



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**VAGNER GONÇALVES BERNARDO**

**ANÁLISE COMPARATIVA MOLECULAR DE  
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS  
DE DIFERENTES SÍTIOS ORAIS**

**Orientador:** Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

**RIO DE JANEIRO**  
**2013**



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**  
**Pós-Graduação em Oncologia**

**VAGNER GONÇALVES BERNARDO**

**ANÁLISE COMPARATIVA MOLECULAR DE  
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS  
DE DIFERENTES SÍTIOS ORAIS**

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como  
parte dos requisitos para obtenção do título de (Doutor)  
em Oncologia

**Orientador:** Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

**RIO DE JANEIRO**  
**2013**

B842a

Bernardo, Vagner Gonçalves.

Análise comparativa molecular de carcinomas de células escamosas diferentes sítios orais./ Vagner Gonçalves Bernardo.—Rio de Janeiro, INCA, 2013.  
xii., 117fls.: il. tab.

Tese (Doutorado em Oncologia) ---Curso de Pós-Graduação em Oncologia. \_\_\_ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2013.

Orientador: Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto.

1. Neoplasias Bucais. 2. Carcinoma de Células Escamosas. 3. CYP. 4. Gene EGFR. I. Pinto, Luis Felipe Ribeiro (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99431

Palavras-chave: 1. Neoplasias Bucais. 2. Carcinoma de Células Escamosas Oral  
3. CYP 4. Gene *EGFR*.



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia**

VAGNER GONÇALVES BERNARDO

ANÁLISE COMPARATIVA MOLECULAR DE CARCINOMAS DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS DE DIFERENTES SÍTIOS ORAIS

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto**

**Aprovada em:** 27/03/2013

**EXAMINADORES:**

Prof . Dr . Fernando Luiz Dias - **Presidente**  
Prof . Dr . Francisco José Roma Paumgarten  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cecília Amado Xavier de Oliveira  
Prof . Dr. Ricardo Guimaraes Fischer  
Prof . Dr . Miguel Angelo Martins Moreira – Suplente I  
Prof . Dr . Robson Queiroz Monteiro – Suplente II

**RIO DE JANEIRO  
2013**

**ANÁLISE COMPARATIVA MOLECULAR DE CARCINOMAS DE  
CÉLULAS ESCAMOSAS DE DIFERENTES SÍTIOS ORAIS**

**RESUMO**

**TESE DE DOUTORADO**

**Vagner Gonçalves Bernardo**

O câncer de boca é o oitavo tipo de câncer mais freqüente no Brasil, sendo o 5<sup>o</sup> mais comum entre os homens e o 11<sup>o</sup> entre as mulheres. O carcinoma de células escamosas (CCE) compreende cerca de 90 a 95% de todas as neoplasias malignas de cavidade oral. O sítio mais comum do CCE intraoral é a língua (50% dos casos). O assoalho de boca é afetado em 35% dos casos. Os demais sítios de acometimento (em ordem decrescente de freqüência) são gengiva, mucosa jugal, mucosa labial e palato duro. Tumores que ocorrem nessas diferentes localidades, apesar de possuírem a mesma histopatologia, apresentam diferentes prognósticos, sugerindo a presença de distintos perfis moleculares entre essas lesões. Os fatores de risco mais associados ao CCE oral são o consumo de tabaco e o consumo excessivo de álcool. Os carcinógenos presentes no tabaco encontram-se, na maioria das vezes, sob a forma de pré-carcinógenos, que precisam ser ativados nos tecidos para exercer suas atividades carcinogênicas. As principais enzimas responsáveis pela ativação são aquelas da família dos citocromos P450 (CYPs). Nossa hipótese é a de que existam diferenças na expressão das diferentes isoformas do citocromo P450 e um perfil diferenciado de mutação em EGFR entre os vários sítios da cavidade oral que expliquem as diferenças observadas em relação a localização dos tumores. A expressão de CYPs foi analisada por RT-PCR seguido por PCR em tempo real em tecidos orais de 5 humanos (com ou sem histórico de tabagismo e etilismo) e de modelos animais (Rato Wistar; Hamster Sirio; Camundongos BALB/c, SV129, C57BL/6) a fim de compreendermos o padrão de expressão fisiológico dessas enzimas. Os resultados mostraram uma expressão consistente de CYPs na cavidade oral de todas as espécies estudadas, com predomínio de expressão em língua e assoalho; justamente as áreas que concentram o maior número de tumores. O *CYP2E1* foi o gene mais expresso nas espécies estudadas e na maioria dos sítios. A análise do perfil mutacional de *EGFR* (*hotspots* - éxons 18 a 21) entre os sítios com diferentes prognósticos está sendo finalizada, utilizando material incluído em parafina de CCE orais de apenas um sítio. Todos os CCE orais diagnosticados em 2005/2006 no INCA foram revistos sendo identificados 161 pacientes portadores de tumores de apenas um sítio anatômico oral. Até o presente momento 61 casos foram analisados, com 11 mutações detectadas. A análise de sobrevivência mostrou que os pacientes com CCE de lábio apresentam melhor sobrevivência global e livre de doença do que os tumores de outros sítios. Além disso, os tumores de lábio foram significativamente associados a um menor tamanho. Houve associação significativa entre os tumores de assoalho com um histórico de tabagismo, de etilismo e com o sexo masculino. Os tumores de língua foram significativamente associados ao sexo feminino. Tais achados demonstram que existem diferenças consideráveis entre os tumores dos distintos sítios anatômicos da cavidade oral e indicam a necessidade de que essa variável seja corretamente ajustada nas pesquisas sobre o CCE oral.

**COMPARATIVE MOLECULAR ANALYSIS OF SQUAMOUS CELL  
CARCINOMAS FROM DIFFERENT ORAL SITES**

**ABSTRACT**  
**TESE DE DOUTORADO**

**Vagner Gonçalves Bernardo**

Oral cancer is the eighth most common cancer in Brazil, being the fifth and the eleventh most common cancer in males and females, respectively. Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) comprises approximately 95% of all oral malignant neoplasms. The most common site for intraoral carcinomas is the tongue (50% of all intraoral cancers). Carcinoma of the floor of the mouth represents 35% of all intraoral cancers. Other sites affected (in descending order of frequency) are the gingiva, buccal mucosa, labial mucosa and hard palate. Different clinical behaviors are observed comparing cancers from the various oral sites. Different prognosis were associated with lesions sharing the same histopathologic features, suggesting that these lesions, in fact, have different molecular profiles. The main risk factors associated with oral tumors are tobacco and heavy alcohol consumption. Tobacco carcinogens are in fact pre-carcinogens that require site specific metabolic activation to induce tumors. The main enzymes responsible for pre-carcinogen metabolic activation are Cytochrome P450s (CYPs). Here we hypothesize that there are differences in the expression of CYP enzymes and EGFR mutations among oral sites that may explain, at least in part, different survival and metastatic potential of tumors from different oral regions. CYP expression was analysed through RT-PCR and qPCR in different oral sites from different experimental species (Wistar rat; Syrian Hamster; BALB/c, Sv129, and C57BL/6 Mice) and 5 human beings exposed or not to tobacco smoke and ethanol. A consistent expression was found in the oral cavity of all animals studied. Tongue and oral floor had the most prominent CYP expression. A similar approach was implemented in human samples and the same finding was observed. *CYP2E1* was the mostly expressed CYP gene in oral subsites of all species. The mutation profile of EGFR (*hotspots* - exons 18 to 21) in tumors from different oral sites was done in 61 of the 161 samples from patients attended at INCA from 2005 to 2006 who presented a site specific oral tumor. Eleven mutations were identified through PCR followed by direct sequencing. Survival curves showed that patients with lower lip tumours had a significantly better overall and disease-free survival. Furthermore, lower lip tumors presented a smaller size when compared to other subsite tumors. Floor of the mouth tumours were positively associated with tobacco and alcohol consumption, being more common among men. Tongue tumours were significantly associated with females. These findings suggest significant differences among tumors from different oral sites and suggest that future studies regarding OSCC require careful adjustment for anatomical subsite.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, Rei Eterno, Imortal, Invisível, mas Real, que tem firmado meus passos nos momentos mais difíceis da caminhada e sempre me inspira a continuar.

A meu Pai **Eraldo**, minha Mãe **Marilene**, minhas irmãs **Raquel**, **Joice** e **Ana**, pilares de minha vida e maiores incentivadores, obrigado pelo AMOR dedicado a mim ao longo de toda vida. O que sou devo a Deus e a vocês. A meus cunhados pelo apoio e aos demais familiares, pelo carinho e por entenderem os momentos de ausência ao longo desses anos.

A minha avó, **Luci**, a mais amorosa de todas as avós de todo mundo, em todos os tempos.

A **Cíntia Ferraro** por todo apoio e auxílio no desenvolvimento dessa tese de doutorado.

A **Rodolpho Mattos Albano** por todo apoio e orientação. Obrigado também pelo auxílio na solução dos problemas inerentes a confecção de uma tese de doutorado.

Ao meu orientador **Luis Felipe Ribeiro Pinto**, agradeço por seu apoio, direção e pela confiança depositada em mim, ao abrir-me as portas de seu laboratório para que pudesse executar esse trabalho.

A professora **Simone de Queiroz Chaves Lourenço**, agradeço por ser exemplo de dedicação, caráter e ensino e por buscar imprimir essas marcas nas vidas daqueles com quem trabalha.

Aos **companheiros de laboratório**. Obrigado por todo auxílio e pelo ensino ao longo dos anos. Minha sincera gratidão.

Don't just take me for tryin' to be heavy,  
understand, it's time to get ready for the storm

**Stevie Ray Vaughan**

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. HIPÓTESE</b>	14
<b>3. OBJETIVOS</b>	15
<b>4. CAPÍTULO I</b>	17

## DEMONSTRAÇÃO EXPERIMENTAL DOS LIMITES DE DETECÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL

<b>5. CAPÍTULO II</b>	27
-----------------------	----

## EXPRESSÃO DE ENZIMAS DA FAMÍLIA DOS CITOCROMOS P450 EM DIFERENTES SÍTIOS ORAIS DE HUMANOS E DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

<b>5.1. MATERIAL E MÉTODOS</b>	
5.1.1 Seleção da Amostra	28
5.1.2 Metodologia	
A Extração de RNA	30
B Quantificação do RNA	30
C Reação de Transcrição Reversa	31
D Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real	31
E Purificação do Produto de PCR	33
F Eletroforese em Gel de Agarose	34
G Eletroforese em Gel de Acrilamida	34
H Clonagem em Vetor	35
I Confecção das Curvas Padrão e Quantificação Absoluta das Amostras....	37
J Critérios Utilizados no Limite de Detecção	38
<b>5.2. RESULTADOS</b>	
5.2.1. Dados Qualitativos e Quantitativos da Expressão de CYPs nos Sítios Oraís de Humanos e Animais de Laboratório	39

<b>6. CAPÍTULO III</b> .....	59
------------------------------	----

## **ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS E DE SOBREVIVÊNCIA DE PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE DIFERENTES SÍTIOS ANATÔMICOS DE CAVIDADE ORAL**

<b>6.1. MATERIAL E MÉTODOS</b>	
A Seleção da Amostra .....	60
B Dados Demográficos.....	60
C Critérios de Inclusão.....	61
D Extração de DNA.....	62
E Quantificação do DNA .....	64
F Reação em Cadeia da Polimerase .....	64
G Visualização dos Produtos Amplificados de EGFR.....	65
H Purificação do Produto de PCR .....	65
I Sequenciamento.....	66
J Análise Estatística.....	67
<b>6.2. RESULTADOS</b>	
6.2.1. Perfil Clinicopatológico dos Pacientes Portadores de Tumores de Apenas um Sítio Anatômico da Cavidade Oral no Período 2005/2006.....	68
6.2.2. Perfil Mutacional de EGFR nos Tumores de Apenas um Sítio em Cavidade Oral .....	73
6.2.3. Sobrevida dos Pacientes Portadores de Tumores de Apenas um Sítio em Cavidade Oral .....	75
<b>6.3. PERSPECTIVAS</b> .....	78
<b>7. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	79
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	91
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	93
<b>10. ANEXOS E APÊNDICES</b> .....	99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Principais famílias CYP relacionadas ao metabolismo de xenobióticos .....	9
<b>Tabela 2:</b> Condições da PCR para genes CYP: oligonucleotídeos e tamanho dos produtos em pares de base.....	32
<b>Tabela 3:</b> Critérios para análise da expressão por PCR em tempo real .....	38
<b>Tabela 4:</b> Dados referentes a quantidade e qualidade do RNA recuperado de cada sítio oral dos animais de laboratório testados .....	40
<b>Tabela 5:</b> Curvas padrão de quantificação absoluta .....	41
<b>Tabela 6:</b> Dados referentes a quantidade e qualidade do RNA recuperado de cada sítio oral em humanos .....	42
<b>Tabela 7 -</b> Expressão de CYPs em diferentes sítios da cavidade oral do camundongo BALB/c .....	43
<b>Tabela 8 -</b> Expressão de CYPs em diferentes sítios da cavidade oral do camundongo C57BL/6 .....	44
<b>Tabela 9 -</b> Expressão de CYPs em diferentes sítios da cavidade oral do camundongo SV129 .....	45
<b>Tabela 10 -</b> Expressão de CYPs em diferentes sítios da cavidade oral do rato Wistar .....	46
<b>Tabela 11 -</b> Expressão de CYPs em diferentes sítios da cavidade oral do Hamster Sírio .....	47
<b>Tabela 12 -</b> Humano 1 (Nunca fumou e não etilista). Expressão de CYPs em cavidade oral....	48
<b>Tabela 13 -</b> Humano 2 (Não tabagista e etilista). Expressão de CYPs em cavidade oral.....	49
<b>Tabela 14 -</b> Humano 3 (Não tabagista e com 15 dias de abstinência de bebidas alcoólicas) Expressão de CYPs em cavidade oral .....	50
<b>Tabela 15 -</b> Humano 4 (Não tabagista e com 15 dias de abstinência de bebidas alcoólicas) Expressão de CYPs em cavidade oral .....	51
<b>Tabela 16 -</b> Humano 5 (Tabagista e Etilista). Expressão de CYPs em cavidade oral.....	52
<b>Tabela 17 -</b> Condições das reações de PCR para amplificação de EGFR .....	65
<b>Tabela 18 -</b> Características clinicopatológicas dos pacientes portadores de lesões de apenas um sítio em cavidade oral, tratados no INCA no biênio 2005/06 .....	69
<b>Tabela 19 -</b> Descrição dos pacientes portadores de tumores sincrônicos .....	70
<b>Tabela 20 -</b> Descrição dos pacientes portadores de segundos tumores primários .....	70
<b>Tabela 21 -</b> Distribuição por sexo dos pacientes com tumores de sítio único em cavidade oral .....	70
<b>Tabela 22 -</b> Distribuição por idade dos pacientes com tumores de sítio único em cavidade oral .....	71
<b>Tabela 23 -</b> Distribuição dos pacientes com tumores de sítio único em cavidade oral de acordo com o histórico de tabagismo .....	71
<b>Tabela 24 -</b> Distribuição dos pacientes com tumores de sítio único em cavidade oral de acordo com o histórico de etilismo .....	72
<b>Tabela 25 -</b> Estadiamento clínico e patológico da amostra de pacientes com tumores de sítio único em cavidade oral .....	72
<b>Tabela 26 -</b> Casos analisados para mutação em <i>EGFR</i> até o momento .....	74
<b>Tabela 27 -</b> Mutações em <i>EGFR</i> encontradas nos casos analisados .....	74

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Subsítios anatômicos da cavidade oral .....	2
<b>Figura 2:</b> Epitélio de revestimento da cavidade oral .....	3
<b>Figura 3:</b> Esquema da ativação dos carcinógenos .....	8
<b>Figura 4:</b> Gel de agarose a 3% mostrando a clivagem do DNA plamidal com inserto pela enzima de restrição <i>Pst</i> I .....	41
<b>Figuras 5 a 12 -</b> Géis de agarose a 3% das reações de qPCR da análise de expressão de CYPs em cavidade oral de humanos .....	53
<b>Figura 13:</b> Sobrevida global dos pacientes portadores de tumores de apenas um sítio anatômico oral .....	75
<b>Figura 14:</b> Sobrevida livre de doença dos pacientes portadores de tumores de apenas um sítio anatômico oral .....	76
<b>Figura 15:</b> Perfil mutacional de TP53 entre tumores de acordo com o epicentro da lesão .....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

1. **AINES**: Anti-inflamatórios Não-Esteroidais
2. **BPDE**: benzopireno diol epóxido
3. **CCE**: Carcinoma de células escamosas
4. **cDNA**: DNA complementa
5. **CID-O**: Código Internacional de Doenças em Oncologia
6. **CYP**: Enzimas Citocromo P450
7. **DMBA**: 7,12-dimetilbenzoantraceno
8. **EGFR**: *Epidermal Growth Factor Receptor*
9. **IQ**: 2-amino-3-metilimidazol[4,5f]quinolina
10. **MNPA**: ácidos 3-(metilnitrosamino)propiónicos
11. **MNBA**: ácidos 4-(metilnitrosamino)butíricos
12. **NDMA**: *N*-nitrosodimetilamina
13. **NMOR**: *N*-nitrosomorfolina
14. **NNK**: 4-(*N*-nitrosometilamina)-1-(3-piridil)-1-butanona
15. **NNN**: *N*-nitrosonornicotina
16. **NPYR**: *N*-nitrosopirrolidina
17. **NPIP**: *N*-nitrosopiperidina
18. **NSAR**: *N*-nitrososarcosina
19. **PAH**: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
20. **PCRq**: Reação em cadeia da Polimerase Quantitativa
21. **PhIP**: 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-b]piridina
22. **RIN**: *RNA integrity number*
23. **RT-PCR**: Reação de Transcrição reversa
24. **RXT**: Radioterapia
25. **STP**: Segundos tumores primários
26. **TEMED**: N'N'N'N'tetrametiletilenodiamina
27. **QT**: Quimioterapia
28. **4-ABP**: 4-aminobifenil

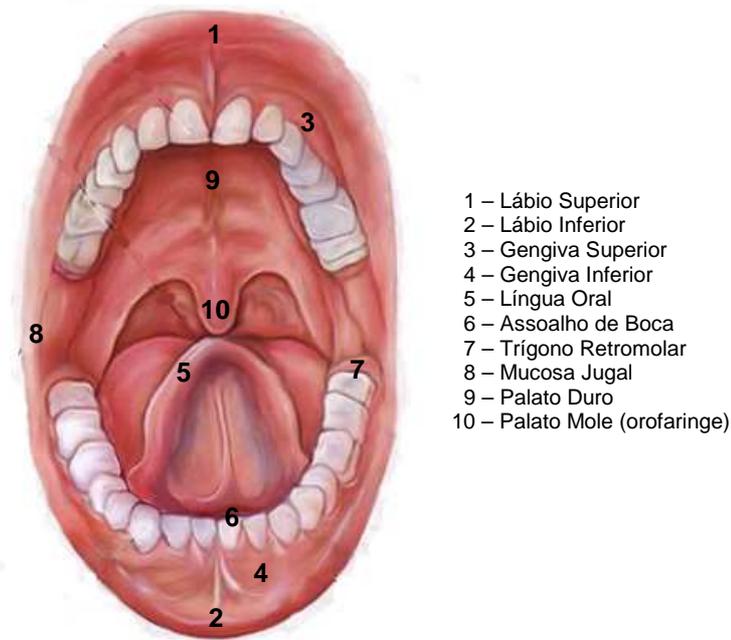


## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Segundo dados do IARC, estima-se que em 2008 o câncer de lábio e cavidade oral foi responsável por 263.020 novos casos de câncer, ocasionando 127.654 mortes, com uma prevalência mundial acumulada em cinco anos de 610.656 indivíduos. As predições para 2030 indicam 433.090 novos casos, com 215.644 mortes por tumores malignos nesses subsítios anatômicos (GLOBOCAN, 2008). Com relação a sobrevida, dados compilados de 21 registros de câncer da Europa indicam uma taxa de sobrevida em 5 anos de 48,5% no período de 1995-1999 (HASHIBE M; FERLAY J; SANKARANARAYANAN R, 2010).

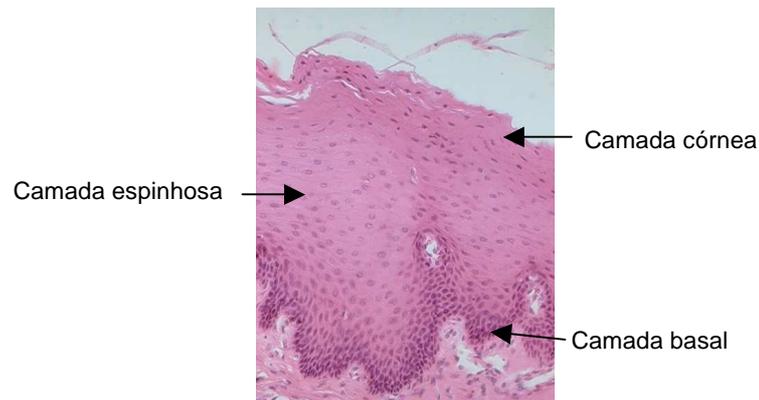
No Brasil, o câncer de boca é o oitavo tipo de câncer mais frequente e a estimativa de incidência para 2013 aponta esse tumor como o 5º mais freqüente entre os homens (com 9.900 casos estimados) e o 11º entre as mulheres (com 4.180 casos estimados – INCA, 2012). Dentre 184 nações analisadas, o Brasil ocupa a posição de número 38, sendo uma área de alta incidência de tumores malignos dessa região anatômica, com uma taxa ajustada por idade para ambos os sexos de 4,76 novos casos para cada 100.000 habitantes a cada ano (GLOBOCAN, 2008).

A cavidade oral é composta pelas seguintes regiões anatômicas: língua, assoalho de boca, gengiva inferior, gengiva superior, palato duro, lábio superior, lábio inferior, trígono retromolar e mucosa jugal (bochecha). O palato mole, apesar de sua continuidade com a cavidade oral, faz parte da orofaringe (Figura 1).



**Figura 1:** Subsítios anatômicos da cavidade oral (adaptado a partir de [medicinaedocto2015.webs.com](http://medicinaedocto2015.webs.com))

A cavidade oral é revestida em sua maior extensão por um epitélio escamoso estratificado não queratinizado. Esse epitélio encontra-se organizado em camadas, com níveis crescentes de diferenciação ao longo de sua estrutura. A camada basal, situada na porção mais profunda do epitélio é a responsável por sua renovação e pela síntese dos componentes da membrana basal, que delimita o epitélio do tecido conjuntivo subjacente. Acima dessa camada encontramos a camada espinhosa, caracterizada pela presença de numerosas pontes intercelulares. Na porção mais externa do epitélio encontramos a chamada camada córnea, de diferenciação terminal, caracterizada por células de núcleos achatados e picnóticos (Figura 2).



**Figura 2:** Epitélio de revestimento da cavidade oral (adaptado de [www.masterfile.com](http://www.masterfile.com))

O carcinoma de células escamosas (CCE) compreende cerca de 90 a 95% de todas as neoplasias malignas de cavidade oral, sendo originário desse epitélio de revestimento. O sítio intraoral mais comumente acometido pelo CCE é a língua (50% dos casos). O assoalho de boca é afetado em 35% dos casos. Os demais sítios de acometimento (em ordem decrescente de frequência) são gengiva, mucosa jugal, mucosa labial e palato duro (NEVILLE BW *et al*, 2008). É interessante notar que a grande maioria dos tumores ocorre em uma área que compreende apenas 10% da superfície da mucosa oral (KADEMANI D, 2007). Tumores que ocorrem nessas diferentes localidades apresentam comportamentos diferentes de modo que os tumores localizados no lábio inferior exibem os melhores prognósticos (PINDBORG JJ *et al*, 1997).

Pacientes com câncer de boca apresentam risco para o surgimento de um segundo tumor primário no trato aerodigestivo superior, fato esse ocorrendo em 10 a 35% dos casos (JOHNSON N *et al.*, 2005). Os tumores de assoalho são os mais associados ao desenvolvimento de uma segunda malignidade primária (NEVILLE BW *et al*, 2008). Os segundos tumores primários em pacientes com câncer de cabeça e pescoço decorrem da formação do campo de cancerização ao longo da mucosa de revestimento do trato aerodigestivo superior, exposta ao longo de toda sua extensão aos mesmos fatores de risco que levaram ao surgimento do tumor primário (SLAUGHTER DP; SOUTHWICK HW; SMEJKAL W, 1953). O risco relativo para cânceres primários múltiplos é maior em pacientes jovens, naqueles que continuam a fumar e ingerir álcool após o tratamento e nos tratados com radioterapia exclusiva (WARNAKULASURIYA S, 2009). O surgimento de segundos

tumores primários têm impacto direto na mortalidade dos pacientes com tumores de cabeça e pescoço (WARNAKULASURIYA KAAS, ROBINSON D; EVANS H, 2003).

Uma avaliação de 320 pacientes portadores de CCE intraoral matriculados no INCA em 1999 mostrou um predomínio de pacientes do sexo masculino, tabagistas e etilistas. A língua foi o sítio mais comum de acometimento, seguido pelo assoalho de boca, em um padrão exatamente como o esperado. O estadiamento clínico demonstrou associação significativa com a localização em mucosa jugal ( $p=0,029$ ), gengiva inferior ( $p=0,015$ ) e palato duro ( $0,013$ ) – com grande parte dos tumores nessas localizações em estágios III ou IV. Já o óbito demonstrou associação com a localização em gengiva inferior ( $p=0,048$ ). Os pacientes cujos tumores estavam localizados tanto em palato duro quanto em mucosa jugal apresentaram pior sobrevida global. As sobrevidas médias foram 16,2 meses e 13,9 meses para palato duro ( $p=0,0057$ ) e mucosa jugal ( $p= 0,0045$ ), respectivamente. Quando submetidas a análise multivariada, pelo modelo de regressão de Cox, verificou-se que apenas o tamanho (T do TNM clínico), linfonodos (N do TNM clínico) e localização em mucosa jugal foram consideradas variáveis independentes relacionadas à sobrevida global, sendo que pacientes com tumores T3 ou T4, com linfonodos acometidos e aqueles localizados em mucosa jugal apresentaram pior sobrevida (HONORATO J *et al*, 2009).

