LENZI, j.; LEHN, C.N; FAVA, A.S.; AMAR, A.; KANDA, J.L.; WALDER, F.; MENEZES, M.B. FRANZI, S.A.; MAGALHÃES, M.R de; CURIONI, O.; MARCEL S., R.; SZELIGA, J.; SOBRINHO, de A.; RAPOPORT, A. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino. Revista de Associação Médica Brasileira. São Paulo, vol.47, n.3, July/Sept., 2001.

10. CASTELLI, ERICK DA CRUZ; OTAKE, ANDRÉIA HANADA; OLIVEIRA, DEILSON ELGUI de; ROCHA, NOEME SOUZA; SALVADORI, DAISY MARIA FÁVERO; de CAMARGO, JOÃO LAURO VIANA. No mutations found in exons of TP53, H-RAS and K-RAS genes in liver of male Wistar rats submitted to a médium-term chemical carcinogenesis assay. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. São Paulo, v.38, n.3, Jul., p.175-182, 2002.

11. CASTRO, THEREZITA PEIXOTO PATURY GALVÃO; FILHO, IVO BUSSOLOTI. Prevalência do papilomavírus humano (hpv) na cavidade

oral e na orofaringe. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. São Paulo, v. 72, n.2, Março-Abril, p.272-282, 2006.

12. CASTRO, THEREZITA M.P.G.; NETO, CÍCERO E.R.; SCALA, KRYSTHIANE A.; SCALA, WANESSA, A. Manifestações orais associada ao papilomavírus humano (HPV). Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. v.70, n.4, 546-50, jul/ago.2004.

13. CASTRO, JUREMA FREIRE LISBOA de. Oncologia Oral. 1º edição Recife: Editora Universitária da UFPE, 2005.

14. CAVALCANTI, SILVIA MB; CARESTIATO, FERNANDA N.. Infecções causadas pelos papilomavírus humanos: atualização sobre aspectos virológicos, epidemiológicos e diagnóstico. DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis. Niterói, v.18, n.1, out., p.73-79, 2006.

15. CHANG, JULIA YU-FONG, DDS; LIN, MING-CHIEH, MD; CHIANG, CHUN-PIN, DDS,DMSc. High-Risk Human Ppailomaviruses May Have an Important Role in Non-Oral Habits-associated Oral Squamous Cell Carcinomas in Taiwan. American Journal of Clinical Pathologists. Taiwan, v. 120, n. 6, p. 909-916, 2003.

16. COPE, J.U. *et al.* Comparison of Hybrid Capture Tube test and PCR for Detection of Human papillomavirus DNA in Cervical Specimes. Journal of Clinical Microbiology. p. 2262 – 2265. Sept. 1997.

17. CORRENTI, M; RIVERA, H; CAVAZZA, ME. Detection of human papillomaviruses of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. Oral Diseases (2004) 10, 163–166.

18. DEDIVITIS, ROGÉRIO A., FRANÇA, CRISTIANE M. , MAFRA, ANA CLAUDIA B., GUIMARÃES, FERNANDA T. , GUIMARÃES,

ANDRÉ V. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. v.70, n.1, 35-40, jan./fev., 2004.

19. FEHRMANN F; LAIMINS, A. LAIMONES. Humana papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. Oncogene. 22:5201-7, 2003.

20. FERREIRA, CARLOS GIL; ROCHA, JOSÉ CLÁUDIO. Oncologia Molecular. São Paulo, Editora Atheneu, 2004.

21. FETT-CONTE, AGNES C.; SALLES, ANDRÉA B.C.F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. n. 24, vol. 2, 85-89, 2002.

22. GIMENO, MARGARITA, LACRUZ, CÉSAR, SALMERÓN, JOSÉ IGNACIO, ACERO, JULIO. Detección de papilomavirus humano (HPV) em carcinoma epidermoide de paladar em paciente HIV positivo. Revista Espanhola de Patologia. v.35, n.3, 331-336, 2002.

23. HA, PATRICK K; The Role of Human Papillomavirus in Oral Carcinogenesis. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. v. 15, n. 4, 188-196, 2004.

24. HABERLAND-CARRODEGUAS, C. ; FORNATORA, M. L. ; REICH, R. F.; FREEDMAN,P. D.. Detection of human papillomavirus DNA in oral inverted ductal papillomas. Journal of Clinical Pathology. 56:910-913, 2003.

25. HAUSEN, HARALD ZUR. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nature reviews. Germany, v. 2, p. 342-350, may, 2002.