COSTA *et al.*, em 2002, observaram que a maioria dos casos classificados como T1 acometeram o lábio inferior e à medida que ia aumentando o estadiamento clínico, o número de casos dessa localização diminuía proporcionalmente. Além disso, a maioria dos casos que acometeram a língua e assoalho bucal foram classificados clinicamente como T4. Tumores T2 de língua e assoalho têm sido tratados com remoção cirúrgica e esvaziamento cervical mesmo quando N0 (cl clinicamente ou por exame de imagem). Tal conduta diferenciada baseia-se no fato de que existe uma alta probabilidade desses tumores gerarem metástases ocultas no pescoço (MILAS Z; MYERS J; CAULIN C, 2010).

Dessa forma, esses diferentes prognósticos associados a tumores que compartilham da mesma histopatologia sugerem a presença de diferentes mecanismos moleculares, que podem ser consequência da ativação diferenciada de carcinógenos entre os sítios orais.

Os tumores de cavidade oral estão fortemente associados ao uso de tabaco e álcool, podendo ser considerados os mais importantes fatores de risco não só para os tumores intraorais, mas também para a maioria dos tumores de cabeça e pescoço. Um efeito mais que multiplicativo para o risco de desenvolvimento de um câncer de cabeça e pescoço foi observado com o consumo diário de tabaco e álcool. O risco populacional atribuível para o uso de tabaco e álcool nos tumores de cavidade oral é de 64%, indicando que quase dois terços dos casos poderiam ser evitados com a remoção desses dois fatores de risco (HASHIBE M, 2010). Já os tumores localizados no lábio inferior estão relacionados aos níveis de exposição à radiação ultravioleta (PINDBORG JJ *et al*, 1997). Dessa forma a exposição a fatores etiológicos distintos pode justificar os diferentes prognósticos observados entre os tumores de lábio e os de cavidade oral.

O tabagismo é responsável por mais mortes por câncer no mundo do que a soma de todas as outras causas conhecidas de câncer. Cerca de 4 milhões de mortes ao ano por câncer são causadas pelo tabaco (IARC, 2004. Disponível em <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs>). O uso de tabaco inclui o fumo de produtos derivados do tabaco (como cigarros, charutos e cachimbo) e o hábito de mascar tabaco ou inalar tabaco (o chamado tabaco sem fumaça). O tabaco sem fumaça é muito comum em países como a Índia e outros do sudeste asiático. Mais de 600 milhões de pessoas em todo o mundo mascam o chamado *betel quid* (tablete de betel, composto de nozes da palmeira areca, folha de betel, cal hidratada e folha de tabaco), consumido devido a seus efeitos psicoestimulantes. O risco para o câncer oral associado ao *betel quid* chega a 8% na Ásia (NEVILLE BW *et al*, 2008).

No Brasil, os tumores de cavidade oral estão fortemente associados ao tabagismo e etilismo (HONORATO J *et al.*, 2009). Apesar do HPV recentemente ter sido fortemente associado ao CCE de orofaringe (GILLISON M, 2009), nenhum vírus foi comprovadamente envolvido na etiopatogenia do câncer oral (NEVILLE BW *et al.*, 2008).

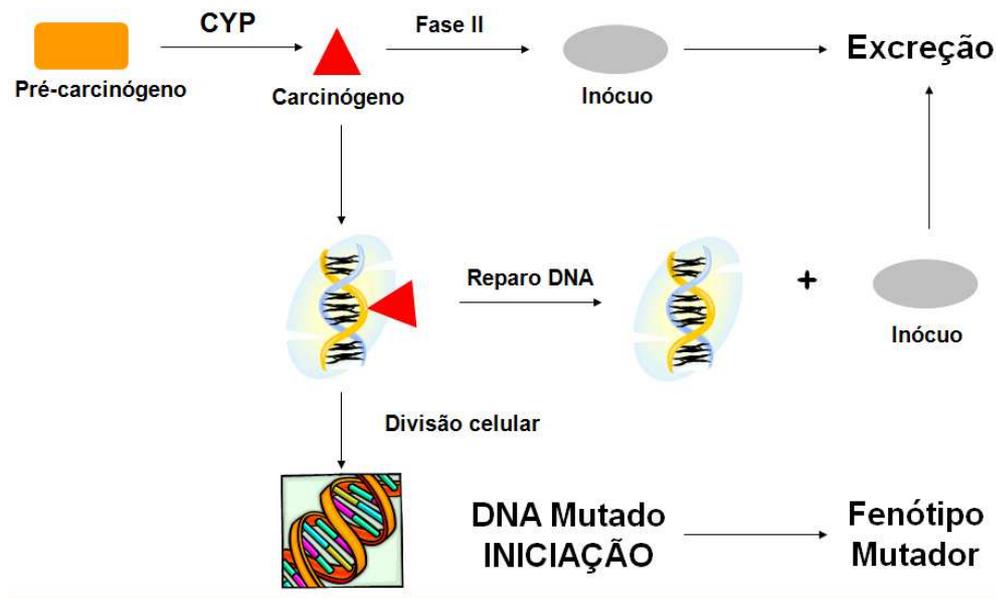
Tanto o tabaco quanto a fumaça do tabaco apresentam matrizes extremamente complexas, formadas de milhares de compostos. Um total de 3044 constituintes foram isolados do tabaco e 3996 da fluxo principal da fumaça do cigarro, inalado a partir da extremidade do cigarro que é colocada na boca. Pelo menos 69 carcinógenos podem ser identificados na fumaça do cigarro. Esses carcinógenos incluem 10 espécies de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH), seis hidrocarbonetos heterocíclicos, quatro hidrocarbonetos voláteis, três nitrohidrocarbonetos, quatro aminas aromáticas, oito aminas N-heterocíclicas, dez N-nitrosaminas, dois aldeídos, 10 compostos orgânicos de classes variadas, nove compostos inorgânicos e três compostos fenólicos. Onze compostos (2-naftilamina, 4-aminobifenil, benzeno, cloreto de vinila, óxido de etileno, arsênico, berílio, compostos de níquel, cromo, cádmio e  $^{210}\text{Po}$ ) são classificados como carcinógenos humanos do grupo 1 pelo IARC e estão presentes no fluxo principal da fumaça do cigarro. O foco da pesquisa em carcinógenos no tabaco e na fumaça do tabaco tem sido sobre o benzopireno (um protótipo dos PAH), N-nitrosaminas específicas do tabaco, especialmente N-nitrosornicotina (NNN) e 4-(N-nitrosometilamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) e aminas aromáticas, especialmente 4-aminobifenil (4-ABP), devido a seus estabelecidos potenciais carcinogênicos. (IARC, 2004. Disponível em <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs>).

Pelo menos 28 carcinógenos já foram identificados no tabaco sem fumaça. O grupo principal e mais abundante de carcinógenos presentes no tabaco sem fumaça são as N-nitrosaminas não voláteis derivadas de alcalóides específicas do tabaco e ácidos N-nitrosoaminos. Outros carcinógenos presentes no tabaco sem fumaça incluem N-nitrosaminas voláteis, certos aldeídos voláteis, traços de certos PAH tais como o benzopireno, certas lactonas, uretano, metais,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{235}\text{U}$  e  $^{238}\text{U}$ . Existem três tipos principais de compostos nitrosos no tabaco sem fumaça: (a) N-

nitrosaminas não voláteis derivadas de alcalóides específicas do tabaco, incluindo NNK e NNN, (b) ácidos *N*-nitrosaminos, incluindo *N*-nitrososarcosina (NSAR), ácidos 3-(metilnitrosamino)propiônicos (MNPA) e 4-(metilnitrosamino)butíricos (MNBA); e (c) *N*-nitrosaminas, incluindo *N*-nitrosodimetilamina (NDMA), *N*-nitrosopirrolidina (NPYR), *N*-nitrosopiperidina (NPIP) e *N*-nitrosomorfolina (NMOR) (IARC, 2007).

Os pré-carcinógenos presentes na fumaça do cigarro e em outras fontes de exposição precisam ser ativados metabolicamente dentro das células em carcinógenos finais para induzirem mutações. Esses carcinógenos apresentam uma meia-vida muito curta, de modo que apenas reagem com as macromoléculas presentes no local onde são formados. Dessa forma, somente são propensos a desenvolverem tumores causados por pré-carcinógenos os tecidos que expressam enzimas que ativam os pré-carcinógenos e os transformam em carcinógenos finais.

As principais enzimas responsáveis pela ativação dos carcinógenos pertencem a superfamília de mono-oxigenases Citocromo P450 (CYP). As enzimas CYP são capazes de metabolizar uma ampla variedade de substratos. Os CYPs são enzimas de fase I do metabolismo de xenobióticos, estando sempre ligadas a membranas, predominantemente no retículo endoplasmático e na mitocôndria. Através das reações catalisadas por eles, muitos compostos potencialmente carcinogênicos sofrem modificações químicas que resultam em ativação metabólica (HASLER JA, 1999). Na grande maioria das vezes, esses carcinógenos ambientais são oxidados por enzimas de Fase I gerando intermediários reativos (agentes eletrofílicos) que podem se ligar ao DNA formando adutos (HASLER JA, 1999). Por outro lado, as enzimas da Fase II da biotransformação catalisam a conjugação de substratos endógenos hidrossolúveis aos metabólitos reativos, inativando-os e facilitando sua excreção (DALY AK, 2003). Complementarmente, uma série de processos de reparo de DNA previnem na maioria das vezes que os adutos levem a mutações que poderão contribuir para o aparecimento de tumores (Figura 3).



**Figura 3:** Esquema da ativação dos carcinógenos

Dessa forma, tais enzimas desempenham papéis importantes no metabolismo de substâncias tanto endógenas quanto de xenobióticos, caracterizando-se como as principais enzimas responsáveis pelo metabolismo desses últimos (NEBERT DW; DALTON TP, 2006). A extensa lista de substratos metabolizados por CYPs inclui ácidos graxos, esteróides, prostaglandinas e uma infinidade de compostos exógenos tais como drogas, anestésicos, solventes orgânicos, etanol, produtos de hidrocarbonetos alquil e aril, pesticidas e carcinógenos (BERNHARDT R, 2006).

Um grande número de isoenzimas CYP tem sido identificado e classificado em famílias e subfamílias gênicas baseado na similaridade entre suas seqüências primárias de aminoácidos (KUROSE K *et al*, 1998). Cada gene dessa superfamília recebe a denominação CYP, seguida de um número e uma letra. O número está associado a família gênica enquanto a letra representa sua subfamília gênica. Os genes dentro de cada subfamília recebem uma numeração que finaliza a sua identificação. Para que dois genes pertençam a mesma família eles precisam de uma similaridade na sua seqüência de aminoácidos superior a 40%. Para que

ocupem a mesma subfamília essa similaridade precisa ser maior que 55%. Sequências que tenham uma similaridade maior que 97% são considerados como alelos, a menos que existam evidências que demonstrem o contrário (DANIELSON PB, 2009) As famílias das mono-oxigenases CYP humana, de camundongo e do rato contêm 60, 103 e 89 membros, respectivamente (NELSON DR, 2009).

As famílias 1, 2 e 3 correspondem a cerca de metade do número total de CYPs em mamíferos (CHOUDHARY D *et al.*, 2005). A tabela abaixo mostra as isoformas atualmente descritas em três espécies de animais de laboratório e no homem. Tais dados (exceto os do hamster) estão disponíveis em <http://drnelson.uthsc.edu/cytochromeP450.html> (acessado em 19/02/2013).

**Tabela 1:** Principais famílias CYP relacionadas ao metabolismo de xenobióticos

	CYP1	CYP 2	CYP 3
Camundongo	1a1, 1a2, 1b1	2a4,2a5,2a12, 2a21, 2a22,2b9, 2b10, 2b13, 2b19, 2b23, 2c29, 2c37, 2c38, 2c39, 2c40, 2c44, 2c50, 2c52, 2c54, 2c55, 2c65, 2c66, 2c67, 2c68, 2c69, 2c70, 2d9,2d10, 2d13, 2d22, 2d26, 2d34, 2d38, 2d40, 2e1, 2f2, 2g1,2j5, 2j6, 2j7, 2j8, 2j9, 2j11, 2j12, 2j13, 2r1, 2s1, 2t4, 2u1, 2w1	3a11, 3a13, 3a16, 3a25, 3a41, 3a44, 3a57, 3a59
Rato	1A1,1A2, 1B1	2A1,2A2,2A3,2B1,2B3, 2B12,2B21, 2C6, 2C7, 2C11 2C12,2C13, 2C22,2C23,2C24 2C79, 2C80, 2D1,2D2, 2D3,2D4,2D5, 2E1,2F4, 2G1, 2J3, 2J4, 2J5, 2J10, 2J16, 2R1, 2S1, 2T1, 2U1, 2W1, 2AB1, 2AC1	3A2,3A9, 3A18,3A23, 3A62, 3A73, 3A85
Hamster	1A1,1A2	2A8,2A9,2A16,2C25,2C26, 2C27, 2C28,2D20,2E1	3A10
Humanos	1A1,1A2, 1B1	2A6,2A7,2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6,2E1,2F1, 2J2, 2R1, 2S1, 2U1, 2W1	3A4,3A5, 3A7,3A43

A família CYP1 encontra-se fortemente associada a ativação de pré-carcinógenos, sendo induzíveis por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, alguns dos quais encontram-se presentes na fumaça do cigarro (p.ex. benzo[a]pireno e o dibenzoantraceno). O substrato endógeno de CYP1A1 é desconhecido e, em seres humanos, esta enzima é fracamente expressa no fígado, assim como observado no rato e no camundongo. No ser humano, o gene que codifica o CYP1A1 dista cerca

de 25kb de distância de CYP1A2 no cromossomo 15. O CYP1A2 é o principal representante dessa família no fígado, sendo envolvido na metabolização de aminas aromáticas presentes em alimentos cozidos e na fumaça do cigarro (2-amino-3-metilimidazol[4,5f]quinolina – IQ; e 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-b]piridina - PhIP), enquanto o CYP 1B1 está relacionado ao metabolismo de aminas heterocíclicas (LEWIS, 2001). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos gerados pela combustão incompleta de material orgânico durante o fumo estão implicados diretamente como componentes carcinogênicos da fumaça do cigarro. Após ativação metabólica do benzopireno a benzopireno diol epóxido (BPDE) pelo CYP1A1, o mesmo liga-se diretamente ao DNA gerando adutos na posição N2 da guanina (BUNZ F, 2008).

A família CYP2 é responsável pelo metabolismo de várias drogas e de alguns carcinógenos. A isoforma humana CYP2A6 pode ser induzida por fenobarbital e metaboliza nitrosaminas e aflatoxina B1, além de alguns medicamentos. Esse gene é parte de um grande *cluster* de genes CYP das subfamílias 2A, 2B e 2F localizado no cromossomo 19q. A isoforma humana da família 2B, denominado CYP2B6, também se localiza em 19q e metaboliza alguns xenobióticos tais como as drogas antineoplásicas ciclofosfamida e ifosfamida, além de nitrosaminas.

A subfamília CYP2E é responsável pela metabolização de substratos com relativo baixo peso molecular, participando da ativação de vários carcinógenos (principalmente nitrosaminas) e outras substâncias químicas tóxicas como benzeno, dialquilnitrosaminas, halotanos e etanol dentre outras.

A família CYP3A geralmente metaboliza compostos com alto peso molecular como a eritromicina e a carbamazepina. Pode participar da ativação de um pequeno número de pré-carcinógenos e outros compostos tóxicos como a aflatoxina B1 e alcalóides como a pirrolizidina.

Relativamente pouco se conhece sobre a expressão de CYPs específicos nos tecidos orais humanos e de animais de laboratório (SARIKAYA D *et al*, 2007). A maioria dos estudos utiliza linhagens celulares derivadas de determinadas regiões anatômicas (principalmente língua e mucosa jugal). O fato da maioria dos estudos utilizar mucosa jugal parece estar relacionado a maior facilidade de obtenção de material dessa localidade quando da cirurgia de remoção de sisos inclusos.

Dessa forma 85% dos tumores orais ocorrem em uma área que compreende apenas 10% da superfície da mucosa oral (KADEMANI D, 2007). O mecanismo responsável pela ocorrência preferencial nesses sítios é desconhecido e a introdução de um modelo animal que apresentasse um padrão de expressão de CYPs similar ao observado nos tecidos orais humanos seria um bom alicerce para estudos posteriores sobre a carcinogênese oral. O modelo de carcinogênese que utiliza a mucosa jugal do hamster é um dos sistemas mais utilizados para analisar o desenvolvimento do CCE oral. Tal modelo baseia-se na aplicação de 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA) a 0,5% diluído em parafina líquida sobre essa superfície mucosa, três vezes por semana durante 14 semanas (NAGINI S *et al*, 2009). Porém, esse modelo acarreta apenas o surgimento de tumores bem diferenciados, que nunca exibem metástases, tendo portanto suas limitações (MILAS Z *et al*, 2010). Nenhum trabalho analisou de forma pormenorizada as regiões anatômicas orais de animais de laboratório.

Em câncer de esôfago, também associado ao tabagismo e etilismo (onde até 93% dos tumores são CCE - RIBEIRO PINTO *et al.*, 2003) existe um perfil diferenciado de enzimas ativadoras de carcinógenos ao longo do órgão. As porções média e distal do esôfago concentram a vasta maioria dos tumores esofagianos, seguindo exatamente o padrão de distribuição das isoformas CYP2A6 e CYP2E1, as principais enzimas responsáveis pela ativação dos carcinógenos mais potentes presentes no tabaco, as nitrosaminas (GODOY W *et al*, 2002). Análises em animais experimentais demonstraram semelhanças entre o esôfago de ratos e o humano. (RIBEIRO PINTO LF *et al*, 2001; VISONI S, LANG M, RIBEIRO PINTO LF, 2008).

As mutações causadas por adutos de DNA devem trazer necessariamente uma desregulação em genes que controlam a homeostase celular, transformando-os em genes que podem propiciar o desenvolvimento do câncer. Duas classes principais de genes se situam neste cenário: oncogenes e genes supressores de tumor.

Genes supressores tumorais possibilitam o surgimento de um tumor quando sofrem mutações que geram perda da função da proteína. O protótipo dessa categoria é o gene *TP53*, cujas mutações encontram-se presentes em quase todo tipo de câncer humano, sendo o gene mais comumente mutado em tumores sólidos (BUNZ F, 2008). Em cabeça e pescoço *TP53* encontra-se mutado em 42,5% dos tumores perdendo apenas para os tumores colorretais, onde 43,3% dos cânceres apresentam mutação em *TP53* (IARC *TP53 database*, 2013). Analisando-se as mutações em *TP53* encontradas em tumores de pulmão e laringe, mas não de boca, observou-se que as posições ocupadas pelas bases em que o BPDE preferencialmente forma adutos superpõem-se significativamente aos conhecidos *hotspots* de mutação de *TP53* nessas neoplasias (BUNZ F, 2008). O benzopireno normalmente gera transversão G:T, com predomínio de ocorrência nos códons 157 e 158. Isso demonstra uma associação entre carcinógenos e mutações específicas (TOYOOKA S, TSUDA T, GAZDAR AF, 2003). No entanto, as possíveis razões para que não exista uma assinatura molecular de alterações em *TP53* em tumores de boca semelhante as de laringe ou de pulmão ainda não está claro. O papel do álcool na indução de mutações no gene *TP53* foi verificado por HSIEH LL *et al.* (2001), que identificou um aumento de transições G: C - A: T nos pacientes com esse hábito associado ao tabagismo.

Dessa forma observa-se que a análise do espectro de mutações em *TP53* gera uma “assinatura” que remete ao agente causal e, por conseguinte, à via de ativação (no caso de um xenobiótico ativado metabolicamente por enzimas CYP). De todas as mutações, 93% estão presentes no domínio de ligação ao DNA e correspondem aos exons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53* (SZYMANSKA & HAINAUT, 2003, SOUSSI T, 2007). Uma vez que carcinógenos específicos geram padrões de mutação específicos em *TP53* (BUNZ F, 2008), a análise do espectro mutacional de *TP53* em tumores de apenas um sítio da cavidade oral pode ser mais uma evidência

da ativação diferenciada de carcinógenos nos sítios que concentram a grande maioria das lesões orais (língua e assoalho).

Por outro lado, os oncogenes são a forma mutada de uma categoria de genes normais denominada proto-oncogenes. Esses genes tipicamente regulam o crescimento e a diferenciação celulares, sendo transformados em oncogenes ativos através da ação de vírus, radiação ou carcinógenos químicos. Uma vez que os oncogenes estejam ativados, eles ocasionam perturbações no crescimento celular e na diferenciação comumente observadas nas células tumorais (BUNZ F, 2008).

O EGFR (*epidermal growth factor receptor*) é um proto-oncogene membro da família dos receptores de membrana erbB que media a ativação de vias de sinalização relacionadas a várias respostas celulares, incluindo proliferação celular, sobrevivência, mobilidade celular, invasão e adesão. Até 98% dos tumores de cabeça e pescoço expressam EGFR fosforilado e a alta expressão de EGFR tem sido correlacionada com invasividade tumoral (RAZFAR A; GRANDIS JR, 2010).

Para analisar esse e outros importantes genes uma série de metodologias foi empregada nesse trabalho, tais como extração de DNA, extração de RNA, RT-PCR, PCR convencional, sequenciamento e PCR em tempo real. Essa última metodologia foi utilizada para avaliar a expressão de CYPs entre os sítios de cavidade oral. Durante esses experimentos foram observados problemas associados ao limite de detecção dessa técnica, anteriormente descritos por WITTEWER e KUSAKAWA em 2004. Por esse motivo experimentos específicos foram desenhados e geraram o primeiro capítulo da presente tese, publicado recentemente na *Analytical Biochemistry* (2013).

Dessa forma testaremos a hipótese de que existem diferenças nos níveis de expressão constitutiva das diferentes isoformas do citocromo P450 entre os distintos sítios da cavidade oral que explicam as diferenças na frequência em relação a localização associadas aos tumores que acometem cada uma dessas regiões anatômicas.

## **2. HIPÓTESE**

Existem diferenças moleculares entre os sítios de cavidade oral que estão relacionadas ao surgimento preferencial de tumores em determinados sítios anatômicos orais e diferenças clinicopatológicas entre os carcinomas de células escamosas de sítio único oral.

### **3. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GERAL**

Analisar e comparar os níveis de expressão constitutiva de diferentes marcadores moleculares entre os vários sítios orais, tanto na mucosa saudável de humanos e de modelos experimentais e o perfil clinicopatológico de pacientes portadores de carcinomas de células escamosas de apenas um sítio oral.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1- Otimizar a metodologia do PCR em tempo real para genes CYP pouco expressos em amostras com pequena quantidade de tecido.

2- Avaliar e comparar os níveis de expressão constitutiva de enzimas Citocromos P450 (CYP) que ativam carcinógenos em diferentes localidades da mucosa oral. Comparação entre modelos experimentais e humanos, visando:

a- Correlacionar as diferentes incidências de tumores entre as variadas localidades orais;

b- Sugerir um melhor modelo experimental para representar a carcinogênese oral humana, levando-se em conta a expressão de CYPs entre os diferentes sítios.

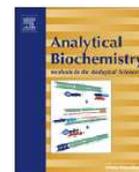
3- Analisar as características clinicopatológicas, a sobrevida global e a sobrevida livre de doença dos pacientes portadores de tumores orais de sítio único.

## **4. CAPÍTULO I**

### **DEMONSTRAÇÃO EXPERIMENTAL DOS LIMITES DE DETECÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

## **INTRODUÇÃO**

Durante a realização dos experimentos de PCR em tempo real para a quantificação da expressão dos genes CYP na cavidade oral dos animais de laboratório observamos que em certas situações a reprodutibilidade dos experimentos era problemática. Em certas ocasiões, a partir de um mesmo cDNA, ora as reações funcionavam, ora geravam produtos inespecíficos e algumas vezes nenhuma amplificação específica era observada. Esse fenômeno era observado quando da análise de alguns genes e não ocorria quando outros eram avaliados. Esse fato gerou um problema prático que era de poder afirmar se determinado gene com tal comportamento era realmente expresso naquele subsítio anatômico. Dessa forma decidimos executar os experimentos específicos que geraram a publicação abaixo transcrita e que serviu de base para a interpretação dos resultados do capítulo II da presente tese de doutorado.



## Notes &amp; Tips

## Gene expression analysis by real-time PCR: Experimental demonstration of PCR detection limits

Vagner Bernardo<sup>a</sup>, Luis Felipe Ribeiro Pinto<sup>a</sup>, Rodolpho Mattos Albano<sup>b,\*</sup><sup>a</sup>Programa de Carcinogênese Molecular, CPQ, Instituto Nacional de Câncer, 20231-050 Rio de Janeiro, RJ, Brazil<sup>b</sup>Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Departamento de Bioquímica, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 20551-013 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 May 2012

Received in revised form 18 September 2012

Accepted 23 September 2012

Available online 28 September 2012

## Keywords:

Real-time PCR

Detection limits

SYBR green

## ABSTRACT

Reverse transcription followed by real-time PCR (RT-qPCR) is the gold standard for quantifying gene expression. However, because of PCR detection limits, theorized to be three template copies, the quantification of genes exhibiting great expression variability is challenging. Using genes with high to low expression in rat tissues we experimentally demonstrated this limit and found it to be applicable only for describing reactions in which stochastic events and the Monte Carlo effect are present. We also determined the lower limits of RNA input that should be used to prevent artifactual template quantification and we propose a methodology to assess RT-qPCR detection limits in any qPCR platform.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

The advent of the polymerase chain reaction (PCR) created a revolution in the biomedical sciences. Technological advances led to the development of real-time PCR (qPCR), allowing more accurate quantification than gel-based methodologies. Although it is possible to achieve amplification using an input of one template molecule, limitations of qPCR such as the Monte Carlo effect [1] have been reported. This phenomenon is characterized by the observation that below a certain copy number or dilution threshold, PCR generates products of various sizes and abundance in a non-reproducible fashion. Later, Wittwer and Kuskawa [2] described the theoretical limit of qPCR detection using a Poisson distribution, concluding that an average of three template copies is needed to reach a 95% positive reaction rate.