26. HAUSEN, HARALD ZUR. Oncogenic DNA viruses. Oncogene, Germany, v. 20, p. 7820 ± 7823, 2001.
27. HSIEH, LING-LING; WANG, PEI-FENG; CHEN, I.-HOW; LIAO, CHUN-TA; WANG, HUNG-MING; CHEN, MING-CHI, CHANG, JOSEPH TUNG-CHIEH; CHENG, ANN-JOY. Characteristics of mutations in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma associated with betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwanese. Carcinogenesis. vol. 22, n. 9, pp.1497-1503, 2001.
28. HIGA, M; KINJO, T; KAMIYAMA, K; IWAMASA, T; HAMADA, T; IYAMA, T. Epstein-Barr virus (EBV) subtype in EBV related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island in southern Japan, compared with Kitakyushu and Kumamoto in mainland Japan. Clinical Pathology. 55;414-423, 2002.
29. HU, YINGCHUAN; MCDERMOTT, MICHAEL P.; AHRENDT, STEVENA. The p53 Codon 72 Proline Allele Is Associated with p53 Gene Mutations in Non Small Cell Lung Cancer. Clinical Cancer Reserach. New York. v.11, n.7, April, 2005.
30. IBIETA, BLANCA R; LIZANO, MARCELA; FRIAS-MENDIVIL, MAURICIO; BARRERA, JOSE L.; CARRILLO, ADELA; RUIZ-GODOY, LUZ MA.; MOHAR, ALEJANDRO. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 99:311-5, 2005.
31. KARLSEN, FRANK; KALANTARI, MINA; JENKINS, ANDY; PETERSEN, ERIK ; KRISTENSEN, GUNNAR; HOLM, RUTH; JOHANSSON, BO; HAGMAR, BJØRN. Use of Multiple PCR Primer Sets for Optimal Detection of Human Papillomavirus. Journal of Clinical Microbiology. 2095–2100, Sept., 1996.

32. KATIYAR, SANJAY; THELMA, B.K.; MURTHY, N.S.; HEDAU, SURESH; JAIN, NEERAJ; GOPALKRISHNA, V.; HUSAIN, SYED AKHTAR; DAS, BHUDEV C.. Polymorphism of the *p53* codon 72 arg/pro and the risk of HPV type 16/18-associated cervical and oral cancer in Índia. Molecular and Cellular Biochemistry. Índia, v. 252, p. 117–124, 2003.
33. KINGSLEY, KARL; JOHNSON, DEVIN; O'MALLEY, SUSAN. Transfection of oral squamous cell carcinoma with human papillomavirus-16 induces proliferative and morphological changes *in vitro*. Cancer Cell International. v. 6, n. 14, 2006.
34. KOJIMA A; MAEDA H; SUGITA Y; TANAKA S; KAMEYAMA Y. Human papillomavirus type 38 in oral squamous cell carcinomas. Oral Oncol. Japan, v.38, p. 591-596, 2002.
35. L.M. FRANKS; N.M.TEICH. Introdução à biologia celular e molecular do câncer. São Paulo, Editora Roca, 1990.
36. LOWY, DOUGLAS R.; SCHILLER, JOHN T.. Prophylactic human papillomavirus vaccines. The Journal of Clinical Investigation. v. 116, n. 5, May, 2006.
37. MADKAN, V.K.; COOK-NORRIS, R.H.; STEADMAN, M.C.; ARORA, A.; MENDOZA, N.; TYRING, S.K.. The oncogenic potential of human papillomaviruses: a review on the role of host genetics and environmental cofactors. British Journal of Dermatology. England, v. 157, p228–241, 2007.
38. MALAVAZI, IRAN, ABRÃO, EMILIANA PEREIRA, MIKAWA, ANGELA YUMICO, TAGLIAVINI, SANDRA ANTÔNIA, da COSTA, PAULO INÁCIO. Avaliação do polimorfismo no gene metilenotetrahidofolato redutase e concentração de folato e vitamina B12 em pacientes portadores do HIV-1 em tratamento com anti-

retrovirais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. São Paulo, v. 37, n. 6, p.469-475, nov-dez, 2004.

39. MAO, E-J; SCHWARTZ, S.M;DALING, J.R; ODA,D; TICKMAN, L; BECKMANN, A.M. Human papilloma viruses and p53 mutations in normal, pré-malignat and malignant oral epithelia. Pred. Oncol. V.69. p. 152-258, 1996.

40. MATLASHEWSKI, G. J.; TUCK, S.; PIM, D.; LAMB, P.; SCHNEIDER, J.; CRAWFORD, L. V.. Primary Structure Polymorphism at Amino Acid Residue 72 of Human p53. Molecular and Cellular Biology. London, v. 7, n. 2, p.961-963, February, 1987.

41. MCMURRAY, H. R.; MCCANCE, D. J.. Degradation of p53, Not Telomerase Activation, by E6 Is Required for Bypass of Crisis and Immortalization by Human Papillomavirus Type 16 E6/E7. Journal of Virology. New York, v. 78, n. 11, p. 5698–5706, June, 2004.

42. MEHROTRA, RAVI; GUPTA, ANURAG; SINGH, MAMTA; IBRAHIM, RAHELA. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. Molecular Câncer. v. 5, n.11, 2006.

43. MESQUITA, RICARDO ALVES; ANZAI, EVELYN, K; OLIVEIRA, ROGÉRIO NOGUEIRA; NUNES, FÁBIO DAUMAS. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. Pesquisa Odontológica Brasileira. São Paulo, v. 15, n. 4, p. 314-319, out./dez. 2001.