Reverse transcription followed by qPCR (RT-qPCR) is the method of choice for determining mRNA expression. However, some genes display great variation in expression between tissues or individuals, posing problems for comparative analysis. Therefore, the need for a clear definition of the detection limits of a qPCR system has been advocated [3]. However, a clear methodological approach to identify them has not been defined. Here we take advantage of the great variation in expression exhibited by cytochrome P450 (CYP) genes in rat tissues to experimentally demonstrate the theoretical limit of qPCR detection through absolute quantification with SYBR Green I chemistry.

Tissues (liver, lower gingiva, and hard palate) from five untreated 8-week-old male Wistar rats were collected. Total RNA

was extracted with the TRIzol reagent (Invitrogen) and further purified using an RNeasy kit (Qiagen). RNA purity and quantity were determined with a spectrophotometer (Nanovue; GE Healthcare) and its integrity was assessed with the Agilent RNA 6000 Nano LabChip kit in a 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies). Only high-quality RNA was used in all experiments (data not shown).

Increasing RNA amounts (from 10 to 2560 ng) were used in RT reactions that were performed concomitant with the same reaction mix according to Robottom Ferreira et al. [4]. Two other RT reactions using 4 µg of total RNA from liver and hard palate were also implemented with the same protocol.

Primer sequences for *Actb*, *Cyp2a3*, and *Cyp2e1* (Supplementary Table S1) were tested in silico using Primer Premier 5.0 software. All primers produced amplicons within the ideal range of product length (80–150 bp) [5]. Primer sequences for *Cyp2a3* were retrieved from the literature [6]. Heterodimer analysis showed that  $\Delta G$ 's were always above  $-9$  kcal/mol.

qPCR was performed in 15-µl reaction volumes with the Rotor-Gene SYBR Green PCR kit (Qiagen) on an RG 6000 thermal cycler (Corbett Research). Four and 10 pmol of primer was added for the reference and CYP genes, respectively. Forty cycles were performed and the annealing temperature was set to 60 °C, according to the manufacturer's instructions. Melting point curves were included at the end of the program. PCR products were visualized on agarose gels and checked by direct sequencing. Three independent experiments were done with quadruplicate reactions (0.5 µl of cDNA per reaction). For absolute quantification we cloned the three amplicons into PGMT (Promega) and plasmids were

\* Corresponding author. Fax: +55 21 2868 8036.

E-mail address: [albano@uerj.br](mailto:albano@uerj.br) (R.M. Albano).

sequenced, linearized, and used to construct standard curves. The curves ranged from 524,288 to 32 target molecules to derive the equations needed for absolute quantification. Lower inputs were not used to avoid reducing the determination coefficient ( $r^2$ ). Efficiencies and  $r^2$  were all within an acceptable range (Supplementary Table S2). Annealing temperature curves for each primer were performed to determine the best reaction efficiencies, showing that 60 °C was adequate (Supplementary Table S3).

According to Bustin et al. [3], 95% of the replicates of a sample tested by qPCR must show positive amplification. In other words, only when 20 replicates are performed can we accept a failed qPCR reaction ( $20 \times 5\% = 1$  reaction). Therefore, in our experimental design of 10–12 replicate reactions, the presence of 1 failed amplification is enough to classify a data series as being “below the limit of detection”.

Because of a high variation in CYP mRNA levels in rat tissues, a 100% positive amplification rate in RT-qPCR was not achieved for some genes in certain anatomical sites (Supplementary Table S4). We hypothesized that this could be caused by mRNA levels that were at qPCR detection limits. To test this, our data series were divided into two groups according to the presence of failed amplifications. Eighty-one data series were generated, each consisting of 10–12 replicate qPCRs, representing all possible RNA input/gene/anatomical site combinations (Supplementary Table S4).

Group 1, with 33 data series, was composed of series having at least one failed reaction. In this group, template inputs were not statistically different from the theoretical lower limit of 3 copies ( $p = 0.90$ ) and did not show normality, being represented by the median value of 2.89 copies (Fig. 1). Using the Wilcoxon signed rank test we tested whether template inputs of 1 to 4 copies per qPCR could reproduce the same results observed with 2.89 copies. In fact, with 1 ( $p < 0.0001$ ) and 2 template copies ( $p = 0.0063$ ) the previously observed median value was not reached, while borderline  $p$  values were obtained with 4 template copies ( $p = 0.0594$ ). Considering that nonparametric tests are less powerful, these observations demonstrate that Group 1 data series were at the theoretical limit of 3 template copies at the beginning of the reaction. Group 1 showed normally distributed  $C_q$ s with a mean of 31.68

(31.22–32.14; 95% CI). Group 2, with 48 data series, had no failed reactions and was represented by the median value of 1365 template copies per reaction tube (Fig. 1).  $C_q$ s were also normally distributed, with a mean of 24.03 (22.84–25.22; 95% CI).

As expected, the number of positive reactions increased according to RNA input in the original RT reaction. The lowest RNA inputs (10 to 80 ng) were significantly associated with the presence of failed reactions ( $p = 0.0013$ , Fisher's exact test). However, highly expressed genes such as *Actb* and *Cyp2e1* in liver were less affected by lower RNA inputs (Supplementary Table S4).

When all expression data were pooled we concluded that the detection limit of the described system, RT-PCR with SYBR green chemistry and the Rotor-Gene platform, was 11 copies per reaction. Below this threshold, inconsistent results were found and data series with failed amplifications were detected in at least one anatomical site.

After the removal of both Group 1 data series and series below 11 copies per reaction, we observed high intra-assay variability in some of the remaining data series. We hypothesized that this could be related to template inputs. Using raw data, the median coefficient of variation (CV) for intra-assay variance was 7.5% for highly expressed genes (*Actb* and *Cyp2e1*, Supplementary Fig. S1). We noticed that CVs were higher for lower RNA inputs, for which template numbers decrease. This assumption was confirmed by assessing *Cyp2a3* expression in the three anatomical sites. This low-expression gene was much more influenced by experimental errors (Supplementary Fig. S2) and the median CV was 28.5%. Therefore, samples showing a high intra-assay variation probably carry template copy numbers near qPCR detection limits.

We also assessed the effect of PCR detection limits on relative quantification. Because of a high variation in expression, the assessment of CYP mRNA levels by relative quantification is troublesome and in some instances dilution curves with more than five points cannot be constructed. We hypothesized that this phenomenon is also related to qPCR detection limits. To test this we constructed dilution curves using liver cDNA made from 4  $\mu$ g of total RNA. We observed that dilution curves of the highly expressed genes (*Actb* and *Cyp2e1*) did not exceed the system's detection limits even when high dilutions such as 1:800 were used, exhibiting lower  $C_q$  and standard deviation (SD; Table 1). However, for low-expressed genes such as *Cyp2a3* in the liver, only five serial dilutions had specific melting curves. The 1:50 dilution showed a low template input, a representative  $C_q$  over 30, and a SD of almost 1 cycle. Dilutions over 1:50 showed nonspecific melting curves and were not reproducible, according to the Monte Carlo effect [1]. Therefore, as expected, relative quantification can also be affected by PCR detection limits.

*Cyp2e1* expression showed the highest variation in the tissues tested, being higher in liver than in gingiva (unpaired  $t$  test;  $p < 0.0001$ ) and below the limit of detection in the hard palate. This motivated us to further evaluate its expression in the latter, using this minimally expressed gene to additionally demonstrate qPCR detection limits in an independent experiment. When a higher hard palate RNA input in the RT reaction (4  $\mu$ g) was used all reactions were positive. The median number of *Cyp2e1* template copies detected was 600 (median  $C_q = 24.37$ ). The dilution of the cDNA to 1:12.5 also resulted in 100% positive reactions and a median number of 141 detected copies (median  $C_q = 26.46$ ). Based on these two dilutions, we tested if additional dilutions would lower template numbers until the qPCR theoretical detection limit of 3 copies was reached. In fact, the dilution of this cDNA to 1:400 resulted in a median number of 2.75 template copies (median  $C_q = 32.14$ ). However, when these 12 replicate reactions were assessed qualitatively we observed that seven tubes showed specific amplification, three showed specific and nonspecific amplicons, and two reactions failed, confirming that this theoretical limit does not

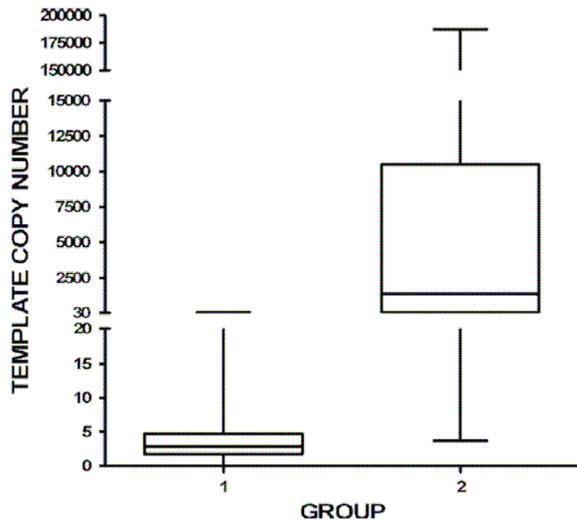


Fig. 1. Reactions grouped according to the presence of failed amplifications. Group 1 reactions show at least one failed reaction per series and Group 2 reactions show 100% positive amplification.

**Table 1**  
Dilution curves constructed using cDNA from 4 µg of total liver RNA.

Dilution	Relative quantification ( $C_q \pm SD$ )					
	n	<i>Cyp2a3</i>	n	<i>Cyp2e1</i>	n	<i>Actb</i>
1:3.125	144	26.06 ± 0.11	143,187	16.46 ± 0.03	110,938	17.37 ± 0.04
1:6.25	64	27.23 ± 0.07	74,813	17.40 ± 0.02	55,187	18.38 ± 0.02
1:12.5	45	27.75 ± 0.27	39,426	18.33 ± 0.09	28,800	19.32 ± 0.06
1:25	16	29.25 ± 0.30	20,785	19.25 ± 0.02	15,031	20.26 ± 0.06
1:50	5.91	30.66 ± 0.99	9751	20.34 ± 0.03	7036	21.36 ± 0
1:100			4649	21.41 ± 0.09	3306	22.45 ± 0.03
1:200			2817	22.13 ± 0.03	2052	23.14 ± 0.08
1:400			1284	23.27 ± 0.05	892	24.34 ± 0.08
1:800			610	24.34 ± 0.18	462	25.29 ± 0.10

SD, standard deviation of  $C_q$ ; n, mean copy number.

represent the real quantification limit of our qPCR system (Supplementary Fig. S3).

Our experimental data proved that the actual qPCR limit is higher than the theoretical one, as three template copies do not perfectly represent the stochastic events occurring in this low-copy number range. Possible losses of low concentration templates due to adherence to surfaces could additionally explain this phenomenon. Burns and Valdivia [7], using hydrolysis probes, showed that dilutions with four, two, or one template copy suffered from stochastic sampling effects, as seen in our data series and in the literature [8–10]. These observations suggest that the theoretical PCR detection limit is applicable in another sense that can be called “extreme limit” or absolute detection limit [8].

Practical considerations also emerge from our analysis in the form of guidelines to enable researchers to accurately measure the levels of low-expressed genes with SYBR green chemistry. First, one should be aware of PCR detection limits in a given system and try to use cDNA inputs that are above these limits. Second, our data suggest that the RNA input for the RT step should be higher than 80 ng of total RNA, as lower amounts produced artifactual results and were significantly associated with the presence of failed amplifications. Third, for the relative quantification of given targets, the  $C_q$  can be used to evaluate if target numbers are within PCR detection limits. Samples that show both a high  $C_q$  and a high intra-assay variation are close to the PCR detection limit. Finally, the presence of a failed amplification can be a useful marker to identify samples at the absolute PCR detection limit (considering qPCR assays with fewer than 20 replicates per sample).

#### Acknowledgment

This work was supported by FAPERJ and CNPq.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.09.029>.

#### References

- [1] E.E. Karrer, J.E. Lincoln, S. Hogenhout, A.B. Bennett, R.M. Bostock, B. Martineau, W.J. Lucas, D.G. Gilchrist, D. Alexander, In situ isolation of mRNA from individual plant cells: creation of cell-specific cDNA libraries, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 3814–3818.
- [2] C.T. Wittwer, N. Kusakawa, Real-time PCR, in: D.H. Persing, F.C. Tenover, J. Versalovic, J.W. Tang, E.R. Unger, D.A. Reiman, T.J. White (Eds.), *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*, ASM Press, Washington, DC, 2004, pp. 71–84 (Chapter 6).
- [3] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin. Chem.* 55 (2009) 611–622.
- [4] A.B. Robottom Ferreira, L.F. Ribeiro Pinto, R.M. Albano, An optimized reverse transcription–polymerase chain reaction procedure for the amplification of low copy *Cyp2A3* mRNA in rat esophagus, *Anal. Biochem.* 319 (2003) 323–326.
- [5] S. Fleige, V. Walf, S. Huch, C. Prgomet, J. Sehm, M.W. Pfaffl, Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR, *Biotechnol. Lett.* 28 (2006) 1601–1613.
- [6] S. Kalscheuer, X. Zhang, Y. Zeng, P. Upadhyaya, Differential expression of microRNAs in early-stage neoplastic transformation in the lungs of F344 rats chronically treated with the tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, *Carcinogenesis* 29 (2008) 2394–2399.
- [7] M.J. Burns, H. Valdivia, Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR, *Eur. Food Res. Technol.* 226 (2008) 1513–1524.
- [8] K.G. Berdal, A. Holst-Jensen, Roundup Ready<sup>®</sup> soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses, *Eur. Food Res. Technol.* 213 (2001) 432–438.
- [9] S.B. Rønning, M. Våitilingom, K.G. Berdal, A. Holst-Jensen, Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize (*Zea mays*), *Eur. Food Res. Technol.* 216 (2003) 347–354.
- [10] C. Nielsen, K. Berdal, A. Holst-Jensen, Characterisation of the 5' integration site and development of an event-specific real-time PCR assay for NK603 maize from a low starting copy number, *Eur. Food Res. Technol.* 219 (2004) 421–427.

## SUPPLEMENTAL MATERIALS

**Table S1:** Primers used in qPCR reactions

GENE	5'-PRIMER- 3'	GC CONTENT (%)	T <sub>m</sub> (°C)	PRODUCT SIZE	ACCESSION NUMBER
<i>Cyp2a3</i>	F :AGCATTGCGTGAGAGTAAAGGGA	47.8	63.1	129bp	NM_012542.2
	R:CCCCTTCTCTGGCTCTACCTTTG	56.5	65.1		
<i>Cyp2e1</i>	F :GTCACTGGACATCAACTGCG	55.0	56.6	80bp	NM_031543
	R:GTTCTTGGCTGTGTTTTTCCT	42.9	57.9		
<i>Actb</i>	F :CCGCATCCTCTTCCTCCCT	63.2	61.2	131bp	NM_031144
	R:GCCACAGGATTCCATACCCAG	57.1	58.6		

**Table S2:** Absolute curves and associated parameters.

ABSOLUTE QUANTIFICATION				
Gene	slope	y intercept	r <sup>2</sup>	Efficiency
<i>Cyp2a3</i>	-3.311	33.214	0.985	1.00
<i>Cyp2e1</i>	-3.323	33.598	0.998	1.00
<i>Actb</i>	-3.327	34.157	0.996	1.00

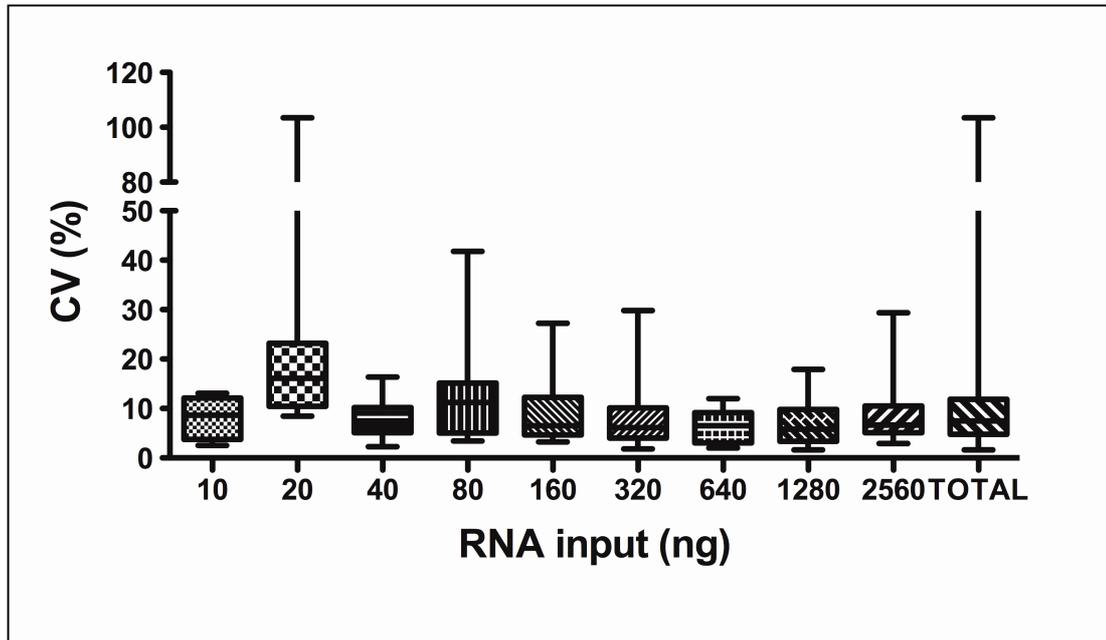
**Table S3:** Effect of annealing temperature on reaction efficiency

Gene	Annealing Temperature				
	54°C	56°C	58°C	60°C	62°C
<i>Cyp2a3</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.14
<i>Cyp2e1</i>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Actb</i>	1.08	1.08	1.04	1.00	1.02

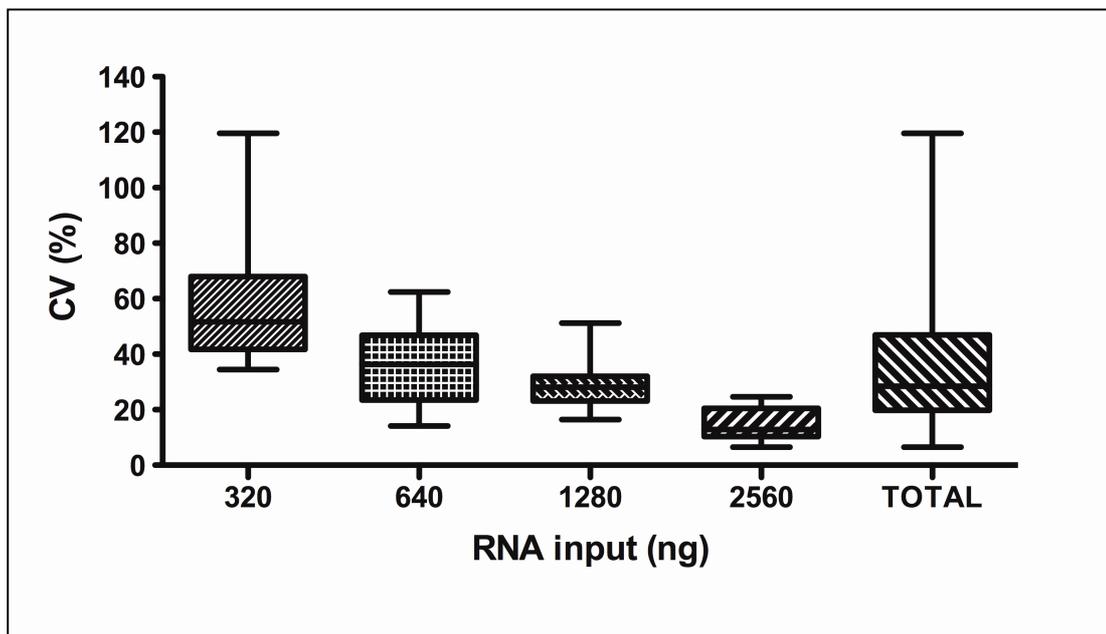
**Table S4:** Expression of CYP and *Actb* genes in different tissues tested according to RNA input in RT reaction

GINGIVA												
RNA input (ng)	<i>Actb</i>				<i>Cyp2a3</i>				<i>Cyp2e1</i>			
	G	Amp	n	(CI)	G	Amp	n	(CI) {Q}	G	Amp	n	(CI) {Q}
10	1	10/12	84	(56 – 112)	1	3/12	0.81*	{0.4 – 4.0}	1	3/12	2.80*	{1.4 – 2.9}
20	2	12/12	184	(107 – 261)	1	2/12	2.67*	{1.7 – 3.6}	1	0/12	–	
40	2	12/12	362	(330 – 393)	1	4/12	2.69*	{1.4 – 5.7}	1	4/12	1.87*	{1.1 – 2.6}
80	2	12/12	639	(537 – 742)	1	6/11	5.60	(2.6 – 8.6)	1	3/11	2.97*	{1.5 – 4.2}
160	2	12/12	1617	(1329 – 1905)	1	9/12	5.12	(3.3 – 7.0)	1	5/11	1.87	(0.8 – 3.0)
320	2	12/12	2102	(1869 – 2336)	2	12/12	11	(6.4 – 17)	1	11/12	3.13	(1.7 – 4.6)
640	2	12/12	4642	(4253 – 5032)	2	12/12	19	(13 – 26)	2	11/11	3.66	(2.8 – 4.6)
1280	2	12/12	9356	(8441 – 10271)	2	12/12	30	(24 – 35)	1	11/12	10	(8.4 – 13)
2560	2	12/12	18510	(15987 – 21032)	2	12/12	68	(59 – 77)	2	11/11	12	(8.5 – 15)
HARD PALATE												
RNA input (ng)	<i>Actb</i>				<i>Cyp2a3</i>				<i>Cyp2e1</i>			
	G	Amp	n	(CI) {Q}	G	Amp	n	(CI) {Q}	G	Amp	n	(CI) {Q}
10	1	11/12	35	(26 – 44)	1	4/12	2.89*	{1.5 – 4.0}	1	0/12	–	
20	2	12/12	89	(70 – 107)	1	6/12	3.00	(2.0 – 4.1)	1	0/12	–	
40	2	10/10	180	(154 – 205)	1	9/12	5.19	(2.2 – 8.2)	1	0/12	–	
80	2	12/12	308*	{262 – 400}	1	11/12	4.20	(3.1 – 5.3)	1	2/12	2.08*	{1.3 – 2.9}
160	2	12/12	573*	{531 – 871}	1	11/12	7.49	(4.0 – 11)	1	2/12	1.49*	{1.4 – 1.5}
320	2	11/11	1329	(1099 – 1559)	2	12/12	13	(8.4 – 18)	1	4/12	1.34*	{1.2 – 1.9}
640	2	12/12	2643*	{2426 – 3607}	2	12/12	25	(19 – 31)	1	6/12	1.38*	{0.7 – 2.9}
1280	2	12/12	6193	(5188 – 7198)	2	12/12	46	(36 – 57)	1	7/12	4.59	(2.4 – 6.8)
2560	2	10/10	14509	(12390 – 16629)	2	12/12	134*	{106 – 497}	1	10/12	3.77	(2.3 – 5.2)
LIVER												
RNA input (ng)	<i>Actb</i>				<i>Cyp2a3</i>				<i>Cyp2e1</i>			
	G	Amp	n	(CI)	G	Amp	n	(CI) {Q}	G	Amp	n	(CI) {Q}
10	2	12/12	825	(719 – 931)	1	2/12	2.13*	{0.7 – 3.5}	2	12/12	736*	{700 – 877}
20	2	12/12	1403	(1316 – 1491)	1	6/12	2.62	(0.9 – 4.4)	2	12/12	1401	(1289 – 1512)
40	2	12/12	3041	(2857 – 3225)	1	10/12	3.89*	{2.0 – 13}	2	12/12	3007	(2869 – 3144)
80	2	12/12	5462	(5055 – 5869)	1	8/12	3.33	(2.0 – 4.7)	2	12/12	5744	(5458 – 6030)
160	2	12/12	10870	(10297 – 11443)	1	10/12	4.87	(2.4 – 7.4)	2	12/12	12080	(11606 – 12554)
320	2	12/12	19955	(18388 – 21522)	2	12/12	8.12	(5.5 – 11)	2	12/12	18392	(17567 – 19218)
640	2	12/12	33929	(30535 – 37323)	2	12/12	13	(11 – 15)	2	12/12	34431	(32756 – 36107)
1280	2	12/12	67292	(64928 – 69656)	2	12/12	34	(24 – 43)	2	12/12	75471	(73608 – 77334)
2560	2	12/12	168423	(161274 – 175573)	2	12/12	70*	{66 – 187}	2	12/12	187608	(175844 – 199372)

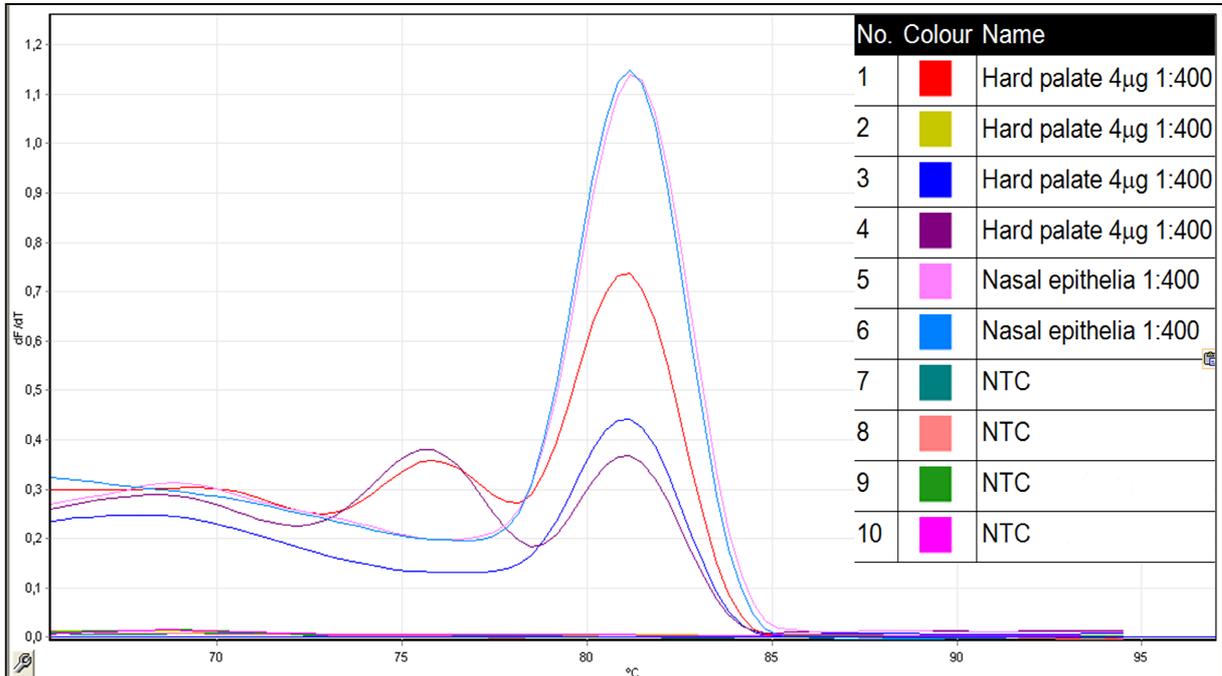
G- group; Amp – amplicons detected; n- number of copies; (CI)- 95% confidence interval of mean; n\*- median number of copies in data series without normality; {Q}- 25% and 75% percentiles or upper and lower limit in data series <4



**Figure S1:** Coefficients of variation (CV) of highly expressed genes according to RNA input. The median CV representing this group was 7.5%. Each bar represents the amplitude observed in the specific input.