44. MILLER CS; JOHNSTONE BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1997. Oral Surgery , Oral Medical, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology. v. 1, n. 6, p.622-35, 2001.

45. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005. Disponível on line: <http://www.inca.com.br>.

46. MOURA-GALLO, CLAUDIA VITÓRIA DE; SIMÃO, TATIANA de ALMEIDA; RIBEIRO, FABIANA SIQUEIRA; ANDRADA-SERPA, MARIA JOSÉ; CARDOSO, LUÍS EDUARDO BASTOS; MENDONÇA, GULNAR AZEVEDO e SILVA. Mutações no gene TP53 em tumores malignos de mama: associação com fatores de risco e características clínico-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro. Revista Brasileira de Epidemiologia. Rio de Janeiro, v.7, n.2, 2004.

47. MÜNGER, KARL; BALDWIN, AMY; EDWARDS, KIRSTEN M.; HAYAKAWA, HIROYUKI; NGUYEN, CHRISTINE; OWENS, MICHAEL; GRACE, MIRANDA; HUH, KYUNG WON. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. Journal of Virology. 11451-11460, nov. 2004.

48. MUÑOZ, N. Prevention of cancers associated with infections agents. WHO/OMS 2001. Available at: <http://www.who.int>.

49. NASCIMENTO, ERICSON MARTINS; SPINELLI, MARILDA OSTI; RODRIGUES, CONSUELO JUNQUEIRA; BOZZINI, NILLO. Protocolo da extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 253-255, 2003.

50. NAIR, S., MR PILLAI. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. Oral Disease. n.11, 350-359, 2005.

51. NUNES, FABIO DAUMAS; de ALMEIDA, FERNANDA CAMPOS SOUZA; TUCCI, RENATA; de SOUZA, SUZANA CANTANHEDE

ORSINI MACHADO. Homeobox genes: a molecular link between development and câncer. Pesqui. Odontolo. Bras. 17(1): 94-8, 2003.

52. OIJEN, MONIQUE G. C. T.VAN; SLOOTWEG, PIETER J.. Gain-of-Function Mutations in the Tumor Suppressor Gene. Clinical Cancer Research. Vol. 6, 2138–2145, June 2000.

53. OLIVEIRA, MÁRCIO C.; SOARES, ROSILENE C.; PINTO, LEÃO P.; COSTA, ANTÔNIO DE L.L. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. Vol. 69, n. 4, 553-9,jul/ago. 2003.

54. PARISE JUNIOR, ORLANDO. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo, Editora Sarvier, 2000.

55. PIERCE, LISA M.; SIVARAMAN, LAKSHMI; LUM, WENDY CHANG, ANNETTE; DONLON, TIMOTHY; SEIFRIED, ANN; WILKENS, LYNNE R.; LAU, ALAN F.; MARCHAND, LOÏC LE. Relationships of *TP53* Codon 72 and *HRAS1* Polymorphisms with Lung Cancer Risk in an Ethnically Diverse Population. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. v. 9, p. 1199–1204, November 2000.

56. REDDEL, ROGER R. An alternative lifestyle for immortalized oral keratinocytes. J. Clin. Invest. 108:665–667 (2001).

57. ROBBINS, S.L; COTRAN,R.S; KUMAR, V. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro, 6ª edição, editora Guanabara Koogan, 1991.

58. RONCO, LUCIENNE V.; KARPOVA, ALLA Y.; VIDAL, MARC; HOWLEY, PETER M. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. Genes & Dev. n.12: 2061-2072, 1998.

59. ROSEMBLATT, CHARLES; WROCLAWSKI, ERIC ROGER; LUCON, ANTONIO MARMO; PEREYRA, ELSA AIDA GAY. HPV na Prática Clínica. Editora Atheneu, 2005.

60. SCULLY C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. Oral Oncology. n. 38:227-34, 2002.

61. SCULLY, CRISPIAN; PORTER, STEPHEN; Oral cancer. Eastman Dental Institute for Oral Health Care Sciences, University College BMJ 321:97-100, 2000.

62. SCULLY, CRISPIAN; PORTER, STEPHEN. Swellings and red, white and pigmented lesions. BMJ. 321; 225-228, 2000.

63. SCHIFFMAN, M. H.; BAUER, H. M.; HOOVER, R. N.; GLASS, A G.; CADELL, D. M.; RUSH, B. B.; SCOTT, D. R.; SCHERMAN, M. E.; KURMAN, R. J.; WACHOLDER, S.; STANTON, C. K.; MANOS, M. M. J. Natl. Cancer Inst. v. 85, p. 958-964, 1993.

64. SILVA, EMILIANA D.C.DA; SMANIOTO, RAFAELA; CAMPOS, SIMONE F.; HAAS, PATRÍCIA. Papiloma Vírus Humano: uma revisão. RBCA. vol.36 (3): 137-142, 2004.

65. SOARES, CHRISTIANE PIENNA; MALAVAZI, IRAN; dos REIS, ROSANA INÁCIO; NEVES, KARINA ANTUNES; ZUANON, JOSÉ ANTONIO SAMPAIO; BENATT, CARLOS NETO; SPOLIDÓRIO, LUIS CARLOS; OLIVEIRA DE; MARIA RITA BRANCINI. Presença do papilomavirus humano em lesões malignas de mucosa oral. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 35(5): 439-444, set-out, 2002.

66. SOUTO, RAFAEL; FALHARI, JÚLIO PESRO BORGIO; da CRUZ, APARECIDO DIVINO. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. Revista Brasileira de Cancerologia. v. 51, n. 2, 155-160, 2005.
67. SOUZA, FERNANDO A. C DE; GARCIA, BRANDÃO; ADRIANA A. H.; ALMEIDA, JANETE DIAS; ROSA, LUÍS EDUARDO BLUMER. Alterações Gênicas e Câncer Bucal – uma breve revisão. Revista Brasileira de Patologia Oral. vol. 3, n.1 20-25, 2004.
68. STOREY, ALAN; THOMAS, MIRANDA; KALITA, ANN; HARWOOD, CATHERINE; GARDIOL, DANIELA; MANTOVANI, FIAMMA; BREUER, JUDITH; LEIGH, IRENE M.; MATLASHEWSKIK, GREG; BANKS, LAWRENCE. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. Nature. V. 393, 21 MAY 1998.
69. STRAIGHT, SAMUEL W.; HINKLE, PATRICIA M.; JEWERS, RICHARD J.; McCANCEL, DENNIS J.. The E5 Oncoprotein of Human Papillomavirus Type 16 Transforms Fibroblasts and Effects the Downregulation of the Epidermal Growth Factor Receptor in Keratinocytes. Journal of Virology. 4521-4532, Aug., 1993.
70. SUZICH, JOANN A.; GHIM,SHIN-JE; PALMER-HILL, FRANCES J.; WHITE, WENDY I.; TAMURA, JAMES K.; BELLI, JUDITH A.; NEWSOME, JOSEPH A.; JENSON, A. BENNETT; SCHLEGEL, RICHARD. Systemic immunization with papillomavirus Li protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. Proc. Natl. Acad. Sci.. Vol. 92, pp. 11553-11557, December 1995.
71. SYRJÄNEN, S. HPV infections and tonsillar carcinoma. J Clin Pathol. 57:449–455, 2004.

72. TERAJ M, TAKAGI M. Human papillomavirus in the oral cavity. Oral Medicine Pathology. Tokyo, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2001.

73. THOMAS, MIRANDA; PIM, DAVID; BANKS, LAWRENCE. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. Oncogene. n.18, 7690 ± 7700, 1999.

74. TINOCO, JOSÉ ALBERTO; da SILVA, ALESSANDRA FURTADO; de OLIVEIRA, CARLOS ALBERTO BASÍLIO; RAPOPORT, ABRÃO; FAVA, ANTÔNIO SÉRGIO; de SOUZA, RICARDO PIRES. Correlação da infecção viral pelo papilomavírus humano com as lesões papilomatosas e o carcinoma epidermóide na boca e orofaringe. Revista da Associação Médica Brasileira. v. 50, n.3, 252-6, 2004.

75. TURAZZA, E.; LAPEÑA, A; SPROVIERI, O; TORRES, C. P.; GURUCHARRI, C.; MACIELA, A; LEMA, B.; GRINSTEIN, S. e KAHN, T. Low-Risk human Papillomavirus Types 6 and 11 associated with carcinomas of genital and upper aero-digestive tract. Acta Obstet. Gynecol. Scand.. v. 76, p. 271-276. 1997.

76. VENTURI, BEATRIZ R. M., PAMPLONA, ANA C. F., CARDOSO, ABEL S. Carcinoma de células escamosas da cavidade oral em pacientes jovens e sua crescente incidência: revisão de literatura. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. v.70, nº5, 679-86, set./out. 2004

77. VENTURI, BEATRIZ da ROCHA MIRANDA, CABRAL, MÁRCIA GRILLO, LOURENÇO, SIMONE de QUEIROZ CHAVES. Carcinoma de células escamosas oral – contribuição de vírus oncogênicos e alguns marcadores moleculares no desenvolvimento e prognóstico da lesão: uma revisão. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. São Paulo, v.70, n.3, p. 385-392, mai./jun., 2004.

78. VIDAL, AURORA KARLA de LACERDA; JÚNIOR, ARNALDO de FRANÇA CALDAS; de MELLO, ROBERTO JOSÉ VIEIRA; BRANDÃO,

VIRGÍNIA RIBES A.; da ROCHA, GETÚLIO ISIDORO; TAROMARU, ELIANE. HPV detection in oral carcinomas. Laboratório Médico Brasileiro de Patologia. Rio de Janeiro, v.40, n.1, p. 21-26, fevereiro 2004.