**Figure S2:** Coefficients of variation (CV) of a low expressed gene (*Cyp2a3*) according to RNA input. The median CV representing this group was 28.5%. Each bar represents the amplitude observed in the specific input.



**Figure S3:** Limits of PCR detection. Monte Carlo effect on *Cyp2e1* expression in the hard palate using a 1:400 dilution of cDNA made with 4 µg of total RNA. First of three independent runs. Tubes #1 and #4 show specific and non specific products. Tube #2 shows negative amplification. Tubes #3, #5 and #6 show specific amplification (1.27; 319 and 301 copies of target template at the beginning of the reaction, respectively).

## **CONCLUSÃO**

Foi possível, por meio desses experimentos, demonstrar que o limite teórico de WITTWER e KUSAKAWA (2004) na verdade representa o limite extremo (absoluto) da reação de PCR, onde a quantidade das moléculas alvo encontra-se no limite de detecção de três cópias. Além disso, esse fenômeno é também caracterizado pela presença de falhas de amplificação e pela formação de produtos inespecíficos (efeito Monte Carlo). Dessa forma, pudemos utilizar essas informações para estabelecer o critério de análise de amostras que se encontram com expressão no limite de detecção da técnica de PCR.

## **5. CAPÍTULO II**

### **EXPRESSÃO DE ENZIMAS DA FAMÍLIA DOS CITOCROMOS P450 EM DIFERENTES SÍTIOS ORAIS DE HUMANOS E DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO**

## **5.1 – MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Bioquímica e Toxicologia Molecular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG/UERJ) e nas dependências da Divisão de Patologia (DIPAT), da Divisão de Genética (CPQ) e do Programa de Carcinogênese Molecular (CPQ), todas essas pertencentes ao Instituto Nacional de Câncer (INCA).

### **5.1.1- SELEÇÃO DA AMOSTRA**

Foram coletadas amostras dos seguintes sítios orais de animais de laboratório: gengiva (inferior), palato duro, lábio inferior, lábio superior, mucosa jugal, língua e assoalho. Em animais de laboratório, amostras de fígado e epitélio nasal também foram coletadas como controles positivos da expressão de CYPs. As espécies testadas (n = 5/espécie) foram o rato (Wistar), três linhagens de camundongos (C57BL/6, BALB/c e SV129) e o hamster (Sírio), todos machos e com oito semanas de idade. Os animais foram provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica e foram mantidos em ciclo de 12h de claro/escuro. Os animais receberam livre acesso a água e a ração peletizada padrão.

Os animais não receberam qualquer tipo de tratamento e foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. Esse trabalho não foi submetido a comitê de ética animal pois o mesmo ainda não havia sido implementado na instituição quando do planejamento e realização desses experimentos.

Todos os fragmentos foram imediatamente colocados em *ependorfs* estéreis contendo TRIzol® (Invitrogen, EUA) e congelados a -70°C em freezer, até a sua utilização.

Cinco pesquisadores voluntários, sem câncer e sem lesões precursoras na cavidade oral foram os doadores das amostras de sítios orais normais. Três voluntários não possuíam qualquer histórico de tabagismo e mantiveram pelo menos 15 dias de abstinência no consumo de bebidas alcoólicas ou no uso de enxaguatórios bucais com etanol. Com relação aos demais voluntários, um era etilista, sem histórico de tabagismo e outro era tabagista e etilista. Os sítios coletados foram gengiva superior (entre o segundo pré-molar e o primeiro molar), gengiva inferior (entre primeiro e segundo molares), trigonoretromolar, mucosa interna de lábio inferior, mucosa interna de lábio superior, língua (borda lateral), assoalho (anterior), palato duro (entre o segundo pré-molar e o primeiro molar) e mucosa jugal (a cerca de 2cm do ramo da mandíbula), todos ipsilateralmente. Para a realização dessas biópsias incisionais sob anestesia local foi utilizado um *punch* circular com 0,3cm de diâmetro na ponta ativa (Punch dermatológico nº 3, Kolplast Ci Ltda, São Paulo). Uma cuidadosa anamnese foi realizada antes da realização do procedimento para avaliação do estado geral de saúde de cada voluntário. Os leitos cirúrgicos foram suturados e, naqueles onde houve indicação, a ferida foi recoberta com cimento cirúrgico (Periobond®, Dentsply, Petrópolis). AINES foram prescritos para um melhor pós-operatório. Como controles positivos da expressão de CYPs em humanos, cDNAs de fígado estocados no laboratório foram utilizados (GODOY W *et al*, 2002).

Devido ao pequeno tamanho dos espécimes obtidos dos subsítios anatômicos da cavidade oral de cada um dos animais de laboratório testados optamos por fazer um pool de amostras para cada subsítio anatômico a fim de obtermos quantidade suficiente de RNA para a realização dos experimentos subsequentes.

## 5.1.2 – METODOLOGIA

### A. EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total foi extraído dos tecidos utilizando-se o reagente TRIzol®, seguindo o protocolo descrito pelo seu fabricante. Para cada 0,1 g de tecido em um tubo *ependorf* foram adicionados 1 mL de TRIzol®, que foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Após essa etapa, a cada tubo foi acrescentado 0,2 mL de clorofórmio. Os tubos foram então agitados por 15 segundos e incubados por 3 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C (centrífuga refrigerada *EPPENDORF* modelo 5417R). A fase aquosa (sobrenadante) foi então transferida para tubos novos e o restante do material foi descartado. Um volume de 0,5 mL de isopropanol foi acrescentado à fase aquosa e os tubos agitados. A seguir os tubos foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente e centrifugados a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o sedimento lavado com 1 mL de etanol 75% (v/v) e centrifugado a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O RNA foi então submetido a uma etapa adicional de purificação utilizando-se o *kit* RNeasy (Qiagen), segundo instruções do fabricante. O RNA foi eluído em 12 µL de água RNase free, seguindo-se a quantificação do RNA.

### B. QUANTIFICAÇÃO DO RNA

Após a extração, os RNAs foram quantificados através da absorvância medida em 260 e 280 nm em espectrofotômetro (Nanovue, GE Healthcare Biosciences, Upsala, Suécia). A razão de  $A_{260}$  e  $A_{280}$  deve ser igual ou superior a 1,75

para, então, calcular-se a concentração do RNA. (SAMBROOK J *et al.*, 2001). Uma unidade de absorvância corresponde a uma concentração de 40 µg/mL de RNA.

### **C. REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (*Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction* – RT- PCR)**

A partir do RNA total, o cDNA foi sintetizado através de uma reação de transcrição reversa com a enzima M-MLV, seguindo o protocolo de ROBOTTON-FERREIRA; RIBEIRO PINTO; ALBANO (2003). A cada tubo de reação contendo pelo menos 100ng de RNA total foram adicionados 250 ng de oligonucleotídeo randômico e água DEPC para completar o volume de 8 µL. Após incubação a 70°C por 10 minutos, os tubos foram transferidos para um recipiente com gelo. Foram adicionados a cada *ependorf* 6µL de tampão de RT 5X, 1 µL de cada desoxirribonucleotídeo a 10 mM, 1 µL de RNAsina, 3 µL de DTT 0,1M, 1 µL de M-MLV contendo 200 U e 12 µL de trealose a 1,5 M. Os tubos foram incubados a 37°C por 1 hora, e posteriormente a 70°C por 15 minutos. Em seguida os mesmos foram armazenados a -20°C até sua utilização.

### **D. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (*Quantitative Polimerase Chain Reaction* - PCRq)**

A reação de PCRq foi realizada utilizando-se a plataforma Rotor-Gene da QIAGEN, contendo em cada minitubo: 7,5 µL do reagente Fast SYBR<sup>®</sup> Green, 25 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos senso e antissenso (10 pmoles de cada oligonucleotídeo no caso do gene de referência), 0,5 µL de cDNA e água deionizada estéril para completar o volume final de 15 µL. A reação de amplificação foi realizada com uma pré-desnaturação (5 minutos a 95°C), seguida de 40 ciclos consistindo de duas etapas: desnaturação (5 segundos a 95°C), anelamento/extensão (10 segundos a 60°C) e um ciclo final de desnaturação com temperatura variando de 65°C a 95°C em incrementos de 1°C. Oligonucleotídeos

específicos para cada um dos CYPs a serem analisados foram construídos, utilizando o programa Primer Premier 5.0, buscando-se sempre que possível pelo menos uma junção éxon-éxon, a fim de evitar possível amplificação de DNA genômico (esses oligonucleotídeos encontram-se descritos na Tabela 2).

**Tabela 2:** Condições da PCR para genes CYP: oligonucleotídeos e tamanho dos produtos em pares de base.

<b>HUMANO</b>			
<b>GENE</b>	<b>5'- OLIGONUCLEOTÍDEO- 3'</b>	<b>TAMANHO PRODUTO</b>	<b>ENTRADA</b>
CYP1A1	S : - CCC ACA GCA CAA CAA GAG ACA C - AS:- TCA GGT AGG AAC TCA GAT GGG TT -	130pb	NM_000499.3
CYP1A2	S : - CTT TGG AGC AGG ATT TGA CAC A - AS: - CTC CCT GCC AAT CAC AGT GTC C -	121pb	NM_000761.3
CYP2A6	S : GAG GAG GAG AAG AAC CCC AAC AS: TGA GCA GCA AGA AGC CAT AGC	124pb	NM_000762.5
CYP2B6	S : GGA AAA AGA GAA ATC CAA CGC A AS: CAG GAA GCC GTA GCG GAG	121pb	NM_000767.4
CYP2E1	S : - AAG GCG GTG AAG GAA GCG - AS: - ATG ATT CCC CTG TCC CTG TGC G -	95pb	NM_000733.3
GAPDH	S:- CAA CAG CCT CAA GAT CAT CAG CAA - AS:-AGT GAT GGC ATG GAC TGT GGT CAT-	124pb	NM_002046
<b>CAMUNDONGO</b>			
<b>GENE</b>	<b>5'- OLIGONUCLEOTÍDEO- 3'</b>	<b>TAMANHO PRODUTO</b>	<b>ENTRADA</b>
CYP1a1	S : -TCC CCC ACA GCA CCA CAA - AS: - GTC ACC CCA CAG TTC CCG -	113pb	NM_009992
CYP1a2	S : - GCT GGA CAC GGT GGT TGG - AS: - TGT CCC TCG TTG TGC TGT GG -	143pb	NM_009993
CYP2a5	S : - TCC GAA TGC TGG AGG AGA AGA - AS: - TGG TGC TGA CGG TCT CTG TG -	118pb	NM_007812
CYP2b9	S : - TGA AGA AAT ACC AGG GAG TGC C - AS: - AAA CGC TCT CCA AAG ACA ATG G -	94pb	NM_010000
CYP2b10	S : - CAT TCT CCA GCC AGA TGT TTG A - AS: - TTT TGG AGA TTT GTC TGT GGG C -	78pb	NM_009999.3
CYP2e1	S : - TGG AAA AGC CAA GGA ACA CC - AS: - TCT TGG CTG TGT TTT TCC TTC T -	102pb	NM_021282
GAPDH	S : - ACC TGC CAA GTA TGA TGA CA - AS: - GGC ATC GAA GGT GGA AGA GTG -	139pb	NM_008084.2
<b>RATO</b>			
<b>GENE</b>	<b>5'- OLIGONUCLEOTÍDEO- 3'</b>	<b>TAMANHO PRODUTO</b>	<b>ENTRADA</b>
CYP1A1	S : - GCA TTG TGC CTG CCT CCT AC - AS: - GGT CTC TGC TGT GCC CAG TG -	73pb	NM_012540
CYP1A2	S : GAA CAG TAT CCA GGA CAT CAC AGG - AS: - CTG AGG GAT GAG ACC ACC GTT G -	79pb	NM_012541
CYP2A3	S : - AGC ATT GCG TGA GAG TAA AGG GA - AS: - CCC CTT CTC TGG CTC TAC CTT TG -	129pb	NM_012542.2
CYP2B1	S : - GTT CAT TCT CCA GCC AGG TGT T - AS: - GAT TTC CTG GAG GTT TTT GGA GA-	95pb	NM_001134844
CYP2E1	S : - GTC ACT GGA CAT CAA CTG CG - AS: - GTT CTT GGC TGT GTT TTT CCT -	80pb	NM_031543
GAPDH	S : - ACC TGC CAA GTA TGA TGA CA - AS: - GC ATC GAA GGT GGA AGA GTG -	138pb	NM_017008

HAMSTER			
GENE	5'- OLIGONUCLEOTÍDEO- 3'	TAMANHO PRODUTO	ENTRADA
CYP 1A1	S : - CAC AGT GAT TGG CAG GAG TCG - AS: - GTA TCT CTT GTG GTG CTG TGG G -	138pb	D12977.1
CYP 1A2	S : - ATG ACG AAA AGC AGT GGA AAG A - AS: - TTC CCA AGC CAA AGA GCA TCA C -	117pb	D10914.1
CYP 2A8	S : - CTG TCC TTC CCA CTG CCA C - AS: - CCT CAA CAG TCT CCT CTG CCT -	113pb	AB001516.1
CYP 2A9	S : - CAG TGG ACG AGG CGA GCA - AS: - AGT TGC TTG GCT CGT TCC C -	87pb	D86953.1
CYP 2A16	S : - CAA AGA GTT CCT GTC GCT GC - AS: - CCT GCT GCT GTG GTC CCG -	125pb	D86952.1
CYP 2E1	S : - CCA GCA CAA CCC TGA GAT ACG - AS: - AAA CAG GGA CAC GAC TTG GC -	111pb	D17449.1
GAPDH	S : - GCT GGT GCC GAG TAT GTT GT - AS: - TGA CCC TCT TGG CTC CAC C -	91pb	DQ403055.1

Entradas disponíveis em [genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu) e [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)

O par de oligonucleotídeos para CYP2A3 foi retirado da literatura (KALSCHEUER S *et al*, 2008). O par de oligonucleotídeos para CYP1A1 humano foi obtido do *RT-primer database* (entrada nº1809, disponível em <http://www.rtprimerdb.org>). Os primers do hamster não puderam ser desenhados dessa forma pela dificuldade de obtenção de detalhes sobre as junções éxon-éxon nas sequências depositadas no *Genbank*. Devido a esse fato apenas tais amostras foram tratadas com DNase. O RNA desses animais foi tratado com a enzima DNase I, RNase-free (Fermentas, Maryland, USA) seguindo o protocolo descrito pelo seu fabricante para eliminar qualquer DNA genômico contaminante.

Apenas reações que apresentaram curva de desnaturação específica foram consideradas. Quadruplicatas foram feitas para cada amostra. Os resultados foram expressos em número de cópias do RNA mensageiro do gene de interesse, pelo uso do método de quantificação absoluta, normalizadas para 1µg de RNA.

## **E. PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR**

Os produtos de PCR foram purificados com o kit *PureLink PCR Purification* de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen, EUA). A cada tubo, com 50 µL de

produto de PCR foram adicionados 200  $\mu$ L de tampão de captura. Posteriormente, essa solução foi colocada em uma coluna *PureLink™ spin* com tubo coletor e centrifugada a 10.000g por um minuto. O líquido no tubo coletor foi descartado e a coluna foi lavada com 650  $\mu$ L de tampão de lavagem centrifugado a 10.000g por um minuto. O líquido no tubo coletor foi descartado e nova centrifugação a 13.400 rpm foi realizada durante três minutos para remover qualquer resíduo do tampão de lavagem. O tubo coletor foi desprezado e substituído por um microtubo de 1,7 mL. Em seguida, foram adicionados ao centro da coluna 50  $\mu$ L de tampão de eluição, que ficou em incubação por um minuto. Por fim este material foi centrifugado a 13.400 rpm por dois minutos e no microtubo estava o produto de PCR purificado.

## **F. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE**

A eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão SB 1X foi implementada a fim de analisar os produtos da reação de PCR. Foram aplicados 2  $\mu$ L de cada produto de PCR e um microlitro de GelRed (Invitrogen, Grand Island, EUA - diluído a 1:1000) e um microlitro de tampão de carregamento foram adicionados a cada amostra. O tampão de carregamento é composto de glicerol 50 % (V/V), azul de bromofenol 0,25 % (P/V) e xileno cianol 0,25 % (P/V). A eletroforese foi realizada a 4 V/cm, por 40 minutos em cuba horizontal (Life Technologies). O DNA foi visualizado e fotodocumentado em um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um sistema de captura de imagem (Alphamager® mini, Alpha Innotech Corp, Taiwan).

## **G. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA**

Quando necessário foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida para analisar os produtos da reação de PCR. O gel foi composto de 8,0 mL de solução de acrilamida:bis acrilamida 30 % (29:1) (Invitrogen, São Paulo), 6,0 mL de tampão TBE 5X (0,45 M Tris-borato e 0,01 M EDTA - MERCK), 15,74 mL de água deionizada, 0,25 mL de persulfato de amônio 10% (APS – MERCK) e 10  $\mu$ L de

N'N'N'N'tetrametiletilenodiamina (TEMED - BIO-RAD) (SAMBROOK *et al.*, 2001). Após a eletroforese o gel foi incubado em solução fixadora por 20 minutos (ácido acético a 10 %). Posteriormente a fixação, o gel foi lavado 2 vezes com água deionizada, por 2 minutos cada lavagem e corado com solução de nitrato de prata por 30 minutos (0,1% de nitrato de prata, 0,15% de formaldeído – MERCK). Após a coloração, o gel foi novamente lavado com água deionizada por 10 segundos e revelado em solução contendo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anidro a 3 %, 0,15% formaldeído e 0,02% de tiosulfato de sódio 10 mg/mL (MERCK) até aparecerem as bandas. Depois da revelação, o gel foi incubado em solução fixadora por 10 minutos e colocado para secar.

#### **H. CLONAGEM EM VETOR**

Para a quantificação absoluta, curvas padrão foram construídas a partir da clonagem dos produtos de PCR em *E. coli*, produtos esses da amplificação de CYPs a partir dos cDNAs obtidos das amostras de fígado de cada espécie. Para tal, 100µL de cada produto de PCR foram purificados de acordo com o procedimento descrito no item E, gerando alíquotas de 30µL para cada amplicon purificado. Esses produtos foram visualizados em gel de agarose a 3% para avaliação de seu respectivo tamanho.

O vetor utilizado foi o pGEM-T easy (3018pb, cod A137A, Promega). Para o procedimento de ligação foram adicionados a cada tubo de reação 1µL de tampão 10X (T4 DNA ligase 10X buffer, cod C126B, Promega), 7,5 µL de produto de PCR, 0,5µL de vetor e 1 µL de ligase (T4 DNA ligase, cod M180A, Promega). Em seguida os tubos foram submetidos a uma centrifugação rápida e levados ao termociclador a 4°C por doze horas.

As bactérias foram submetidas a transformação química, segundo protocolo descrito por SWORDS (2003). Para o preparo de bactérias *E. coli* competentes,

culturas saturadas foram diluídas na proporção 1:100 em meio LB e permitiu-se o seu crescimento por três horas e meia a 200rpm em frasco de 500mL contendo 50mL de meio a 37°C em incubador orbital (Excella E 24 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific). Após esse período a cultura foi transferida para um tubo falcon de 50mL e colocada em gelo por cinco minutos. A seguir as bactérias foram separadas por centrifugação (5000g por 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano foi ressuscitado em 5mL (0,1X o volume original da cultura) de CaCl<sub>2</sub> a 0,1M gelado. As células ressuscitadas foram então colocadas em gelo por 10 minutos. Depois desse tempo, foi realizada nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano foi ressuscitado em 2mL (0,04X o volume original da cultura) de CaCl<sub>2</sub> a 0,1M gelado.

Para cada produto de PCR, 5 µL de sua respectiva ligação foram adicionados a 200µL de suspensão bacteriana, acondicionados em microtubos estéreis. Os *ependorfs* foram então colocados no gelo por 30 minutos. Após esse período os microtubos foram inseridos em suporte de isopor e colocados em um becker com água a 42°C, sendo incubados por exatos 30 segundos, após o que foram transferidos para o gelo e aí mantidos por dois minutos. Um mililitro de meio LB pré-aquecido a 37°C foi adicionado a cada *ependorf* e o conteúdo foi transferido para tubos falcon de 50mL, que foram incubados a 37°C por uma hora no incubador orbital (100rpm).

Para crescimento foram plaqueados 300µL de bactérias transformadas em placas com 100 µg/mL de ampicilina (estoque 100 mg/ml) + 50 µL IPTG (0,5mM; 50 µL/mL) + 80 µL Xgal (80 µg/mL). O meio usado foi o LB a 40 g/L com 1,5% de agar (autoclavado). As bactérias foram plaqueadas com auxílio da alça e mantidas em estufa a 37°C doze horas. Uma colônia branca de cada placa foi selecionada e incubada em respectivo tubo falcon identificado contendo cinco mililitros de meio *circle grow* (40g/L) contendo ampicilina e tetraciclina (ambas a 100 µg/mL) por doze horas a 37°C no incubador orbital (200rpm). A fim de armazenar essas bactérias transformadas, 500µL de bactéria foram adicionados a 145µL de glicerol 65% e congelados em freezer -70°C, gerando uma solução de glicerol a 15%.

Em novos minitubos, 1,5mL de bactérias foram colocados e centrifugados a 13400rpm durante cinco minutos. O meio foi removido e a seguir 240µL de GET foram adicionados a cada *ependorf* e a solução foi agitada no vórtex até ressuspender todas as células. A cada tubo foi então adicionado 80mL de NaOH a 0,2N/ SDS a 1%, sendo feita mistura por inversão até a obtenção de uma solução límpida. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados a cada *ependorf* 80 µL de KOAc a 3M gelado. Seguiu-se nova incubação por 10 minutos e na sequência, os *ependorfs* foram centrifugados a 13400rpm durante 10 minutos. Todo o sobrenadante (400µL) foi transferido para novos *ependorfs* e foi adicionado isopropanol gelado na quantidade de 0,8X do volume transferido. Foi feita então a mistura das soluções por inversão (30 vezes), seguindo-se um período de incubação de uma hora. Após essa etapa, os *ependorfs* foram centrifugados por 10 minutos a 13400rpm. Todo o líquido foi removido vertendo-se os microtubos na pia e adicionando 400µL de etanol 70% gelado. Seguiu-se uma centrifugação por cinco minutos a 13400rpm. Todo etanol foi então removido seguindo-se a adição de 5µL de RNase a 10µg/µL+ 45 µL de água miliQ para cada minitubo, mantendo-os por doze horas a 4°C. Em seguida, a solução foi purificada de acordo com o protocolo descrito no item E e 2µL foram utilizados para eletroforese em gel de agarose a 1% para visualização dos produtos de ligação de cada gene estudado. O DNA plasmidial foi então quantificado de acordo com o descrito no item B.

Para linearização dos plasmídeos foi utilizada a enzima de restrição *Pst* I (cod. E1073Y; 12U/µL - Amersham Life Science, Pittsburgh, EUA). Foram utilizados 10µL de tampão 10x, 5µL de enzima *Pst* I, 2,5µg de DNA plasmidial e água suficiente para completar 100µL de solução em cada *ependorf* (Anexo 1). A reação foi mantida a 37°C *overnight*. Dois microlitros foram utilizados para eletroforese em gel de agarose a 2% para visualização dos produtos de digestão de cada gene clonado.

## **I. CONFECÇÃO DAS CURVAS PADRÃO E QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DAS AMOSTRAS**

Após a linearização dos plasmídeos, tais DNAs foram quantificados através da absorvância medida em 260 e 280 nm em espectrofotômetro a fim de obter-se a concentração do DNA. (SAMBROOK J *et al.*, 2001). Esse valor foi então utilizado na fórmula abaixo descrita para converter a concentração em g/μL no número de moléculas, a fim de confeccionar a curva padrão de quantificação absoluta:

$$\frac{Y \text{ g/}\mu\text{L DNA}}{[\text{comprimento do plasmídeo em pares de bases} \times 660]} \times 6,022 \times 10^{23} = n \text{ moléculas/}\mu\text{L}$$

Diluições apropriadas foram feitas para permitir curvas padrão de oito pontos, representando quantidades de moléculas utilizando  $\log_2$  como referência em virtude da grandeza Cq ser expressa dessa forma.

#### **J. CRITÉRIOS UTILIZADOS NO LIMITE DE DETECÇÃO**

De acordo com os resultados obtidos no capítulo I e ainda segundo BUSTIN SA. *et al.*, 2009 a análise da expressão gênica foi feita utilizando-se os critérios abaixo descritos:

	Gene expresso
Curva de Desnaturação	Específica
Deteccção	Ausência de falhas de amplificação
Número de cópias (normalizadas para 1μg RNA)	n maior ou igual a 3

**Tabela 3:** Critérios para análise da expressão por PCR em tempo real

Amostras apresentando menos de três cópias ou com falhas de amplificação foram denominadas de amostras com expressão gênica “no limite de deteccção”. Genes não expressos em determinada amostra foram denominados de “não detectados”.

## **5.2 – RESULTADOS**

### **5.2.1 DADOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS DA EXPRESSÃO DE CYPs NOS SÍTIOS ORAIS DE HUMANOS E ANIMAIS DE LABORATÓRIO**

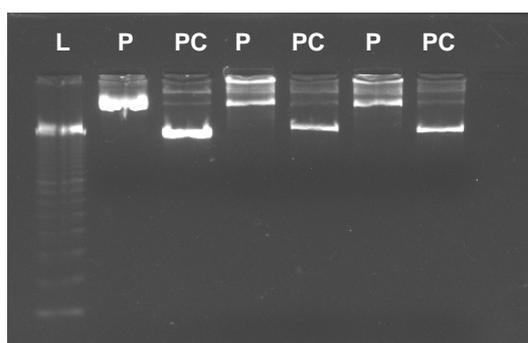
Foi observada durante a extração do RNA total dos sítios orais dos animais de laboratório uma grande variabilidade na quantidade de RNA obtido. Essa variabilidade estava diretamente associada a limitação na quantidade de tecido proveniente de certos sítios anatômicos da cavidade oral, principalmente assoalho de boca e gengiva (Tabela 4). Contudo, o objetivo dessa etapa inicial era o rastreamento da expressão de CYPs na cavidade oral desses animais, de tal forma que optamos por utilizar a maior quantidade possível de RNA durante a etapa de transcrição reversa e após isso normalizar os resultados, uma vez que fizemos quantificação absoluta. Um cenário similar também foi observado quando do processamento das amostras humanas (Tabela 6).

**Tabela 4:** Dados referentes a quantidade e qualidade do RNA recuperado de cada sítio oral dos animais de laboratório testados (Dados referentes ao pool dos cinco animais de cada espécie/linhagem).

Espécie (linhagem)	Sítio	[ ] RNA µg/µl	RNA – RT(µg)	260/280
Camundongo (BALB/c)	Gengiva	0,088	0,616	2,009
Camundongo (BALB/c)	Palato duro	0,070	0,490	2,047
Camundongo (BALB/c)	Lábio inferior	0,293	0,999	2,050
Camundongo (BALB/c)	Lábio superior	0,120	0,840	2,027
Camundongo (BALB/c)	Epitélio nasal	0,455	1,001	2,034
Camundongo (BALB/c)	Mucosa jugal	0,148	1,000	2,039
Camundongo (BALB/c)	Fígado	0,436	1,003	2,047
Camundongo (BALB/c)	Língua	0,173	1,000	2,028
Camundongo (BALB/c)	Assoalho	0,015	0,105	1,745
Camundongo (C57BL/6)	Gengiva	0,015	0,105	1,767
Camundongo (C57BL/6)	Palato duro	0,37	2,590	2,046
Camundongo (C57BL/6)	Lábio inferior	2,75	4,125	2,056
Camundongo (C57BL/6)	Lábio superior	2,815	4,223	2,055
Camundongo (C57BL/6)	Epitélio nasal	0,636	4,007	2,042
Camundongo (C57BL/6)	Mucosa jugal	0,648	4,018	2,047
Camundongo (C57BL/6)	Fígado	4,142	4,142	2,050
Camundongo (C57BL/6)	Língua	2,301	3,912	2,077
Camundongo (C57BL/6)	Assoalho	0,206	1,442	1,955
Camundongo (SV129)	Gengiva	0,453	3,171	2,043
Camundongo (SV129)	Palato duro	0,467	3,269	2,049
Camundongo (SV129)	Lábio inferior	0,111	0,777	1,993
Camundongo (SV129)	Lábio superior	0,071	0,497	2,034
Camundongo (SV129)	Epitélio nasal	0,308	2,156	2,045
Camundongo (SV129)	Mucosa jugal	0,097	0,679	2,000
Camundongo (SV129)	Fígado	2,344	3,985	1,984
Camundongo (SV129)	Língua	0,046	0,322	2,035
Camundongo (SV129)	Assoalho	0,066	0,462	2,012
Rato (Wistar)	Gengiva	1,208	3,986	2,03
Rato (Wistar)	Palato duro	3,997	3,997	2,029
Rato (Wistar)	Lábio inferior	4,526	3,621	2,018
Rato (Wistar)	Lábio superior	3,203	3,844	2,032
Rato (Wistar)	Epitélio nasal	3,202	3,842	2,051
Rato (Wistar)	Mucosa jugal	0,654	3,989	2,02
Rato (Wistar)	Fígado	4,98	3,984	1,752
Rato (Wistar)	Língua	2,362	3,779	2,038
Rato (Wistar)	Assoalho	0,559	3,913	2,017
Hamster (Sírio)	Gengiva	0,136	0,952	2,042
Hamster (Sírio)	Palato duro	0,596	3,993	2,048
Hamster (Sírio)	Lábio inferior	1,253	4,010	2,065
Hamster (Sírio)	Lábio superior	0,838	3,939	2,063
Hamster (Sírio)	Epitélio nasal	0,439	3,073	2,041
Hamster (Sírio)	Mucosa jugal	0,464	3,248	2,057
Hamster (Sírio)	Fígado	0,378	2,646	2,026
Hamster (Sírio)	Língua	0,547	3,829	2,071
Hamster (Sírio)	Assoalho	0,239	1,673	2,027

Legenda: [ ] RNA µg/µl : concentração obtida do RNA extraído de cada sítio; RNA – RT(µg): Quantidade de RNA utilizada na reação de transcrição reversa.

A Figura 4 apresenta DNAs plasmidiais após a utilização da enzima de restrição *Pst* I.



**Figura 4:** Gel de agarose a 3% mostrando a clivagem do DNA plasmidial com inserto pela enzima de restrição *Pst* I (Rato - CYP1A1). Legenda: L – *Ladder* (padrão de peso molecular de 100pb)  
P – Plasmídeo circular; PC – Plasmídeo clivado

A Tabela 5 descreve os parâmetros obtidos quando da confecção das curvas-padrão de quantificação absoluta. Podemos observar que todas as curvas apresentaram eficiência e coeficiente de determinação variando dentro de limites adequados. A Tabela 6 mostra que obtivemos RNA de qualidade satisfatória e em quantidade suficiente para todas as análises subsequentes.

**Tabela 5:** Curvas padrão de quantificação absoluta

Gene	Eficiência	Slope	Intercept	$r^2$
CYP1a1 camundongo	0,99	-3,349	33,387	0,998
CYP1a2 camundongo	1,00	-3,317	33,536	0,998
CYP2a5 camundongo	1,00	-3,326	33,737	0,999
CYP2b9 camundongo	0,95	-3,436	33,625	0,993
CYP2b10 camundongo	0,95	-3,448	33,288	0,999
CYP2e1 camundongo	1,00	-3,311	33,563	0,999
GAPDH camundongo	1,00	-3,334	33,370	0,999
CYP1A1 rato	1,06	-3,181	33,607	0,996
CYP1A2 rato	1,06	-3,181	33,880	0,998
CYP2A3 rato	1,00	-3,311	33,214	0,985
CYP2B1 rato	0,97	-3,384	33,578	0,998
CYP2E1 rato	1,00	-3,323	33,598	0,998
GAPDH rato	1,00	-3,334	33,370	0,999
CYP1A1 hamster	0,96	-3,414	33,568	0,999
CYP1A2 hamster	0,97	-3,396	33,341	0,997
CYP2A8 hamster	0,99	-3,350	33,441	0,992
CYP2A9 hamster	1,00	-3,327	33,688	0,998
CYP2A16 hamster	0,97	-3,399	33,466	0,999
GAPDH hamster	1,00	-3,332	33,437	0,999
CYP2E1 hamster	0,97	-3,408	33,547	0,999
CYP1A1 humano	1,02	-3,265	33,558	0,997
CYP1A2 humano	0,98	-3,378	33,584	0,999
CYP2A6 humano	0,99	-3,340	33,529	0,997
CYP2B6 humano	0,99	-3,346	33,735	0,999
CYP2E1 humano	1,00	-3,316	33,344	0,996
GAPDH humano	1,00	-3,328	33,246	0,981

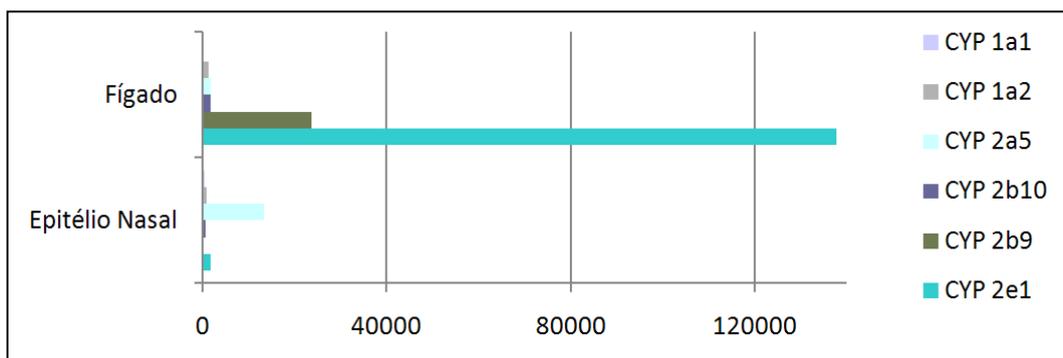
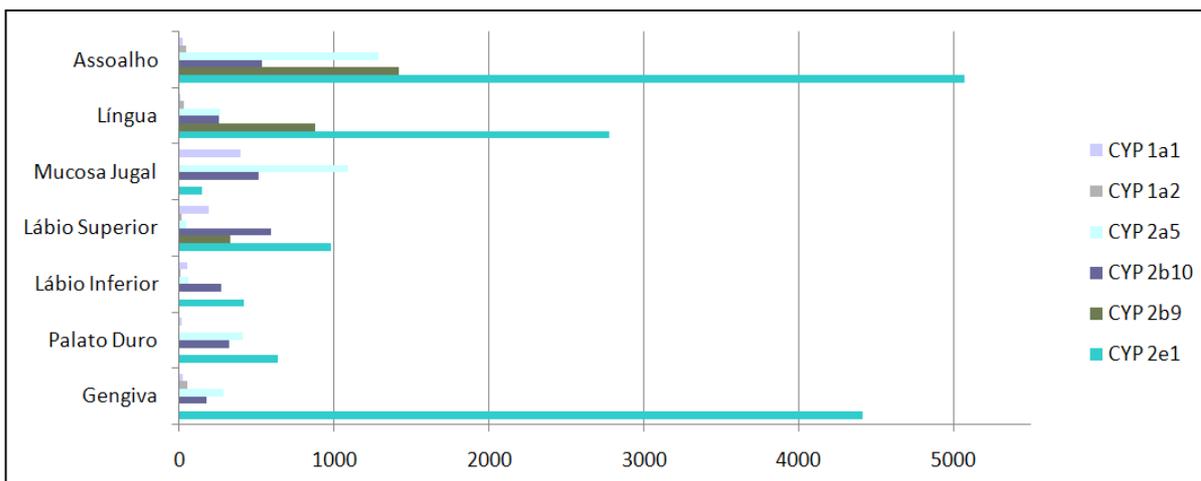
Legenda: A esquerda: a eficiência de cada reação. A direita: o coeficiente de determinação entre a quantidade de moléculas em cada diluição e os Cqs

**Tabela 6:** Dados referentes a quantidade e qualidade do RNA recuperado de cada sítio oral em humanos.

Humano	Sítio	[ ] RNA µg/µl	RNA – RT(µg)	260/280
1 (NT, NE, M)	Gengiva inferior	0,058	0,151	2,028
1 (NT, NE, M)	Gengiva superior	0,042	0,151	2,059
1 (NT, NE, M)	Lábio inferior	0,032	0,150	2,026
1 (NT, NE, M)	Lábio superior	0,023	0,152	1,966
1 (NT, NE, M)	Palato duro	0,069	0,152	2,024
1 (NT, NE, M)	Mucosa jugal	0,035	0,151	1,977
1 (NT, NE, M)	Trigonoretromolar	0,077	0,154	2,043
1 (NT, NE, M)	Língua	0,073	0,153	2,033
1 (NT, NE, M)	Assoalho	0,128	0,154	2,019
2 (NT, Etilista, F)	Gengiva inferior	0,242	0,174	2,041
2 (NT, Etilista, F)	Gengiva superior	0,191	0,176	2,078
2 (NT, Etilista, F)	Lábio inferior	0,046	0,175	2,018
2 (NT, Etilista, F)	Lábio superior	0,025	0,175	1,956
2 (NT, Etilista, F)	Palato duro	0,383	0,176	2,054
2 (NT, Etilista, F)	Mucosa jugal	0,138	0,175	2,018
2 (NT, Etilista, F)	Trigonoretromolar	0,081	0,175	2,010
2 (NT, Etilista, F)	Língua	0,129	0,175	2,031
2 (NT, Etilista, F)	Assoalho	0,043	0,175	2,038
3 (NT, 15 dias NE, M)	Gengiva inferior	0,740	0,252	2,078
3 (NT, 15 dias NE, M)	Gengiva superior	0,466	0,252	2,064
3 (NT, 15 dias NE, M)	Lábio inferior	0,037	0,250	2,091
3 (NT, 15 dias NE, M)	Lábio superior	0,056	0,250	2,090
3 (NT, 15 dias NE, M)	Palato duro	0,685	0,250	2,088
3 (NT, 15 dias NE, M)	Mucosa jugal	0,069	0,250	2,084
3 (NT, 15 dias NE, M)	Trigonoretromolar	0,962	0,250	2,089
3 (NT, 15 dias NE, M)	Língua	0,307	0,249	2,053
3 (NT, 15 dias NE, M)	Assoalho	0,837	0,251	2,083
4 (NT, 15 dias NE, F)	Gengiva inferior	0,421	0,501	2,035
4 (NT, 15 dias NE, F)	Gengiva superior	0,440	0,502	2,054
4 (NT, 15 dias NE, F)	Lábio inferior	0,164	0,500	2,040
4 (NT, 15 dias NE, F)	Lábio superior	0,084	0,500	2,049
4 (NT, 15 dias NE, F)	Palato duro	0,445	0,498	2,044
4 (NT, 15 dias NE, F)	Mucosa jugal	0,261	0,501	2,034
4 (NT, 15 dias NE, F)	Trigonoretromolar	0,226	0,499	2,036
4 (NT, 15 dias NE, F)	Língua	0,700	0,497	2,050
4 (NT, 15 dias NE, F)	Assoalho	0,175	0,501	2,037
5 (T,E, F)	Gengiva inferior	0,366	0,300	2,027
5 (T,E, F)	Gengiva superior	0,230	0,299	2,007
5 (T,E, F)	Lábio inferior	0,054	0,300	2,000
5 (T,E, F)	Lábio superior	0,044	0,308	2,000
5 (T,E, F)	Palato duro	0,474	0,299	2,038
5 (T,E, F)	Mucosa jugal	0,333	0,300	2,022
5 (T,E, F)	Trigonoretromolar	0,299	0,299	2,019
5 (T,E, F)	Língua	0,630	0,299	2,042
5 (T,E, F)	Assoalho	0,209	0,301	2,023

Legenda: NT – Não tabagista, T – Tabagista, NE – Não etilista, M- Sexo masculino, F- Sexo Feminino, 15 dias NE – 15 dias sem consumo de bebidas alcoólicas, E - Etilista, [ ] RNA µg/µl : concentração obtida do RNA extraído de cada sítio; RNA – RT(µg): Quantidade de RNA utilizada na reação de transcrição reversa.

As Tabelas 7 a 16 mostram a análise quantitativa da expressão de *CYPs*, onde os dados são expressos em número de cópias por micrograma de RNA extraído em cada sítio. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas (Figuras 5 a 12) e os valores são a mediana do número de cópias das plicatas.



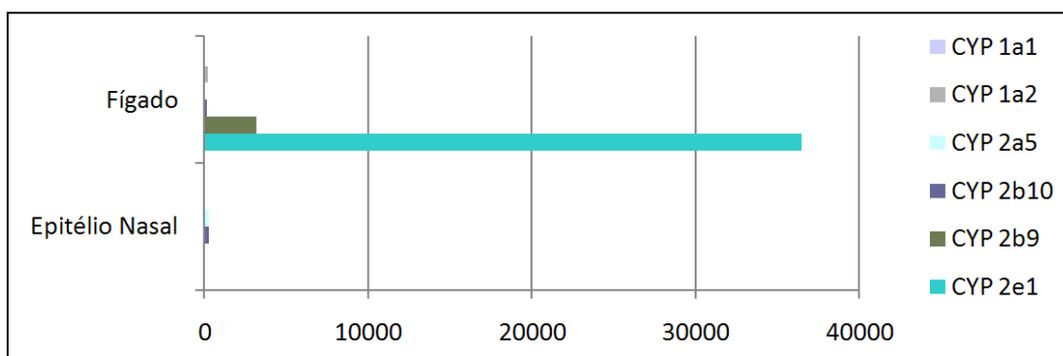
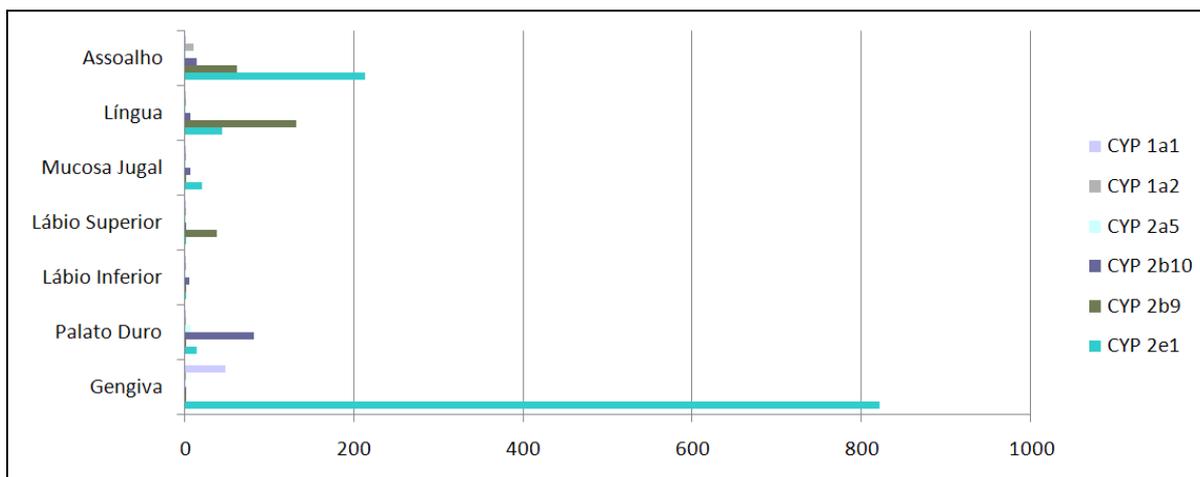
## BALB/c

Tabela 7: Expressão de CYPs em diferentes sítios da cavidade oral do camundongo BALB/c

	1a1	1a2	2e1	2a5	2b9	2b10	GAPDH	RIN
Gengiva	25	52	4415	289	E	182	41843	N/A
Palato Duro	21	E	643	411	E	327	54235	N/A
Lábio Inferior	56	9	423	65	E	277	3671	N/A
Lábio Superior	192	18	980	50	330	593	7872	N/A
Mucosa Jugal	395	E	152	1094	E	517	44054	N/A
Língua	9	32	2782	266	880	262	46828	N/A
Assoalho	25	51	5075	1291	1419	536	158095	N/A

Epitélio Nasal	400	902	1673	13443	Nd	550	33392	N/A
Fígado	13	1281	137696	1746	23750	1745	1970	N/A

Demais órgãos listados foram usados como controles positivos da expressão de CYPs (resultados expressos em número de cópias do RNA do gene por  $\mu\text{g}$  de RNA extraído). Legenda: E – Gene expresso no limite de detecção, Nd – Gene com expressão não detectada, N/A – Não disponível, RIN – RNA Integrity Number. Pool dos cinco animais dessa linhagem.



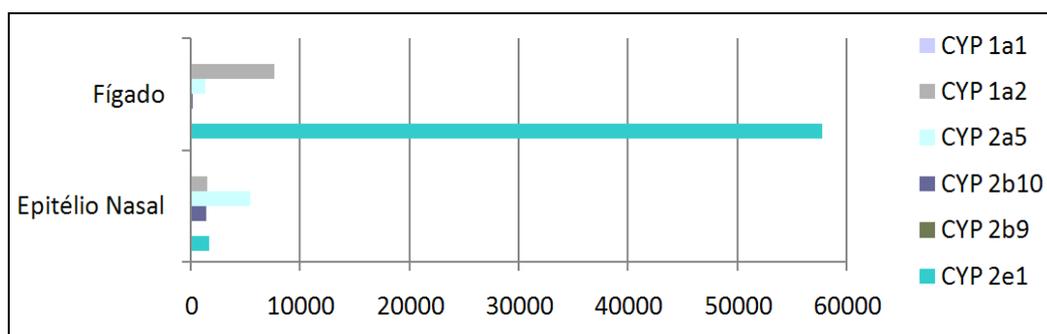
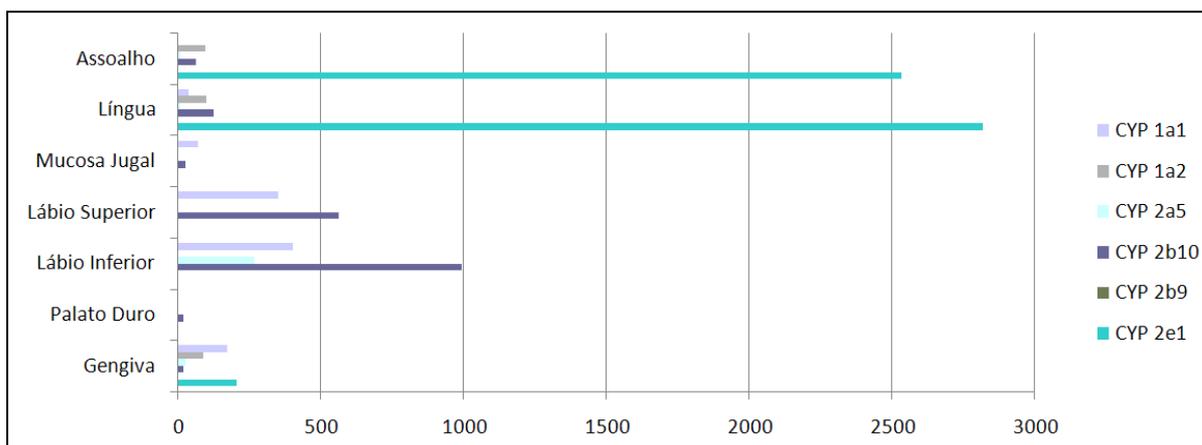
### C57Black/6

**Tabela 8:** Expressão de CYPs em diferentes sítios da cavidade oral do camundongo C57BL/6

	1a1	1a2	2e1	2a5	2b9	2b10	GAPDH	RIN
Gengiva	49	E	822	E	E	E	43024	N/A
Palato Duro	E	E	15	7	E	82	3605	3,7
Lábio Inferior	E	E	E	E	E	6	1193	3,3
Lábio Superior	E	E	E	E	39	E	493	2,7
Mucosa Jugal	3	E	21	E	E	8	750	1,9
Língua	E	E	45	E	133	7	3915	4,1
Assoalho	3	11	214	E	63	15	25156	2,5

Epitélio Nasal	28	18	82	287	Nd	294	3074	5,2
Fígado	E	268	36483	85	3180	202	1902	2,7

Demais órgãos listados foram usados como controles positivos da expressão de CYPs (resultados expressos em número de cópias do RNAm do gene por  $\mu\text{g}$  de RNA extraído). Legenda: E – Gene expresso no limite de detecção, Nd – Gene com expressão não detectada, N/A – Não disponível, RIN – RNA Integrity Number. Pool dos cinco animais dessa linhagem.