79. VOUSDEN, KAREN H. Activation of the p53 tumor suppressor protein. Biochimica et Biophysica Acta. 1602, 47-59, 2002.

80. WILLIAMS, H. K. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. J Clin Pathol: Mol Pathol. n.53:165–172, 2003.

81. XAVIER, SANDRA DORIA; FILHO, IVO BUSSOLOTI; LANCELOTTI, CARMEM LÚCIA PENTEADO. Prevalência de achados sugestivos de papilomavírus humano (HPV) em biópsias de carcinoma espinocelular de cavidade oral e orofaringe: estudo preliminar. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. v.71, n.4, 510-4, jul./ago, 2004.

82. ZAKRZEWSKA , JOANA M.. Oral Cancer. BMJ. 318; 1051-1054, 1999.

9. Anexos

9.1 – Anexo 1: Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu _____ concordo em participar da pesquisa “ALTERAÇÕES GENÉTICAS E IMPLICAÇÕES VIRAIS (HPV-DNA) NOS CARCINOMAS ESCAMOSOS ORAIS (CEC-ORAL)”, após esclarecimentos prestados pelo profissional responsável, acerca da metodologia e importância do mesmo, submetendo-me a responder um questionário, e permitindo ainda a realização de exame citológico esfoliativo em minha cavidade bucal (área de lesão) para coleta de material esfoliado visando a identificação do vírus HPV, pela técnica laboratorial de PCR com consensus primer e análise genética, além do diagnóstico citológico convencional, permitindo a publicação e divulgação oral/escrita dos resultados obtidos nesta pesquisa, com fotografias da boca, desde que omitida a minha identificação pessoal. Obtive todas as informações necessárias para poder conscientemente decidir e autorizar a minha participação na referida pesquisa, estando livre para interromper a qualquer momento minha participação neste estudo, sem nenhuma forma de prejuízo para ambas as partes.

Data/ Local

Assinatura de Consentimento

Pesquisadora responsável: Profª. Drª. Aurora Karla de L. Vidal (ICB/ UPE)

Acadêmicos (UPE): Suzana Lubambo (Odontologia).

Juliana Neves Baptista Ferreira (Odontologia)

Karinne Silva Azevedo (Odontologia)

Fernanda Souto Maior (Odontologia)

Alexandre Medeiros Bezerra (Ciências Biológicas)

Mestrando (UFPE): Aduino Almeida Neto (Anatomia, Histologia e Patologia)

Obs. O termo de consentimento utilizado envolve todas as pesquisas relacionadas ao HPV e o CEC oral.

9.2 – Anexo 2: Protocolo de pesquisa - Questionário

Prontuário nº. _____	HC Departamento de Cabeça e Pescoço
Nome:	
Idade:	anos completos Sexo: Fem 1 Masc 2
Cor:	Branco 1 Preto 2 Pardo 3
Estado Civil:	Solteiro 1 Casado/União consensual 2 Viúvo 3
Separado/Divorciado	4 Não se aplica 9
Nacionalidade:	
Procedência:	Recife 1 Camaragibe 2 Interior PE 3
RMR (Outro Município)	4 Outro Estado Brasileiro 5 Não se aplica 9
Renda familiar mensal (salário mínimo):	Sem Renda 1 Menos de 1SM 2
De 1 a 2 SM	3 Mais de 2 até 4 SM 4 Mais de 4 SM 5 Não se aplica 9
Escolaridade:	Analfabeto 1 Até 4ª série do EF1 2 5 até 8 série do EF2 3
1 ano até 3 ano do EM	4 Mais que EM 5 Não se aplica 9
Ocupação:	
Endereço/ telefone residencial:	
Nome, endereço e telefone de parente/ pessoa amiga:	
Condições médicas gerais:	Com Morbidade 1 Sem Morbidade 2
Condições buco-dentais:	
Com Proc. Infl. Visível	Sem Proc. Infl. Visível 2
Dentes Permanentes:	Hígidos: Obturados: Cariados:
Dentes Permanentes Presentes:	Ausentes: CPOD:
Dentes Decíduos:	Hígidos: Obturados: Cariados:
Dentes Decíduos Presentes:	Ausentes: CEO:
Tabagista e Etilista:	Sim 1 Não 2
Tempo:	Até 5 anos 1 Mais de 5 até 10 anos 2 Mais de 10 até 15 anos 3
Mais de 15 até 20 anos	4 Mais de 20 até 25 anos 5 Mais de 25 até 30 anos 6 Mais de 30 anos 7 Não se aplica 9
Exposição ao sol:	Sim 1 Não 2
Tempo:	Até 5 anos 1 Mais de 5 até 10 anos 2 Mais de 10 até 15 anos 3
Mais de 15 até 20 anos	4 Mais de 20 até 25 anos 5 Mais de 25 até 30 anos 6 Mais de 30 anos 7 Não se aplica 9
Presença de fatores locais traumáticos:	Sim 1 Não 2
Tempo:	Até 6 meses 1 Mais de 6 até 12 meses 2 Mais de 12 até 18 meses 3
Mais de 18 até 24 meses	4 Mais de 24 meses 5 Não se aplica 9
Uso de PPR:	Sim 1 Não 2
Localização:	Superior 1 Inferior 2 Superior e Inferior 3 Não se aplica 9
Nº de elementos dentários:	1 elem 1 De 2 até 5 elem 2 Mais de 5 elem 3 Não se aplica 9
Tempo de uso:	Até 6 meses 1 Mais de 6 até 12 meses 2 Mais de 12 até 18 meses 3 Mais de 18 até 24 meses 4 Mais de 24 meses 5 Não se aplica 9
Uso de Prótese Fixa:	Sim 1 Não 2
Localização:	Superior 1 Inferior 2 Superior e Inferior 3 Não se aplica 9
Nº de elementos dentários:	1 elem 1 De 2 até 5 elem 2 Mais de 5 elem 3 Não se aplica 9
Tempo de uso:	Até 6 meses 1 Mais de 6 até 12 meses 2 Mais de 12 até 18 meses 3 Mais de 18 até 24 meses 4 Mais de 24 meses 5 Não se aplica 9
Uso de Prótese Total:	Sim 1 Não 2