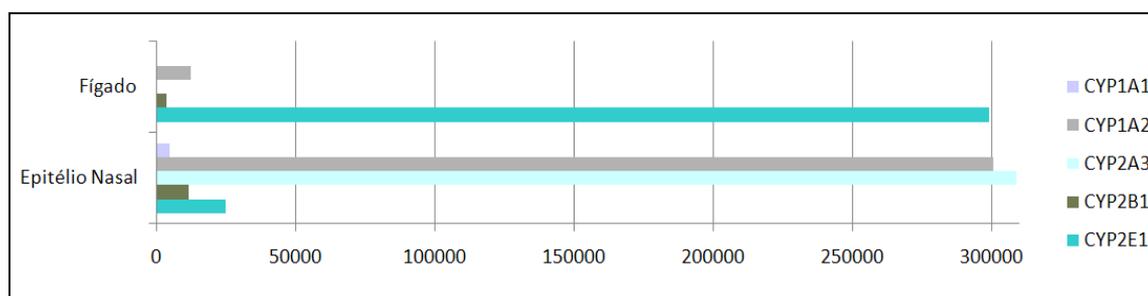
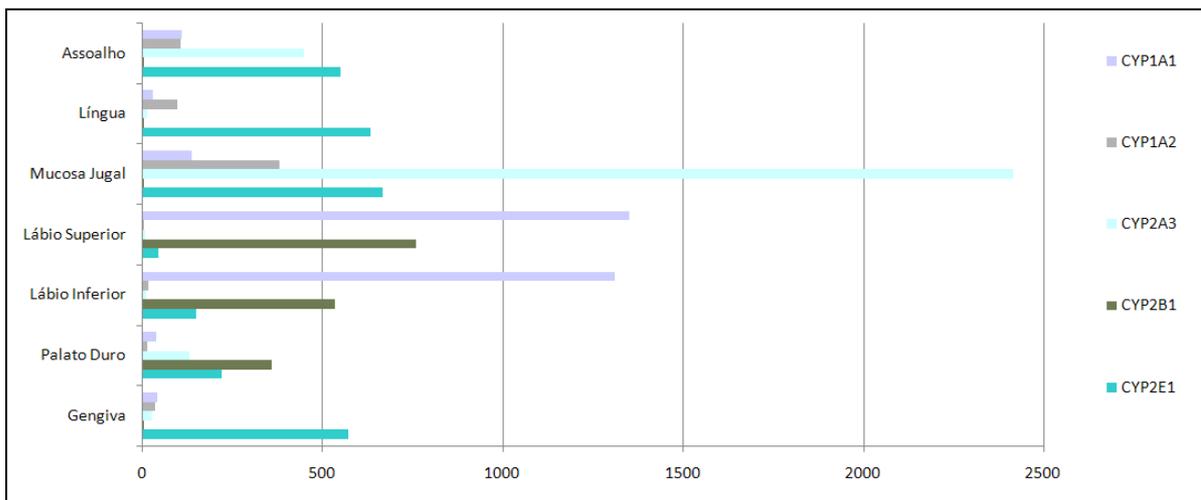
## SV129

Tabela 9: Expressão de CYPs em diferentes sítios da cavidade oral do camundongo SV129

	1a1	1a2	2e1	2a5	2b9	2b10	GAPDH	RIN
Gengiva	173	89	207	30	E	23	14201	8,1
Palato Duro	E	E	E	E	E	20	21695	9,2
Lábio Inferior	406	3	E	268	E	994	57014	9,0
Lábio Superior	352	E	E	E	E	563	34869	9,7
Mucosa Jugal	73	4	E	E	E	30	26598	9,9
Língua	40	102	2820	11	E	127	216398	9,5
Assoalho	E	99	2535	11	E	64	128377	9,3

Epitélio Nasal	E	1508	1725	5450	Nd	1426	28850	8,6
Fígado	3	7609	57763	1317	38	169	13948	9,5

Demais órgãos listados foram usados como controles positivos da expressão de CYPs (resultados expressos em número de cópias do RNAm do gene por  $\mu\text{g}$  de RNA extraído). Legenda: E – Gene expresso no limite de detecção, Nd – Gene com expressão não detectada, N/A – Não disponível, RIN – RNA Integrity Number. Pool dos cinco animais dessa linhagem.



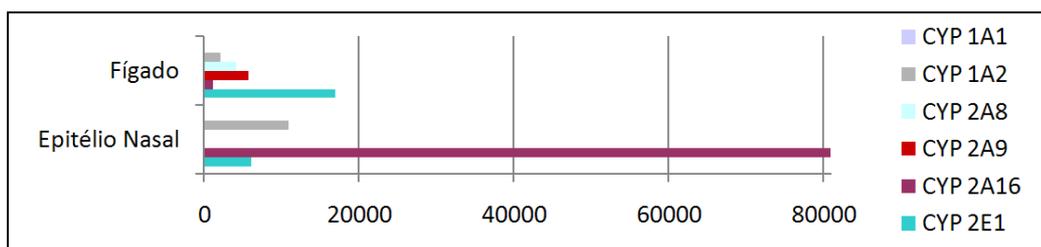
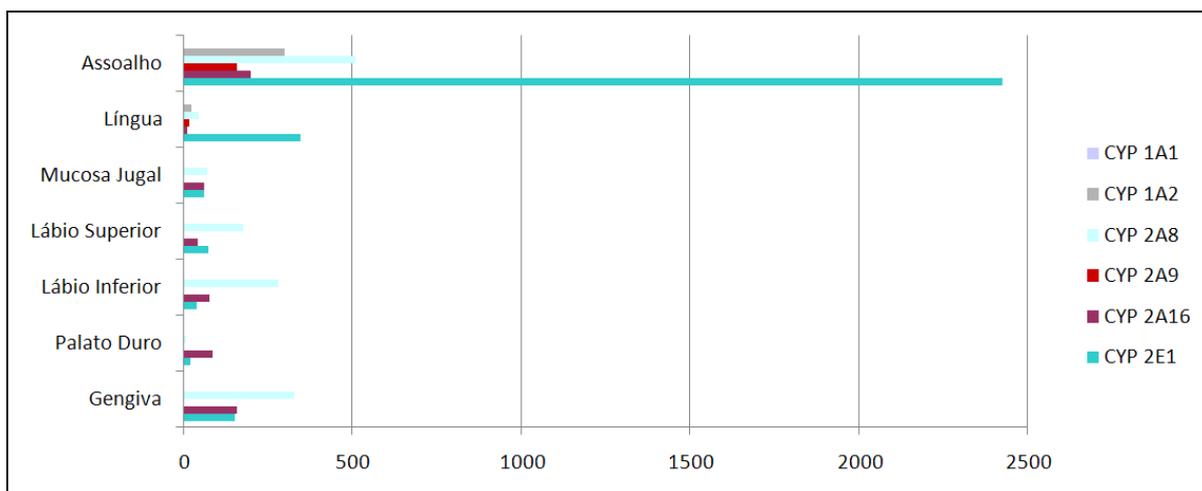
### Rato

**Tabela 10:** Expressão de CYPs em diferentes sítios da cavidade oral do rato Wistar

	1A1	1A2	2E1	2A3	2B1	GAPDH	RIN
Gengiva	41	35	571	25	E	38180	7,1
Palato Duro	37	13	220	130	359	43558	7,0
Lábio Inferior	1311	17	149	9	533	21694	6,7
Lábio Superior	1349	3	43	6	758	14390	7,0
Mucosa Jugal	136	379	667	2417	E	72542	6,5
Língua	27	96	632	14	E	24727	6,6
Assoalho	108	106	548	446	E	48019	6,9

Epitélio Nasal	4719	300724	24849	308847	11807	44946	7,2
Fígado	17	12585	299027	79	3826	15710	9,6

Demais órgãos listados foram usados como controlos positivos da expressão de CYPs (resultados expressos em número de cópias do RNAm do gene por µg de RNA extraído). Legenda: E – Gene expresso no limite de detecção, Nd – Gene com expressão não detectada, N/A – Não disponível, RIN – RNA Integrity Number. Pool dos cinco animais dessa espécie.



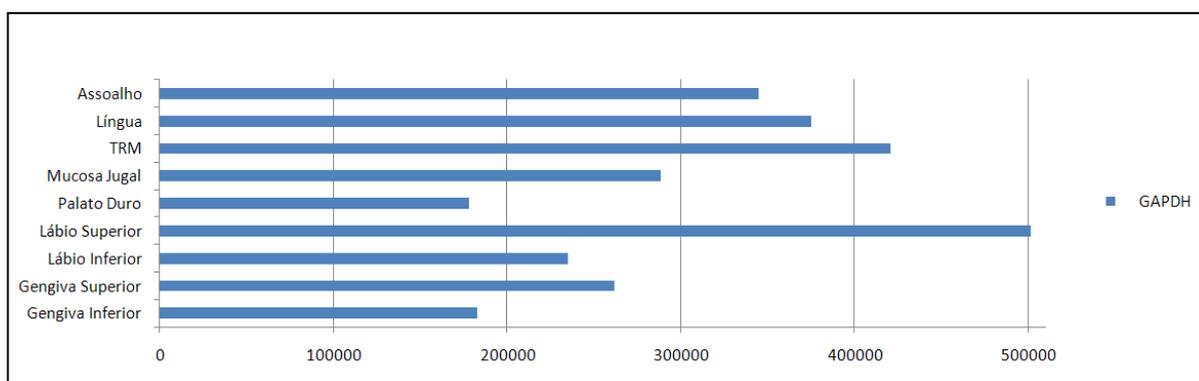
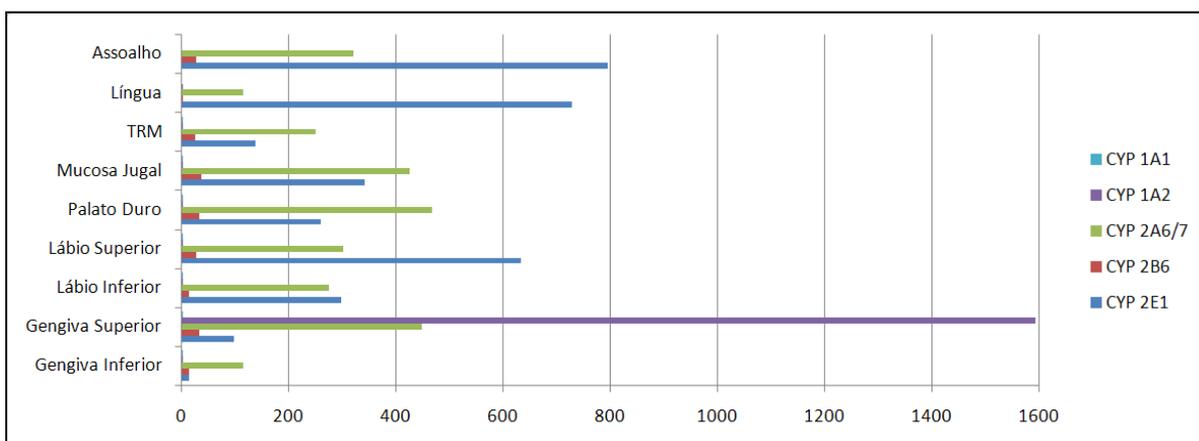
## Hamster

**Tabela 11:** Expressão de CYPs em diferentes sítios da cavidade oral do Hamster Sírio

	1A1	1A2	2A8	2A9	2A16	2E1	GAPDH	RIN
Gengiva	4	3	329	Nd	160	153	256513	6,8
Palato Duro	E	E	9	Nd	87	22	29876	7,6
Lábio Inferior	E	E	283	Nd	77	41	124800	7,5
Lábio Superior	E	E	178	Nd	44	75	152795	7,6
Mucosa Jugal	E	E	71	Nd	61	63	23224	N/A
Língua	E	26	46	19	13	347	94411	N/A
Assoalho	3	302	510	159	201	2425	198027	7,4

Epitélio Nasal	46	10889	40	Nd	80882	6124	84771	6,0
Fígado	14	2180	4238	5803	1158	16969	6240	2,7

Demais órgãos listados foram usados como controles positivos da expressão de CYPs (resultados expressos em número de cópias do RNAm do gene por  $\mu\text{g}$  de RNA extraído). Legenda: E – Gene expresso no limite de detecção, Nd – Gene com expressão não detectada, N/A – Não disponível, RIN – RNA Integrity Number. Pool dos cinco animais dessa espécie.



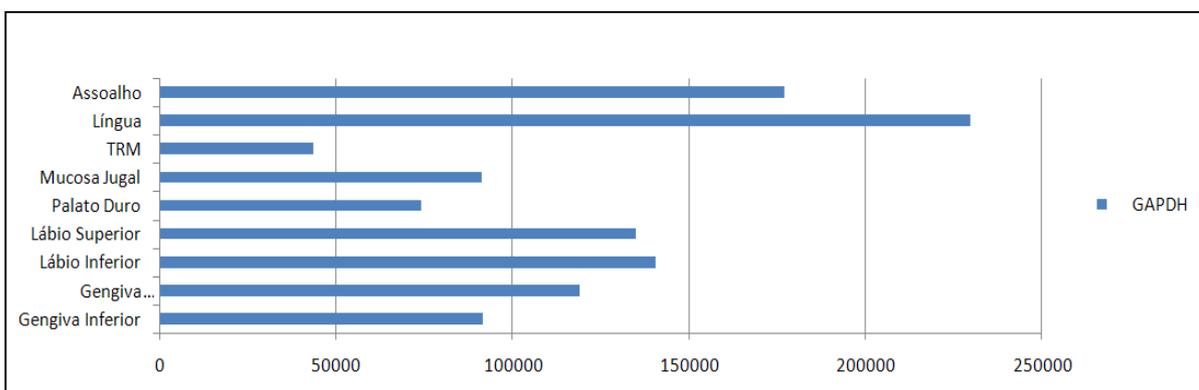
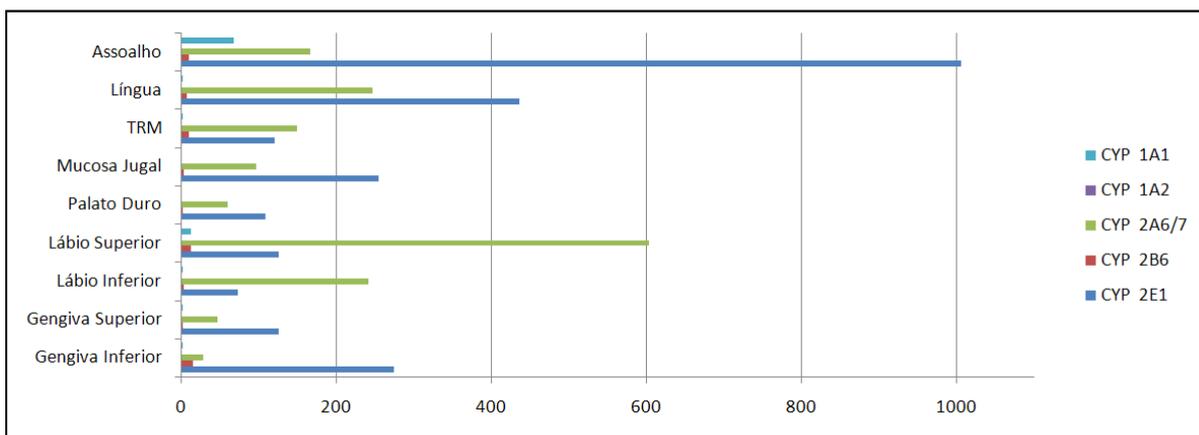
## Humano 1

Tabela 12: Humano 1 (Nunca fumou e não utilizou). Expressão de CYPs em cavidade oral

	1A1	1A2	2E1	2A6/7	2B6/7	GAPDH	RIN
Gengiva Inferior	E	E	13	115	13	182702	6,8
Gengiva Superior	E	1592	98	449	32	261768	6,5
Lábio Inferior	E	E	297	275	14	235307	6,3
Lábio Superior	E	E	632	302	28	501651	6,9
Palato Duro	E	E	259	468	33	178421	5,6
Mucosa Jugal	E	E	342	425	36	288715	6,3
Trigono retromolar	E	E	138	251	25	420656	N/A
Língua	Nd	E	729	115	E	375444	N/A
Assoalho	Nd	Nd	795	320	27	344942	N/A

Fígado*	4648	105594	1027875	63656	9028	556400	N/A
---------	------	--------	---------	-------	------	--------	-----

\*Amostra de fígado humano não pareada. (resultados expressos em número de cópias do RNAm do gene por µg de RNA extraído).  
 Legenda: E – Gene expresso no limite de detecção, Nd – Gene com expressão não detectada, N/A – Não disponível, RIN – RNA Integrity Number

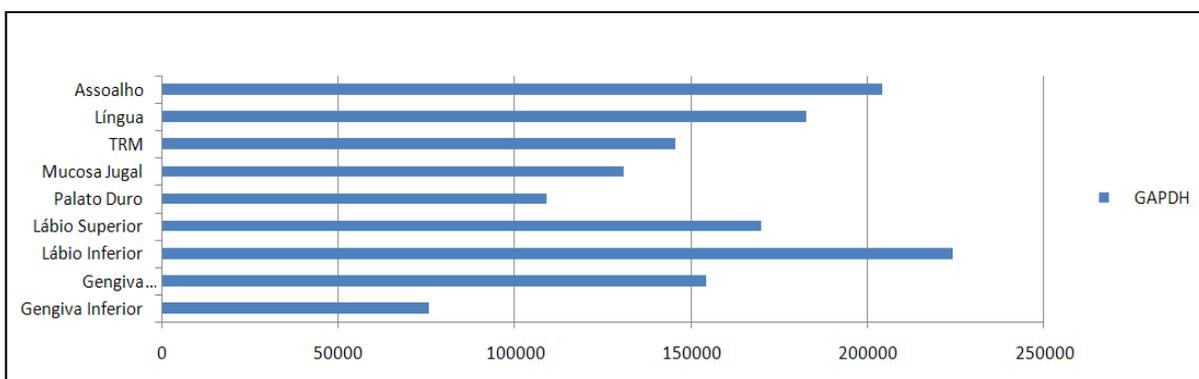
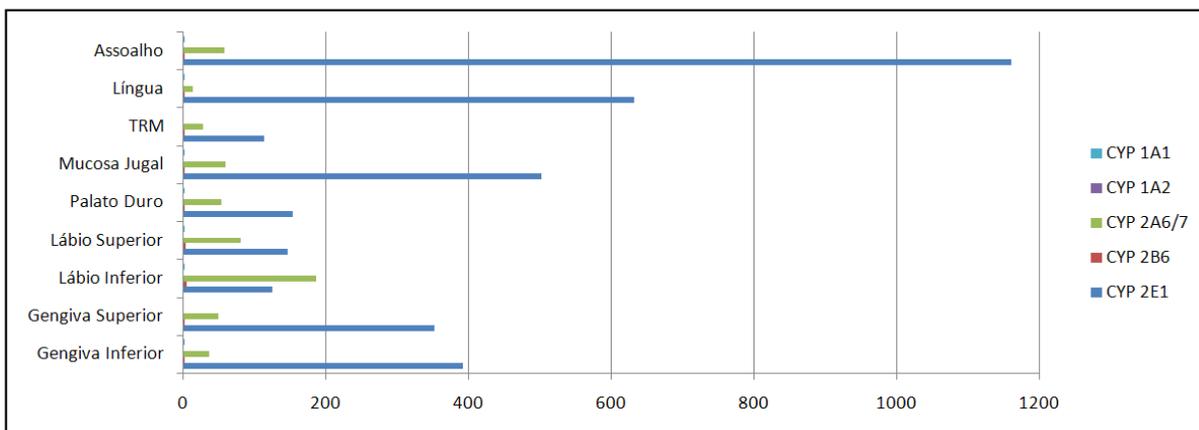


## Humano 2

**Tabela 13:** Humano 2 (Não tabagista e etilista). Expressão de CYPs em cavidade oral

	1A1	1A2	2E1	2A6/7	2B6/7	GAPDH	RIN
Gengiva Inferior	E	Nd	274	28	15	91707	N/A
Gengiva Superior	E	Nd	125	46	E	119224	N/A
Lábio Inferior	E	Nd	73	241	3	140555	6,6
Lábio Superior	12	Nd	125	603	12	134897	7,7
Palato Duro	Nd	Nd	108	59	E	74066	N/A
Mucosa Jugal	Nd	Nd	254	96	3	91207	8,3
Trigono retromolar	E	Nd	120	149	10	43776	5,2
Língua	E	Nd	436	247	7	229891	N/A
Assoalho	68	Nd	1006	166	9	176933	7,5

Resultados expressos em número de cópias do RNAm do gene por µg de RNA extraído. Legenda: E – Gene expresso no limite de detecção, Nd – Gene com expressão não detectada, N/A – Não disponível, RIN – RNA Integrity Number

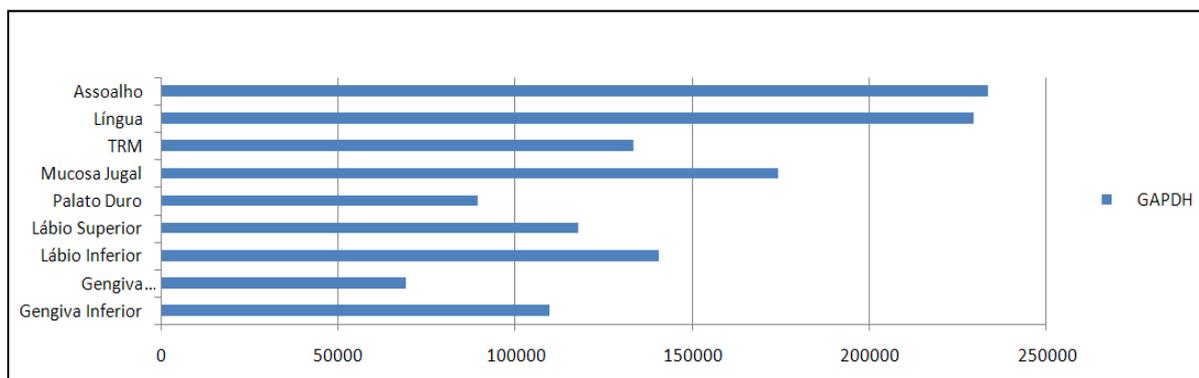
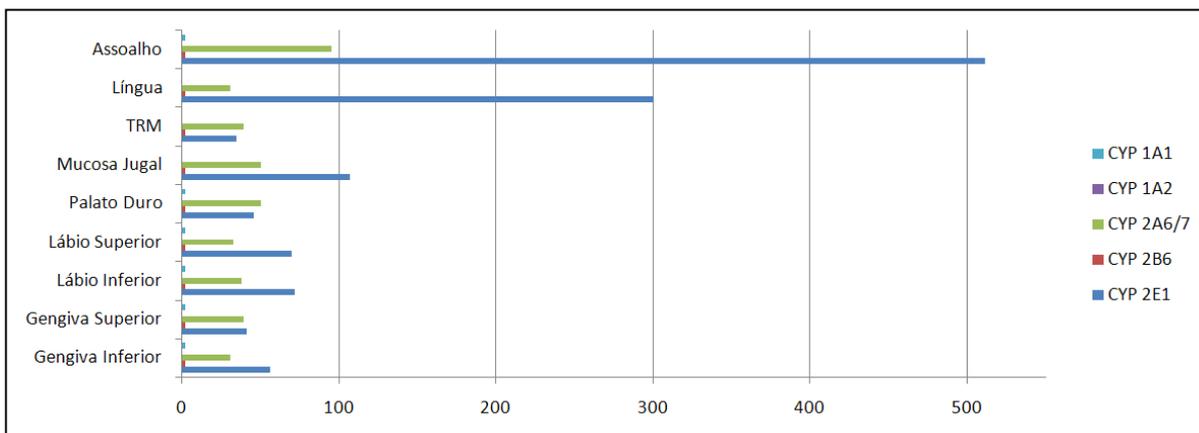


### Humano 3

**Tabela 14:** Humano 3 (Não tabagista e com 15 dias de abstinência de bebidas alcoólicas)  
Expressão de CYPs em cavidade oral

	1A1	1A2	2E1	2A6/7	2B6/7	GAPDH	RIN
Gengiva Inferior	E	Nd	392	36	E	75655	8,6
Gengiva Superior	Nd	Nd	352	49	E	154226	8,3
Lábio Inferior	E	Nd	125	186	4	224256	8,2
Lábio Superior	E	Nd	146	80	3	170024	8,9
Palato Duro	E	Nd	153	53	E	108972	8,2
Mucosa Jugal	E	Nd	502	59	E	130936	7,5
Trigono retromolar	Nd	Nd	113	28	E	145552	8,6
Língua	E	Nd	632	13	E	182590	9,7
Assoalho	E	Nd	1160	57	E	204024	8,5

Resultados expressos em número de cópias do RNAm do gene por µg de RNA extraído. Legenda: E – Gene expresso no limite de detecção, Nd – Gene com expressão não detectada, N/A – Não disponível, RIN – RNA Integrity Number