ALTERAÇÕES GENÉTICAS E IMPLICAÇÕES VIRAIS (HPV-DNA) NOS CARCINOMAS ESCAMOSOS ORAIS (CEC-ORAL)

Localização: Superior 1 Inferior 2 Superior e Inferior 3 Não se aplica 9

Nº de elementos dentários: 1 elem 1 De 2 até 5 elem 2 Mais de 5 elem 3 Não se aplica 9

Tempo de uso: Até 6 meses 1 Mais de 6 até 12 meses 2 Mais de 12 até 18 meses 3 Mais de 18 até 24 meses 4 Mais de 24 meses 5 Não se aplica 9

Área de lesão (selecionada):

Ventre de Língua 1 Dorso de Língua 2 Base de Língua 3 Ápice de Língua 4

Borda Esquerda de Língua 5 Borda Direita de Língua 6 Trígono Retromolar Direito 7

Trígono Retromolar Esquerdo 8 Mucosa Jugal Direita 9 Mucosa Jugal Esquerda 10

Assoalho Bucal 11 Rebordo Gengival Inferior Direito 12 Rebordo Gengival Superior

Direito 13 Rebordo Gengival Inferior Esquerdo 14 Rebordo Gengival Superior Esquerdo 15

Lábio Inferior 16 Lábio Superior 17 Palato Mole 18 Palato Duro 19 *Associado 20

(especificar as áreas envolvidas)

Estruturas adjacentes:

Descrição anátomo-clínica:

Diagnóstico Clínico:

Pontos a serem investigados:

MUITO OBRIGADO PELA COLABORAÇÃO!

9.3 – Anexo 3: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas em Humanos HUOC/UPE



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
Pavilhão Ovídio Montenegro – 1º andar
Rua Arnóbio Marques, 310 – Santo Amaro – 50100-130 – Recife-PE.
Fone: (81) 2101.1530 – Fone/Fax: (81) 2101.1536
E-mail: cephuoc@yahoo.com.br

Recife, 05 de setembro de 2007.

**CORREÇÃO DO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA PARA O GRAU DE MESTRE
PELA UFPE.**

Título anterior: **Investigação do Papilomavírus humano (HPV) em lesões epiteliais malignas e não-malignas de mucosa oral.** Aprovado em Reunião, dia 25/07/2007, com o parecer/CEP/HUOC 009/2006.

Mudança para título atual: **Papilomavírus humanos e o polimorfismo do códon 72 (alelo G) do gene TP53 no carcinoma escamoso oral – APROVADO *Ad Referendum*.**


COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Wilson de Oliveira Jr.
Coordenador

9.4 – Anexo 4: Parecer do Comitê de ética em pesquisa da UPE aprovando o projeto inicial e a coleta das amostras

REITORIA DA UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO



Recife, 18 de outubro de 2005.

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA GERÊNCIA DE PROJETOS DE PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UPE

O Comitê em reunião do dia **17/10/05** considerou **APROVADO**, o Projeto de pesquisa de N° **128/05**, intitulado:

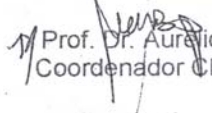
ALTERAÇÕES GENÉTICAS E IMPLICAÇÕES VIRAIS (HPV-DNA NOS CARCINOMAS ESCAMOSOS ORAIS (CEC-ORAL), que tem como pesquisadora principal:

Prof^a: **AURORA KARLA DE LACERDA VIDAL**.

RESUMO DO COMITÊ DE ÉTICA

Atendidas as exigências do CEP/UPE. O estudo não apresenta maiores riscos de agravos Éticos e está em consonância com as Resoluções do Conselho Nacional da Saúde, referentes às pesquisas que envolvem seres humanos, com a Declaração de Helsinque e com o Código de Nuremberg.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Aurélio Molina
Coordenador CEP/UPE.

9.5 – Anexo: 5 Caracterização das amostras

Tabela 1. Caracterização das 24 amostras de pacientes com carcinoma escamoso oral (CEC oral) de acordo com a idade, sexo (M=masculino e F=feminino), Etnia (B=branco, NB= não branco), Tabagismo (S=sim, N=não), Sítio da lesão, Uso de prótese (S=sim, N=não) e descrição anátomo-clínica.