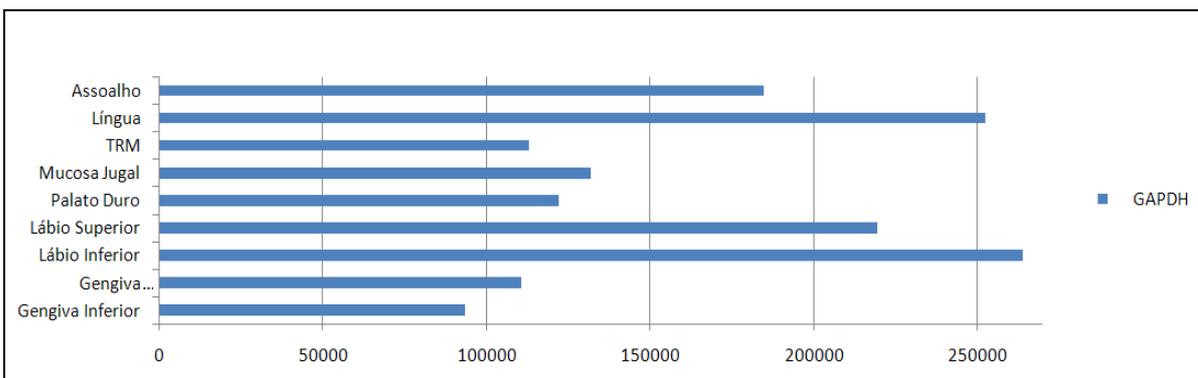
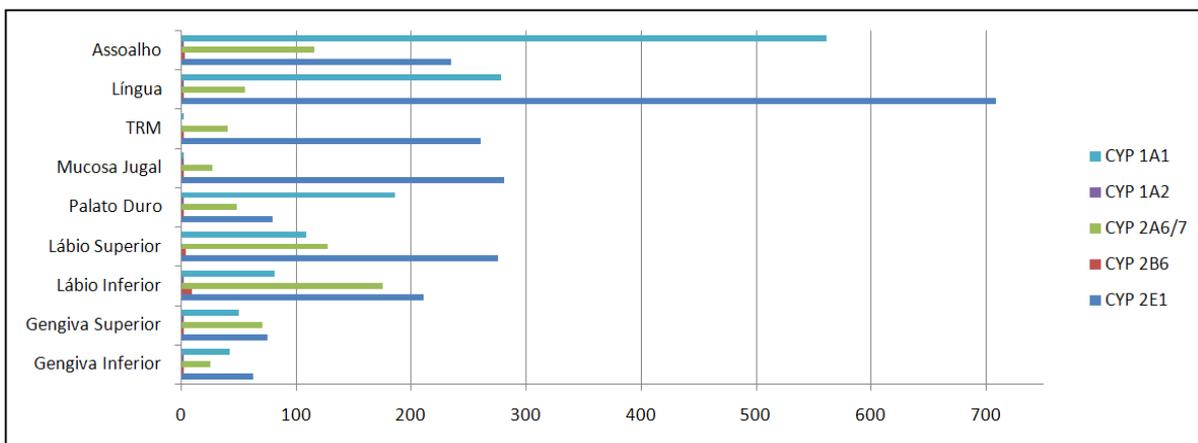


### Humano 4

**Tabela 15:** Humano 4 (Nunca fumou e com 15 dias de abstinência de bebidas alcoólicas)  
Expressão de CYPs em cavidade oral

	1A1	1A2	2E1	2A6/7	2B6/7	GAPDH	RIN
Gengiva Inferior	E	Nd	56	31	E	109625	8,4
Gengiva Superior	E	Nd	41	39	E	69305	8,1
Lábio Inferior	E	Nd	72	38	E	140622	9,1
Lábio Superior	E	Nd	70	33	E	117784	8,6
Palato Duro	E	Nd	46	50	E	89546	7,3
Mucosa Jugal	Nd	Nd	107	50	E	174132	8,0
Trigono retromolar	Nd	Nd	35	39	E	133397	9,0
Língua	Nd	Nd	300	31	E	229531	9,0
Assoalho	E	Nd	511	95	E	233345	9,2

Resultados expressos em número de cópias do RNAm do gene por µg de RNA extraído. Legenda: E – Gene expresso no limite de detecção, Nd – Gene com expressão não detectada, N/A – Não disponível, RIN – RNA Integrity Number

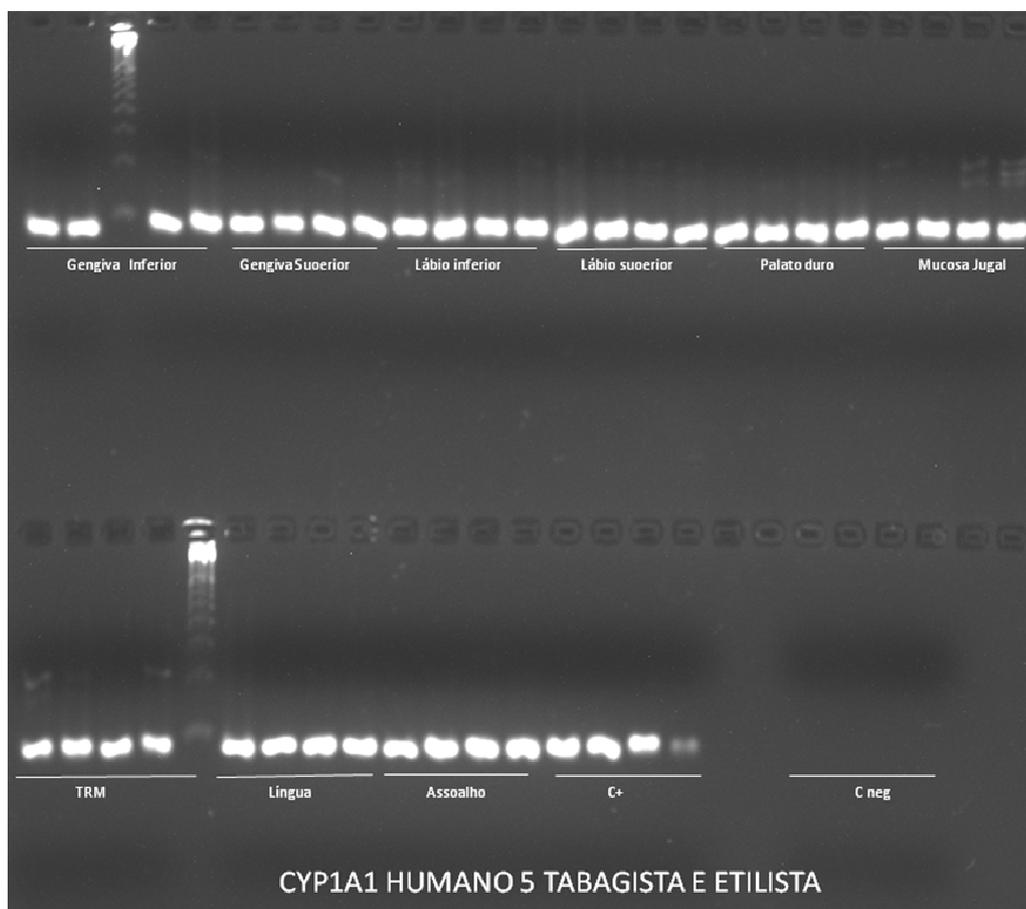
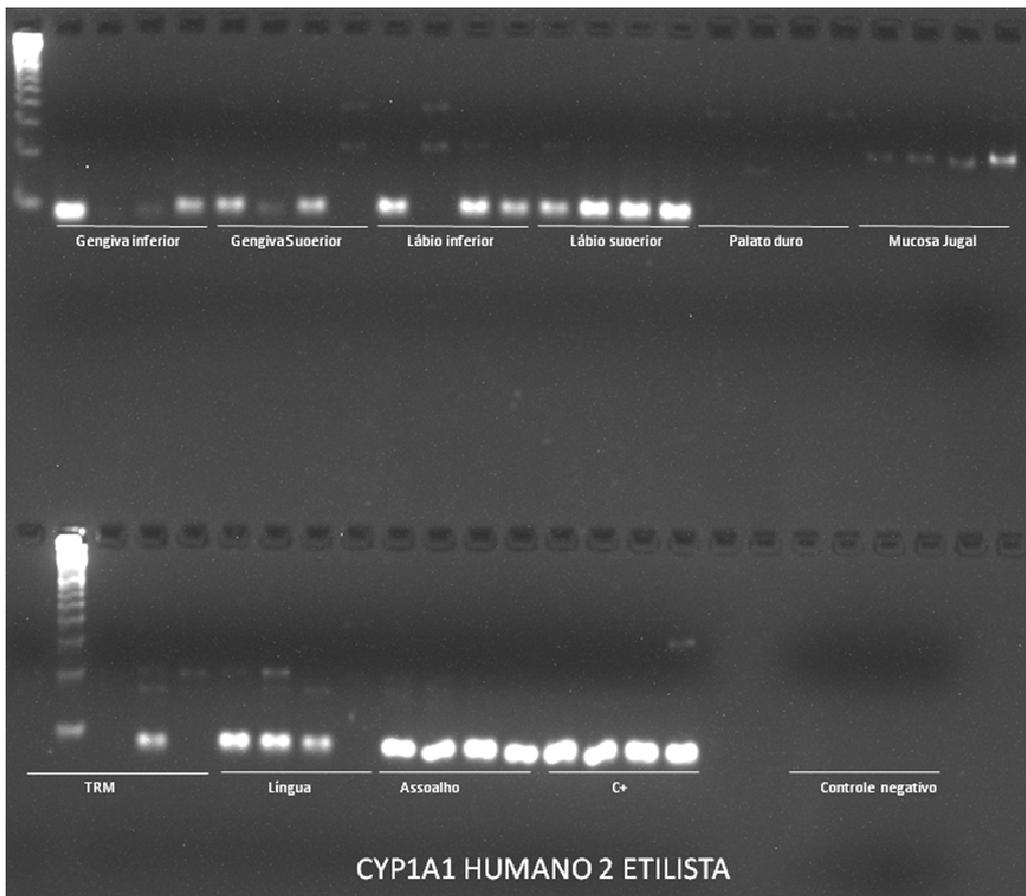


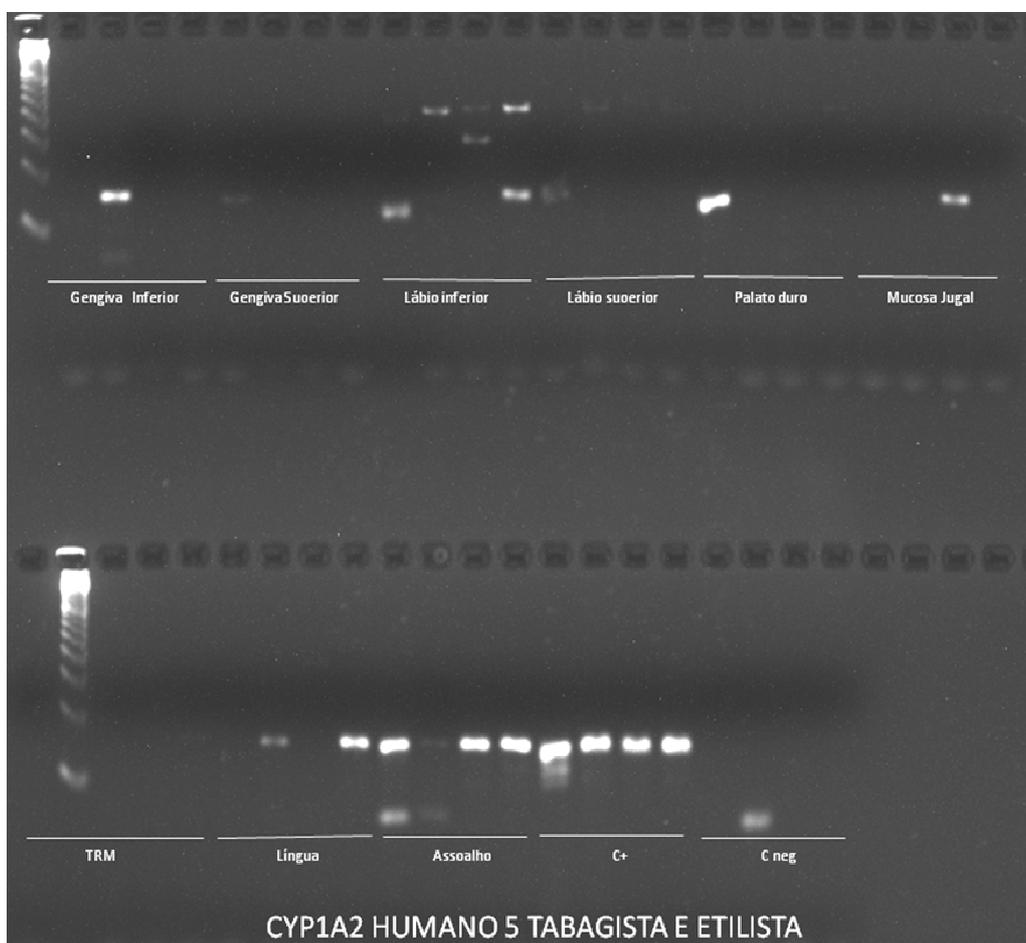
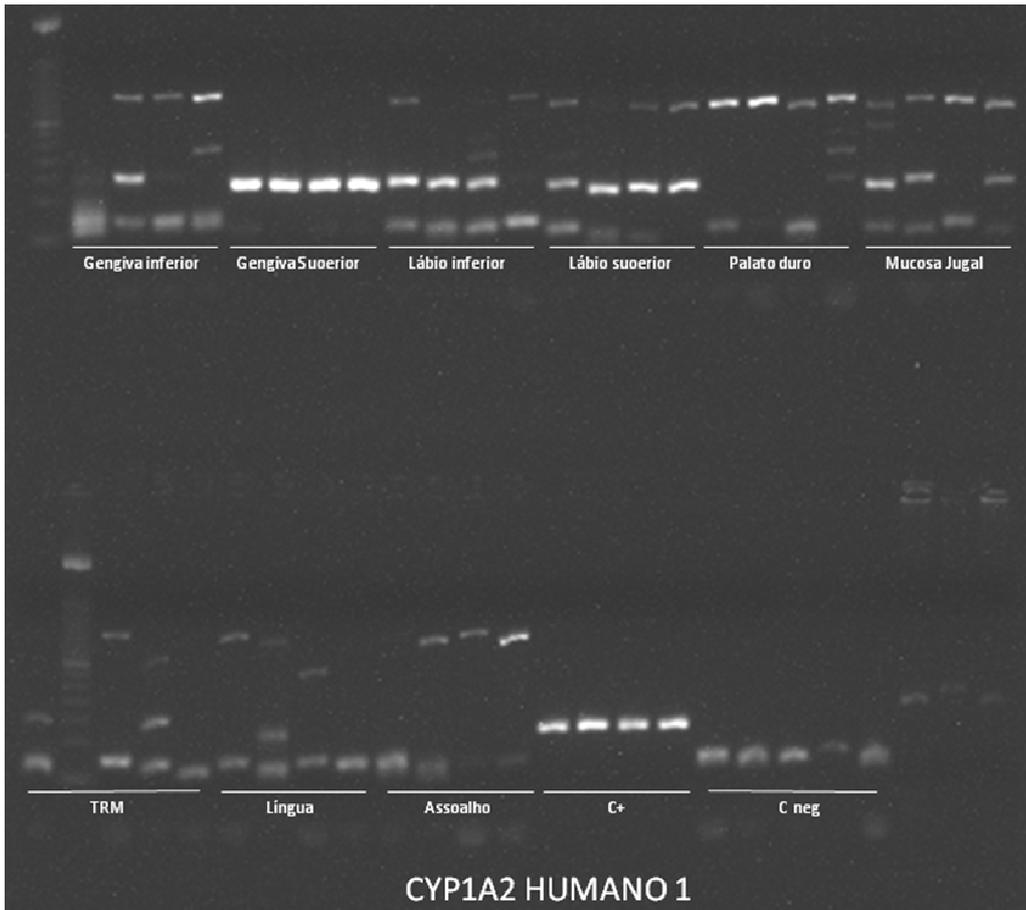
## Humano 5

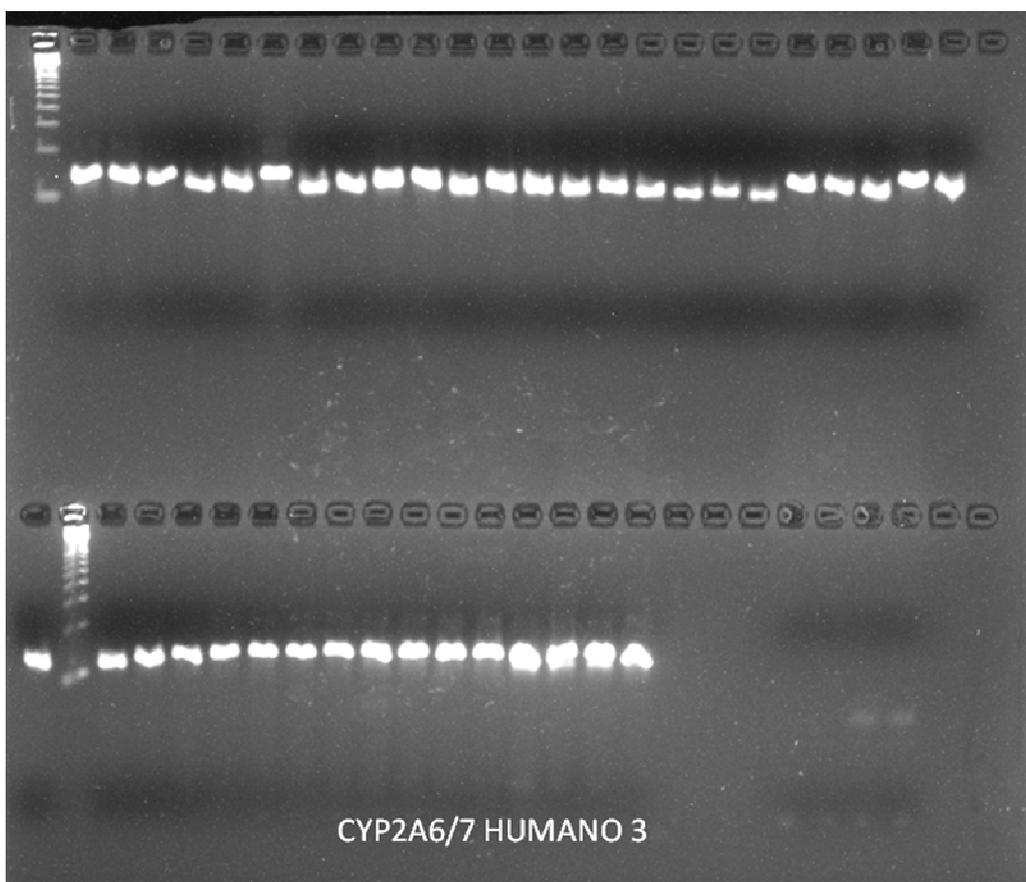
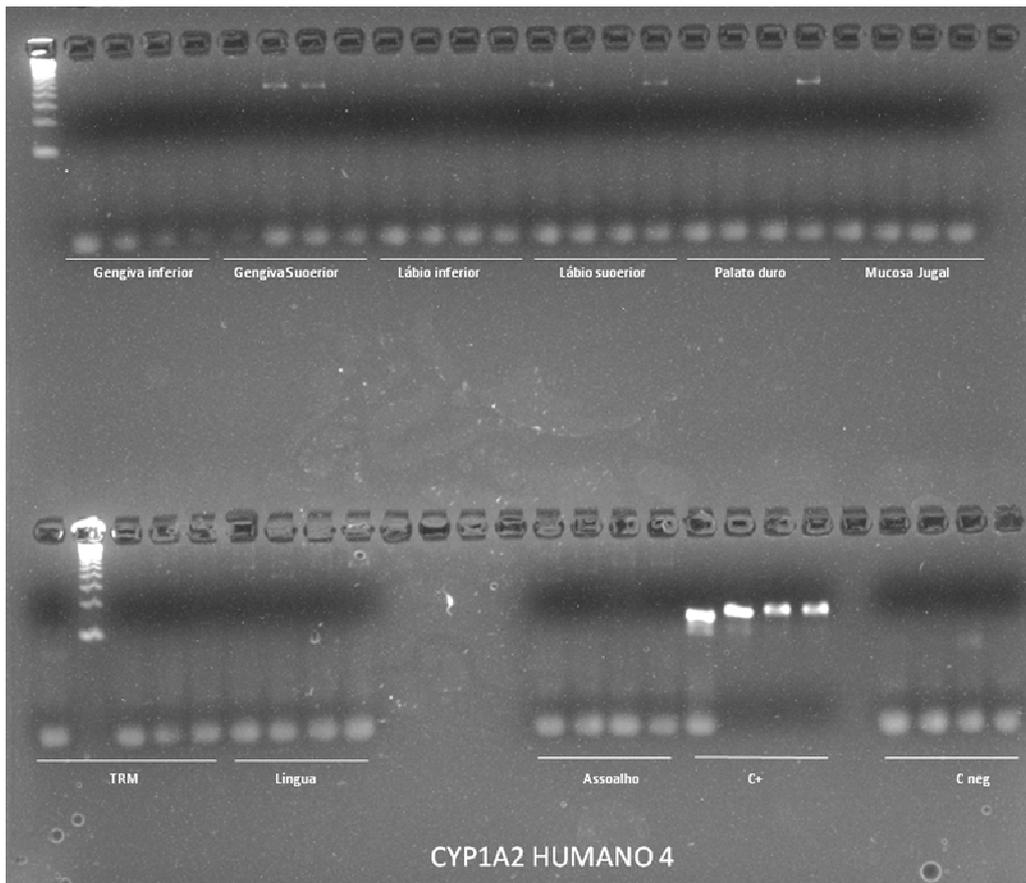
Tabela 16: Humano 5 (Tabagista e Etilista). Expressão de CYPs em cavidade oral

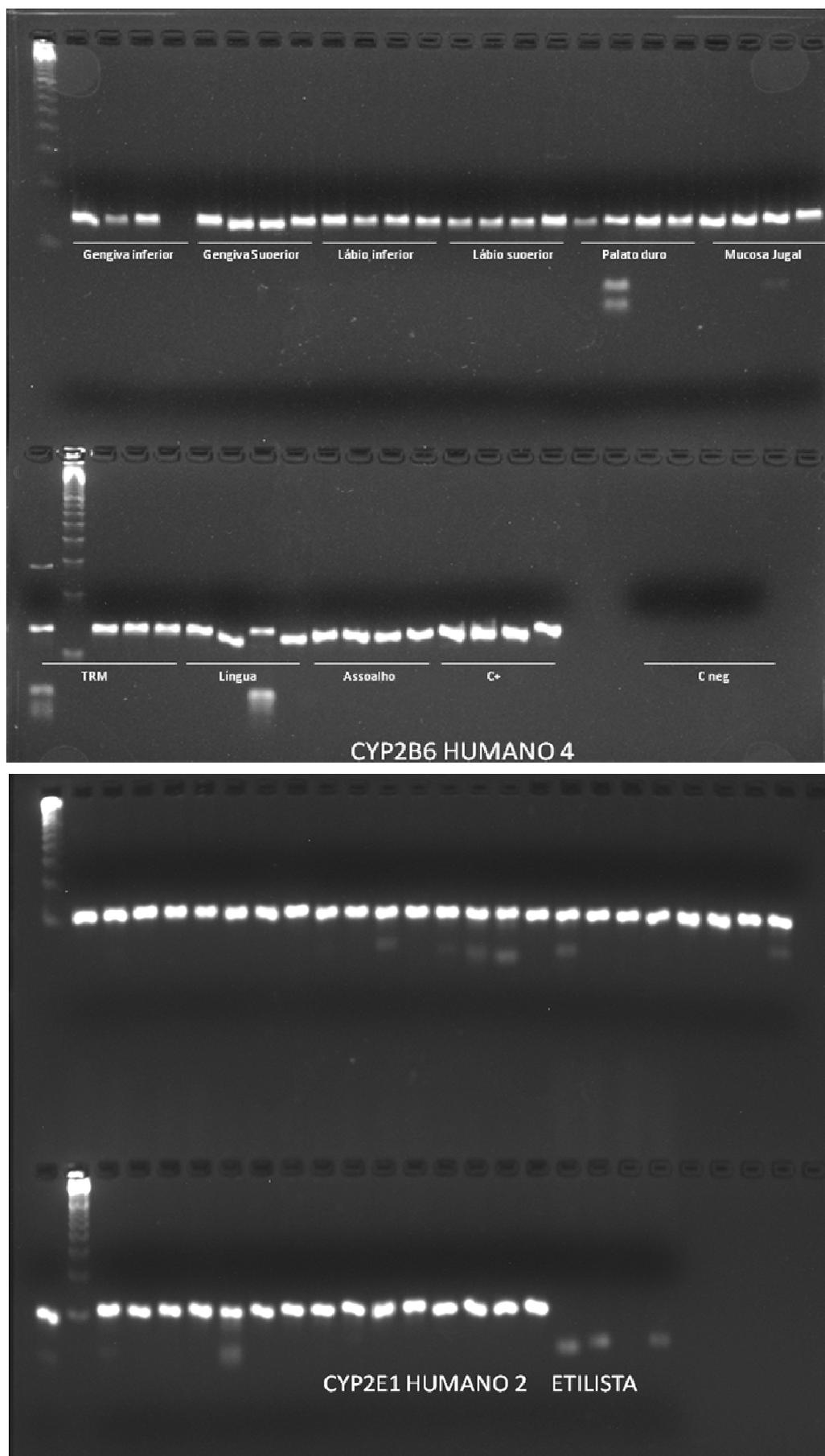
	1A1	1A2	2E1	2A6/7	2B6/7	GAPDH	RIN
Gengiva Inferior	42	E	62	25	E	93659	6,6
Gengiva Superior	50	E	75	70	E	110793	7,2
Lábio Inferior	81	E	211	175	9	263936	N/A
Lábio Superior	109	Nd	275	127	4	219617	7,7
Palato Duro	186	E	79	48	E	122128	7,1
Mucosa Jugal	E	E	281	27	E	131915	7,7
Trigono retromolar	E	Nd	260	40	E	113007	8,1
Língua	278	E	709	55	E	252615	7,3
Assoalho	561	E	235	116	3	184835	7,6

Resultados expressos em número de cópias do RNAm do gene por  $\mu\text{g}$  de RNA extraído. Legenda: E – Gene expresso no limite de detecção, Nd – Gene com expressão não detectada, N/A – Não disponível, RIN – RNA Integrity Number









**Figuras 5 a 12** - Géis de agarose a 3% das reações de qPCR da análise de expressão de CYPs em cavidade oral de humanos (Ladder 100pb, exceto CYP1A2 humano 1 - 50pb).

Os resultados demonstram uma expressão constitutiva de enzimas CYP na cavidade oral do camundongo BALB/c. A enzima CYP2E1 é a mais expressa, com destaque para sua expressão em assoalho, gengiva inferior e língua. Língua e assoalho concentraram a maior quantidade e a maior variedade de enzimas CYP.