Obs: S.I= Sem identificação

Identificação	Idade	Sexo	Etnia	Tabagismo	Etilismo	Sítio da lesão	Uso de prótese	Descrição anátomo-clínica
Q.A.C	77	F	B	S	–	Base da língua	S	Lesão na borda lateral e base de língua lobulada, eritematosa e infiltrativa
L.A.X	45	M	NB	S	–	Dorso da língua	–	Lesão
P.A.F	63	M	NB	S	S	Borda direita da língua	–	Área esbranquiçada, lobulada
M.C	74	F	NB	S	N	Trígono retromolar direito	–	–
S.A.F	68	M	B	S	–	Borda direita da língua	N	–
E.T	45	M	NB	S	S	Borda esquerda de língua	N	Ulcerada infiltrativa
J.J.S	42	M	B	S	S	Palato mole	N	Área leucoplásica
M.S.C	60	F	NB	S	N	Mucosa jugal esquerda	N	Infiltrativa e ulcerativa

L.M.V.S	73	M	NB	S	S	Lábio inferior	–	Lesão ulcerativa
A.M.C.F	70	F	NB	S	N	Rebordo gengival superior direito	N	Lesão exofítica no rebordo gengival superior direito, mostrando uma superfície irregular e rugosa de área eritroleucoplásica
C.O.M	66	F	B	S	S	Trígono retromolar direito	–	Ulcerada e infiltrante
A.J.S	65	M	B	S	N	Assoalho bucal	N	Brancacento, irregular e infiltrante
S.F.S	55	M	NB	S	S	Dorso da língua	–	–
S.F.B	83	M	NB	N	N	Mucosa jugal direita	–	Ulcerada e infiltrante
F.G.S	53	M	NB	S	S	Trígono retromolar esquerdo	–	Ulcerada
S.I	–	–	–	–	–	–	–	–
S.I	–	–	–	–	–	–	–	–
S.I	–	–	–	–	–	–	–	–
A.A.F	44	M	NB	S	S	Palato duro	–	Ulcerada
S.A.A	30	F	B	N	N	Trígono retromolar esquerdo	N	Área eritroleucoplásica com características ulcerativas próximo ao dorso da língua

S.F.S	60	M	NB	_	S	Trígono retromolar direito	_	Ulcerada/infiltrante
J.A.S	73	M	_	S	S	_	N	_
C.B.S	53	F	NB	S	S	Trígono retromolar direito	_	Lesão ulcerada
M.V.S	49	M	B	N	N	Lábio superior	S	Eritroleucoplásica pedunculada

Tabela 2. Caracterização das 24 amostras de pacientes analisados de acordo com a procedência (R= Recife, C= Camarigibe, In= Interior de PE, RMR= Outro município, OEB= outro estado brasileiro, NA= não se aplica), renda familiar mensal (S/R= sem renda, Menos 1sm= menos de 1 salário mínimo, 1a2 sm= de 1 a 2 salários mínimos, Mais 2a4 sm= mais de 2 e menos de 4 salários mínimos, Mais 4 sm= mais de 4 salários mínimos, NP= Não se aplica), escolaridade (Anal= analfabeto, 4ª EF1= Até a 4ª série do Ensino fundamental 1, 5ª a 8ª EF2= de 5ª a 8ª série do ensino fundamental 2, 1ª a 3ª EM= do 1º ao 3º ano do ensino médio, Mais EM= mais que o ensino médio, NP= não se aplica), exposição ao sol (S= sim, N= não), condições médicas gerais (CM= com morbidade, SM= sem morbidade).

Obs: S.I= sem identificação

Identificação	Procedência	Renda familiar	Escolaridade	Ocupação	Exposição ao sol	Condições médicas gerais
Q.A.C	In	1a2 sm	Anal	Agricultor	S	SM
L.A.X	_	_	5ª a 8ª EF2	Agricultor	S	SM
P.A.F	OEB	_	Anal	Marceneiro	N	SM
M.C	OEB	1a2 sm	Anal	Roça	S	SM
S.A.F	In	1a2 sm	4ª EF1	Sapateiro	S	SM
E.T	C	S/R	5ª a 8ª EF2	Motorista	N	SM
J.J.S	In	S/R	4ª EF1	Agricultor	S	_
M.S.C	In	1a2 sm	Anal	Dona de casa	N	_
L.M.V.S	In	1a2 sm	Anal	Agricultor	S	SM
A.M.C.F	_	1a2 sm	1ª a 3ª EM	Aposentado	N	CM
C.O.M	In	1a2 sm	4ª EF1	Mecânico aposentado	S	SM
A.J.S	In	1a2 sm	4ª EF1	Pedreiro-pintor	S	_
S.F.S	In	S/renda	Anal	Agricultor	S	SM
S.F.B	In	1a2 sm	4ª EF1	Agricultor	S	_

F.G.S	In	2a4 sm	1 ^o a3 ^o EM	Autônomo	S	SM
S.I	–	–	–	–	–	–
S.I	–	–	–	–	–	–
S.I	–	–	–	–	–	–
A.A.F	Re	S/renda	5 ^a a8 ^a EF2	–	N	–
S.A.A	In	2a4 sm	1 ^o a3 ^o EM	Vendedora	N	SM
S.F.S	In	1a2 sm	–	Agricultor	S	SM
J.A.S	In	1a2 sm	4 ^a EF1	Roça	S	–
C.B.S	In	Menos 1 sm	5 ^a a8 ^a EF2	Eletricista	S	SM
M.V.S						

Tabela 3. Caracterização das 21 amostras de controles de acordo com a idade, sexo (M=masculino e F=feminino), Etnia (B=branco, NB=não branco), Tabagismo (S=sim, N=não), Sítio da lesão e Uso de prótese (S=sim, N=não).

Obs: SI= sem identificação

Identificação	Idade	Sexo	Etnia	Tabagismo	Etilismo	Sítio da lesão	Uso de prótese
R.F.S	37	F	B	N	N	Base da língua	–
A.M.F	24	F	–	–	–	Borda direita da língua	–
E.R.L	23	F	B	N	S	Palato mole	N
A.F.S	43	F	–	N	S	Borda direita da língua	N
M.C.S	47	F	NB	N	N	Borda direita da língua	N

M.A.B.P	35	F	NB	N	N	Palato duro	N
E.P.S	28	M	NB	S	N	Lábio superior	N
H.L.M	22	M	NB	N	S	Lábio superior Rebordo gingival	N
M.S.S	37	F	B	N	S	inferior direito	N
S.M.S	49	F	NB	N	N	Base da língua Mucosa	–
A.M.M	68	F	NB	S	N	jugal esquerda Mucosa	–
T.P.F.O	45	F	NB	S	N	jugal direita Trigono	–
M.J.X	41	F	NB	S	S	retromolar direito	–
R.J.A	22	M	B	N	N	– Trígono	N
A.B.S	21	F	NB	N	N	retromolar direito Trígono	–
–	–	–	–	–	–	retromolar direito Mucosa	–
J.M.C	61	–	–	–	–	jugal esquerda Mucosa	–
R.S.G.A	23	–	–	–	–	jugal esquerda	–

J.G.M	29	-	-	-	-	Rebordo gengival inferior direito	-
M.J.S	34	-	-	-	-	Mucosa jugal esquerda	-
E.M.S	29	-	-	-	-	Mucosa jugal direita	-

Tabela 4. Caracterização das 21 amostras de controles analisados de acordo com a procedência (R= Recife, C= Camarigibe, In= Interior de PE, RMR= Outro município, OEB= outro estado brasileiro, NA= não se aplica), renda familiar mensal (S/R= sem renda, Menos 1sm= menos de 1 salário mínimo, 1a2 sm= de 1 a 2 salários mínimos, Mais 2a4 sm= mais de 2 e menos de 4 salários mínimos, Mais 4 sm= mais de 4 salários mínimos, NP= Não se aplica), escolaridade (Anal= analfabeto, 4ª EF1= Até a 4ª série do Ensino fundamental 1, 5ª a 8ª EF2= de 5ª a 8ª série do ensino fundamental 2, 1ª a 3ª EM= do 1º ao 3º ano do ensino médio, Mais EM= mais que o ensino médio, NP= não se aplica), exposição ao sol (S= sim, N= não), condições médicas gerais (CM= com morbidade, SM= sem morbidade).

Obs: SI= sem identificação

Identificação	Procedência	Renda familiar	Escolaridade	Ocupação	Exposição ao sol	Condições médicas gerais
R.F.S	In	Menos 1 sm	1ª a 2ª EM	Dona de casa	N	SM
A.M.F	–	–	–	–	–	–
E.R.L	In	S/R	1ª a 2ª EM	Agricultora	N	SM
A.F.S	R	S/R	1ª a 2ª EM	Dona de casa	N	SM
A.C.S	C	Menos 1 sm	–	Dona de casa	N	SM
M.A.B.P	In	Mais 4 sm	Mais que EM	Voluntária (antes, comerciante)	N	SM
E.P.S	In	S/R	Anal	Agricultor	S	–
H.L.M	In	S/R	Mais que EM	Estudante	S	SM
M.S	In	1a2 sm	4ª EF1	Doméstica	N	–
S.M.S	In	S/R	Anal	Dona de casa	S	SM
A.M.M	In	1a2 sm	Anal	Lavadeira	S	SM
T.P.F	In	1a2 sm	–	Agente	–	SM

administrativo						
M.J.X	In	S/R	5 ^a a8 ^a EF2	Doméstica	N	SM
R.J.A	In	–	–	–	N	–
A.B.S	In	S/renda	–	Agricultora	S	–
S.I	–	–	–	–	–	–
J.M.C	–	–	–	–	–	–
R.S.G.A	–	–	–	–	–	–
J.G.M	–	–	–	–	–	–
M.J.S	–	–	–	–	–	–
E.M.S	–	–	–	–	–	–