O camundongo C57BL/6 apresentou expressão constitutiva de enzimas CYP em sua cavidade oral, mas em uma quantidade muito inferior ao BALB/c. Mais uma vez a gengiva inferior apresentou expressão destacada de CYP2E1 e assoalho de boca e língua expressaram a maior variedade e quantidade de enzimas CYP. Nessa linhagem em particular, observamos que os resultados foram influenciados pela qualidade do RNA extraído, como demonstrado pelos valores RIN (*RNA integrity number*).

O camundongo SV129 apresentou expressão menor de CYP2E1 em gengiva inferior, que notadamente foi mais expressa em língua e assoalho de boca. Essa linhagem apresentou expressão intermediária de CYP em cavidade oral, maior que o camundongo C57BL/6, mas menor que o BALB/c. Mais uma vez língua e assoalho concentraram a maior variedade e quantidade de enzimas CYP.

O rato Wistar também apresentou expressão constitutiva de enzimas CYP em toda a cavidade oral, porém em um padrão bem diferente do observado nos camundongos. As maiores expressões foram observadas em lábio superior, lábio inferior e em mucosa jugal, destacando-se aí a expressão de CYP2A3.

O Hamster sírio mostrou um padrão de expressão de enzimas CYP mais similar ao observado nos camundongos. Merece destaque a expressão de CYP2E1 em língua e assoalho, onde retorna o padrão de expressão de maior diversidade e quantidade nesses sítios.

A análise da expressão de enzimas CYP na cavidade oral de humanos demonstrou que existe expressão constitutiva de CYP2A6/7, CYP2B6/7 e CYP2E1 em todos os sítios orais. Houve variabilidade interindividual com relação ao nível de expressão dessas enzimas. A expressão de CYP1A1 foi muito baixa na cavidade oral dos humanos exceto no indivíduo tabagista. Três dos cinco indivíduos não expressaram CYP1A2. O indivíduo tabagista demonstrou expressão baixa enquanto um indivíduo não tabagista e não etilista apresentou expressão muito alta de CYP1A2 em gengiva superior juntamente com expressão mais baixa nos outros sítios de cavidade oral.

De forma geral observamos que a língua e o assoalho de boca dos humanos testados apresentaram maior variedade de enzimas CYP expressas e em maior nível que os outros sítios orais.

## **6. CAPÍTULO III**

### **ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS E DE SOBREVIVÊNCIA DE PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE DIFERENTES SÍTIOS ANATÔMICOS DE CAVIDADE ORAL**

## **6.1 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **A. SELEÇÃO DA AMOSTRA**

Foi realizada uma busca retrospectiva utilizando-se os arquivos informatizados da Divisão de Patologia (DIPAT/INCA), de forma a identificar todos os casos de carcinomas de células escamosas de cavidade oral diagnosticados por esse serviço no período de 2005 a 2006. Foram utilizadas as palavras-chave carcinoma epidermóide e carcinoma de células escamosas e os CIDs topográficos foram ajustados para a região de cavidade oral. A seguir foi feita uma segunda busca utilizando-se as mesmas palavras-chave, porém sem especificar o CID, de modo a recuperarmos os carcinomas de células escamosas de todo o corpo diagnosticados no período de 2005 a 2006 pela DIPAT. Tais bancos foram cruzados, permitindo a identificação de todos os pacientes portadores de carcinoma de células escamosas de cavidade oral no respectivo biênio. A carta de aprovação por parte do comitê de ética encontra-se no anexo 2.

### **B. DADOS DEMOGRÁFICOS**

Todos os 824 pacientes selecionados do banco de dados da DIPAT tiveram seus dados demográficos, clínicos e de evolução recuperados de seus respectivos

prontuários por meio de uma ficha de coleta de dados padronizada (anexo 3). As informações clinicopatológicas coletadas de cada caso incluíram idade, sexo, uso de tabaco e álcool, localização tumoral, tipo de tratamento, tempo de espera entre a biópsia e o tratamento, estadiamento clínico e patológico, presença de recidiva tumoral, surgimento de segundo tumor primário (STP) e sobrevida do paciente. Foi construído um banco de dados digital utilizando-se a plataforma Epi info para digitação das fichas dos pacientes que se enquadraram nos critérios de inclusão, descritos a seguir. Um segundo pesquisador reviu cada um desses prontuários para confirmação das informações coletadas.

### **C. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Os critérios avaliados para inclusão dos pacientes neste trabalho foram:

- Pacientes que, na primeira consulta, apresentavam carcinomas de células escamosas em APENAS uma região anatômica oral. Casos que acometessem qualquer região de orofaringe foram excluídos;
- Pacientes sem histórico prévio de câncer (exceto pele não melanoma).
- Pacientes não submetidos a quimioterapia e/ou radioterapia prévia;
- Pacientes com diagnóstico histopatológico de CCE confirmado pela DIPAT no período de 01/01/2005 a 31/12/2006;
- Pacientes cujos prontuários encontravam-se acessíveis para consulta;
- Pacientes cujas amostras de tumor emblocadas em parafina encontravam-se arquivados na DIPAT;
- Material exibindo histopatologia característica;
- Boa qualidade e preservação do material.

Para a análise de sobrevida foram excluídos pacientes que apresentaram metástase a distância ao diagnóstico, com margens positivas na histopatologia, com

dados clínicopatológicos incompletos ou que não tivessem tratamento com intenção curativa. Somente pacientes com um mínimo de 12 meses de acompanhamento (ou que evoluíram a óbito pela doença nesse período) foram incluídos. A sobrevida global e a sobrevida livre de doença foram calculadas (CAMISASCA DR *et al*, 2009). Pacientes que apresentavam tumores sincrônicos (diagnosticados em até seis meses após o diagnóstico do tumor índice) também não foram incluídos na análise de sobrevida.

Para a análise de segundos tumores primários (STP) foram utilizados os critérios de Warren e Gates, modificados pelo *National Cancer Institute*. Um STP foi definido como um câncer sólido invasivo metacrônico diagnosticado após seis meses do CCE índice. Se o segundo câncer não teve origem de célula escamosa ou se desenvolveu em uma localização anatômica diferente foi considerado como um segundo tumor primário. Se o segundo câncer foi um CCE e se desenvolveu na mesma localização anatômica do câncer índice, ele foi considerado como um segundo tumor primário apenas se 60 meses tivessem se passado desde o diagnóstico do câncer índice. Casos em que os registros médicos indicassem como sendo recidivas ou metástases foram desconsiderados. Tais critérios são conservadores e tem como objetivo minimizar a classificação de recidivas como STPs (MORRIS LGT *et al*, 2011).

Os blocos de parafina contendo as amostras de tumor dos pacientes que se enquadraram nos critérios de inclusão foram recuperados dos arquivos da DIPAT e empregados para análises moleculares.

#### **D. EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE MATERIAL PARAFINADO**

A extração foi realizada como descrito pelo manual de uso do *QIAamp DNA FFPE Tissue kit* (QIAGEN®), com modificações. Anteriormente ao processamento do material parafinado foi realizada a macrodissecção a partir da avaliação das lâminas espelho. Esta macrodissecção consistiu na remoção da área tumoral de

cortes de tecido estendidos sobre lâminas histológicas com o uso de bisturi descartável de modo que a porção tumoral pôde ser isolada e coletada dentro de microtubos com capacidade de 1,5 mL. Desta forma, foram utilizadas para a extração de DNA 15 secções com 5µm de espessura dos blocos contendo material de ressecção cirúrgica de CCE oral e 20 secções com 5µm de espessura dos blocos contendo material de biópsia de CCE oral.

Esta etapa foi seguida pelo processo de desparafinização realizado a partir da adição de 1 mL de xilol aos cortes isolados em microtubos, homogeneização por equipamento de geração de vórtex e centrifugação a 14000 rpm por dois minutos para a sedimentação do material celular. Após o descarte do sobrenadante, esta etapa foi repetida três vezes. A retirada do xilol ocorreu com a adição de 1 mL de álcool etílico absoluto nos microtubos contendo o material, homogeneização com o uso de equipamento de geração de vórtex e centrifugação a 14000 rpm por dois minutos para a sedimentação do material celular. Após o descarte do sobrenadante, esta etapa foi repetida três vezes. O resíduo de álcool etílico foi evaporado a partir do acondicionamento dos microtubos a uma temperatura de 37°C por 10 minutos. Foi então adicionado o tampão de digestão (ATL) e a proteinase K, contidos no *kit*, e as amostras foram incubadas a 56°C em agitação constante (600rpm) por doze horas no equipamento *Thermomixer Comfort* (EPPENDORF®).

A inativação da proteinase K foi realizada pela manutenção das amostras a 90°C em agitação constante durante uma hora. As amostras foram então centrifugadas a 14000 rpm por 30 segundos e foram adicionados 200µL de tampão de ligação AL e 200 µL de álcool etílico absoluto. Após a homogeneização das soluções, este conteúdo foi então transferido para uma coluna com tubo coletor (contidos no *kit*) e centrifugado a 14000 rpm por um minuto. A solução coletada no tubo foi descartada. Foram adicionados em seguida 500 µL de tampão de lavagem a coluna e esta foi centrifugada a 14000 rpm por um minuto. A solução coletada no tubo foi descartada. Foram adicionados em seguida 500 µL de um segundo tampão de lavagem a coluna e esta foi centrifugada a 14000 rpm por um minuto. A solução coletada no tubo foi descartada. Foi realizada uma centrifugação a 14000 rpm por três minutos para a retirada de quaisquer resíduos do tampão. O tubo coletor foi

então descartado e substituído por um microtubo de capacidade de 1,5 mL. Em seguida, foram acrescentados ao centro da coluna 30 µL de tampão de eluição (contido no *kit*) e esta etapa teve duração de 5 cinco minutos a temperatura ambiente. Este material foi centrifugado a 14000 rpm por três minutos e em seguida congelado em freezer a -20°C.

## **E. QUANTIFICAÇÃO DO DNA**

Após a extração, os DNAs foram quantificados através da absorvância medida em 260 e 280 nm em espectrofotômetro (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, EUA). A razão de  $A_{260}$  e  $A_{280}$  deve ser igual ou superior a 1,75 para, então, calcular-se a concentração do DNA. (SAMBROOK J *et al.*, 2001).

## **F. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (*Polimerase Chain Reaction* - PCR)**

A técnica de PCR foi utilizada para amplificar as regiões do DNA genômico correspondentes ao gene *EGFR*. Foram amplificados por PCR os éxons 18, 19, 20 e 21 para a análise do *status* mutacional deste gene (*hotspots*). As condições específicas das reações estão ilustradas na Tabela 17, sendo que estas condições e as concentrações finais dos reagentes foram padronizadas em nosso laboratório.

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se a termocicladora Veriti da Applied Biosystems, contendo em cada minitubo: 300ng de DNA proveniente dos tumores emblocados em parafina; 2,5 µL de tampão de reação 10x; 1,5 µL de  $MgCl_2$  50mM; 1 µL de cada desoxirribonucleotídeo a 10 mM; 10 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos (senso e antissenso); 1,25U de Taq platinum; 8,3µL de trealose a 1,5M e água deionizada estéril para completar o volume final de 25 µL.

**Tabela 17:** Condições das reações de PCR para amplificação de EGFR: regiões amplificadas, oligonucleotídeos específicos, temperatura de anelamento, número de ciclos das reações e o tamanho do produto amplificado.

<b>GENE EGFR HUMANO</b>				
<b>Exon EGFR</b>	<b>5'- OLIGONUCLEOTÍDEOS- 3'</b>	<b>Temperatura de anelamento</b>	<b>Número de ciclos</b>	<b>Tamanho do Produto</b>
<b>18</b>	S : CTTGTCTCTGTGTTCTTGTCCC AS : GGCTCCCCACCAGACCAT	60°C	40	215pb
<b>19</b>	S : CGTCTTCCTTCTCTCTGTGCATAG AS : GACCCCCACACAGCAAAGC	60°C	40	153pb
<b>20</b>	S : CCCTCCCTCCAGGAAGCC AS : GCACACACCAGTTGAGCAGG	60°C	40	187pb
<b>21</b>	S : AGCAGGGTCTTCTCTGTTTCA AS : ACCTCCTTACTTTGCCTCCTT	60°C	40	188pb

Legenda: S – Senso, AS – Antissenso

## **G. VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS DE EGFR**

A eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão SB 1X foi implementada a fim de analisar os produtos da reação de PCR. Foram aplicados 2 µL de cada produto de PCR. Um microlitro de GelRed (Invitrogen, Grand Island, EUA - diluído a 1:1000) e um microlitro de tampão de carregamento foram adicionados a cada amostra. O tampão de carregamento é composto de glicerol 50 % (V/V), azul de bromofenol 0,25 % (P/V) e xileno cianol 0,25 % (P/V). A eletroforese foi realizada a 4 V/cm, por 40 minutos em cuba horizontal (Life Technologies). O DNA foi visualizado e fotodocumentado em um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um sistema de captura de imagem (AlphaMager<sup>®</sup> mini, Alpha Innotech Corp, Taiwan).

## **H. PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR**

Os produtos de PCR foram purificados com o kit *PureLink PCR Purification* de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen, EUA). A cada tubo, com 50 µL de

produto de PCR, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão de captura. Posteriormente, essa solução foi colocada em uma coluna *PureLink™ spin* com tubo coletor e centrifugada a 10.000g por um minuto. O líquido no tubo coletor foi descartado e a coluna foi lavada com 650  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem e centrifugada a 10.000g por um minuto. O líquido no tubo coletor foi descartado e nova centrifugação a 13.400 rpm foi realizada durante três minutos para remover qualquer resíduo do tampão de lavagem. O tubo coletor foi desprezado e substituído por um microtubo de 1,7 mL. Em seguida, foram adicionados ao centro da coluna 50  $\mu\text{L}$  de tampão de eluição, que ficou agindo por um minuto. Por fim, este material foi centrifugado a 13.400 rpm por dois minutos e no microtubo estava o produto de PCR purificado.

## **I. SEQÜENCIAMENTO**

As reações de seqüenciamento foram feitas utilizando-se o kit *Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems)*, de acordo com o protocolo do fabricante. Para cada reação foram utilizados 10 ng do produto de PCR purificado, 3,2 pmoles de um dos oligonucleotídeos (senso ou anti-senso), 0,5 $\mu\text{L}$  de *Big Dye 3.1*, 1,5 $\mu\text{L}$  do tampão de reação e água deionizada estéril para completar o volume final de 10  $\mu\text{L}$ . As reações foram feitas na termocicladora Veriti nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação de um minuto a 96°C; 35 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto e 15 segundos a 60°C. Os oligonucleotídeos utilizados foram os mesmos da reação de PCR. Para cada produto foram feitas 6 reações de seqüenciamento, 3 com oligonucleotídeos senso e 3 com oligonucleotídeos anti-senso. Cada reação de seqüenciamento foi precipitada com 2  $\mu\text{L}$  de EDTA a 125mM, e 30  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (MERCK). Após o selamento da placa, a mesma foi envolta em papel alumínio e as soluções foram misturadas por inversão (quatro vezes), seguindo-se incubação por 15 minutos a temperatura ambiente. Após esta etapa, cada reação foi centrifugada por 45 minutos a 4.000 rpm (4°C) e o sobrenadante foi descartado. A placa foi submetida a uma rápida centrifugação invertida a 900 rpm. O sedimento foi lavado com 35  $\mu\text{L}$  de etanol 70% por 15 minutos a 4.000 rpm (4°C). A placa foi submetida a uma outra rápida centrifugação invertida a 900 rpm, removida da centrífuga e as amostras ressuspendidas no

tampão de injeção. A análise das seqüências foi feita utilizando o programa *Mutation Surveyor DNA Variant Analysis Software* (disponível no site: <http://www.softgenetics.com/mutationSurveyor.html>).

## **J. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os testes estatísticos foram feitos utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, CA, USA). Para a análise de associação entre variáveis categóricas foram utilizados os testes Quiquadrado e exato de Fischer. Para a análise de sobrevida dos pacientes portadores de tumores orais de apenas um sítio anatômico foram utilizados a curva de sobrevida de Kaplan-Meier e o teste de log rank. Todas as decisões estatísticas foram tomadas ao nível de significância de 0,05 (cinco por cento).

## **6.2 – RESULTADOS**

### **6.2.1 PERFIL CLINICOPATOLÓGICO DOS PACIENTES PORTADORES DE TUMORES DE APENAS UM SÍTIO ANATÔMICO DA CAVIDADE ORAL NO PERÍODO 2005/2006**

No biênio em questão foram diagnosticados na DIPAT 824 pacientes com carcinomas de células escamosas de cavidade oral. Um total de 161 pacientes enquadraram-se nos critérios de inclusão do estudo. Desses 161 pacientes, seis não eram de nacionalidade brasileira e os 156 pacientes restantes eram prioritariamente nascidos na região Sudeste (n=122 pacientes). A ampla maioria desses pacientes residia no estado do Rio de Janeiro (n = 156 pacientes). Foi observado um predomínio de pacientes do sexo masculino, e com histórico de tabagismo e etilismo, conforme esperado (Tabela 18). Para as análises de sobrevida, 123 pacientes enquadraram-se nos critérios de inclusão. Não houve alteração significativa na amostra após a aplicação dos critérios de inclusão para a sobrevida. Os 38 pacientes excluídos receberam tratamento não curativo ou evadiram-se do tratamento antes do seu término (14 pacientes), apresentaram acompanhamento inferior a 12 meses (12 pacientes), apresentaram lesões sincrônicas ao diagnóstico (6 pacientes) ou apresentaram margens cirúrgicas comprometidas na histopatologia (6 pacientes). Para as análises estatísticas os tumores de trigonoretromolar, mucosa jugal e gengiva inferior foram agrupados em uma única categoria, denominada “outros sítios”.

**Tabela 18:** Características clinicopatológicas dos pacientes portadores de lesões de apenas um sítio em cavidade oral, tratados no INCA no biênio 2005/06 (n=161) antes e após a aplicação dos critérios de inclusão para sobrevida (n=123), evidenciando que não houve alteração significativa nas proporções de distribuição da amostra entre as variadas categorias

Variável	Categoria	n = 161		n = 123	
		n° de casos	% dos casos	n° de casos	% dos casos
Gênero	Masculino	110	68,3	82	66,7
	Feminino	51	31,7	41	33,3
Idade	18-40	16	10,0	13	10,6
	41-60	70	43,4	56	45,5
	61-99	75	46,6	54	43,9
Etilismo	Sim	113	70,2	84	68,3
	Não	45	27,9	38	30,9
	Não Informado	3	1,9	1	0,8
Tabagismo	Sim	127	78,9	96	78,0
	Não	33	20,5	26	21,2
	Não Informado	1	0,6	1	0,8
Estadiamento clínico	I	47	29,2	37	30,1
	II	61	37,9	49	39,8
	III	25	15,5	20	16,3
	IV	14	8,7	8	6,5
	Não Informado	14	8,7	9	7,3
Tratamento	Cirurgia	85	52,8	67	54,5
	Cirurgia + RXT	60	37,3	50	40,7
	Cirurgia + RXT + QT	1	0,6	1	0,8
	RXT	7	4,3	3	2,4
	RXT + QT	1	0,6	1	0,8
	RXT + Cirurgia	1	0,6	1	0,8
	Suporte	1	0,6	0	0
	Nenhum	5	3,2	0	0
Estadiamento patológico	I	56	34,8	46	37,4
	II	35	21,7	26	21,1
	III	20	12,4	16	13,0
	IV	34	21,1	29	23,6
	Não Disponível	1	0,6	1	0,8
	Não Pertinente	15	9,4	5	4,1
Região anatômica	Língua	83	51,5	63	51,2
	Lábio Inferior	39	24,2	29	23,6
	Assoalho	26	16,1	20	16,3
	Gengiva Inferior	6	3,7	6	4,9
	Mucosa Jugal	4	2,5	3	2,4
	Trígono retromolar	3	2,0	2	1,6
	Gengiva Superior	0	0	0	0
	Palato Duro	0	0	0	0
	Lábio Superior	0	0	0	0

Seis pacientes apresentaram tumores sincrônicos, (Tabela 19) e 14 pacientes (8,7%) apresentaram segundos tumores primários (Tabela 20).

**Tabela 19:** Descrição dos pacientes portadores de tumores sincrônicos

Sítio Oral	Tumor Sincrônico
LÍNGUA	PALATO MOLE
TRM	ASSOALHO
ASSOALHO	ASSOALHO
ASSOALHO	OROFARINGE
LÍNGUA	PALATO MOLE
LÍNGUA	PALATO MOLE

**Tabela 20:** Descrição dos pacientes portadores de segundos tumores primários

Sítio Oral	Segundo Tumor Primário
LÍNGUA	PRÓSTATA
ASSOALHO	LOJA AMIGDALIANA
LÍNGUA	REBORDO GENGIVAL INFERIOR
LÍNGUA	LOJA AMIGDALIANA ESQ
ASSOALHO	SEIO PIRIFORME
ASSOALHO	VALÉCULA
ASSOALHO	LARINGE
TRM	ESÔFAGO E PALATO MOLE
ASSOALHO	PULMÃO
LÍNGUA	SEIO PIRIFORME
MUCOSA JUGAL	COLO DE ÚTERO
LÍNGUA	LARINGE
LÍNGUA	PALATO MOLE
ASSOALHO	FÍGADO

Houve associação significativa entre o sexo do paciente e o sítio anatômico do tumor (Teste Quiquadrado,  $p=0,01$ ). Os tumores de assoalho ocorreram preferencialmente em pacientes do sexo masculino (Teste exato de Fisher,  $p=0,0028$ ) enquanto que os tumores de língua estiveram significativamente associados ao sexo feminino (Teste exato de Fisher,  $p=0,0278$ ). Excluindo-se os tumores de lábio inferior da análise essas associações mantiveram-se significativas.

**Tabela 21:** Distribuição por sexo dos pacientes com tumores de sítio único em cavidade oral

	SEXO	
	M	F
ASSOALHO	24 (92%)	2 (8%)
LABIO INF	29 (74%)	10 (26%)
GENG INF	4 (67%)	2 (33%)
LINGUA	50 (60%)	33 (40%)
M JUGAL	0	4 (100%)
TRM	3 (100%)	0

Houve associação significativa entre a idade dos pacientes e o sítio anatômico do tumor (Teste Quiquadrado,  $p=0,0007$ ). Os tumores de assoalho

ocorreram preferencialmente em pacientes adultos (Teste Qui-quadrado,  $p=0,0001$ ). Os tumores de lábio inferior também exibiram uma distribuição pelas faixas etárias significativamente diferente dos demais sítios (Teste Quiquadrado,  $p=0,0169$ ). Excluindo-se os tumores de lábio inferior da análise, os tumores de assoalho mantiveram-se estatisticamente associados aos pacientes adultos (Teste Quiquadrado,  $p=0,0186$ ).

**Tabela 22:** Distribuição por idade dos pacientes com tumores de sítio único em cavidade oral

	IDADE		
	18-40	41-60	61-99
ASSOALHO	0	21 (81%)	5 (19%)
LABIO INF	7 (18%)	10 (26%)	22 (56%)
GENG INF	0	2 (33%)	4 (67%)
LINGUA	9 (10%)	33 (40%)	41 (50%)
M JUGAL	0	1 (25%)	3 (75%)
TRM	0	3 (100%)	0

Houve associação significativa entre o tabagismo e o sítio anatômico do tumor (Teste Quiquadrado,  $p=0,0014$ ). Os tumores de assoalho ocorreram apenas em pacientes com histórico de tabagismo (Teste exato de Fisher,  $p=0,0013$ ). Os tumores de língua não foram associados ao tabagismo (Teste exato de Fisher,  $p=1$ ). Os tumores de “outros sítios” foram associados com um histórico negativo de tabagismo (Teste exato de Fisher,  $p=0,0103$ ). Excluindo-se os tumores de lábio inferior da análise as associações mantiveram-se significativas e os tumores de língua permaneceram sem associação com o tabagismo.

**Tabela 23:** Distribuição dos pacientes com tumores de sítio único em cavidade oral de acordo com o histórico de tabagismo

	HISTÓRICO DE TABAGISMO	
	PRESENTE	AUSENTE
ASSOALHO	26 (100%)	0
LABIO INF	28 (72%)	11 (28%)
GENG INF	5 (83%)	1 (17%)
LINGUA	64 (78%)	18 (22%)
M JUGAL	1 (25%)	3 (75%)
TRM	0	3 (100%)

Houve associação significativa entre o etilismo e o sítio anatômico do tumor (Teste Quiquadrado,  $p < 0,0001$ ). Os tumores de assoalho ocorreram apenas em pacientes com histórico de etilismo (Teste exato de Fisher,  $p < 0,0001$ ). Os tumores de lábio inferior foram associados com um histórico negativo de etilismo (Teste exato de Fisher,  $p = 0,0066$ ). Uma tendência foi observada na associação entre tumores de “outros sítios” orais e histórico negativo de etilismo (Teste exato de Fisher,  $p = 0,0513$ ). Os tumores de língua não foram associados ao etilismo. Removendo-se os tumores de lábio da análise os tumores de assoalho mantiveram sua associação com histórico de etilismo (Teste exato de Fisher,  $p = 0,0009$ ) e os tumores de outros sítios orais alcançaram associação significativa com o histórico negativo de etilismo (Teste exato de Fisher,  $p = 0,0092$ ). Os tumores de língua permaneceram não associados ao etilismo.

**Tabela 24:** Distribuição dos pacientes com tumores de sítio único em cavidade oral de acordo com o histórico de etilismo

	HISTÓRICO DE ETILISMO	
	PRESENTE	AUSENTE
ASSOALHO	26 (100%)	0
LABIO INF	20 (53%)	18 (48%)
GENG INF	4 (67%)	2 (33%)
LINGUA	61 (75%)	20 (25%)
M JUGAL	0	4 (100%)
TRM	2 (67%)	1 (33%)

A Tabela 25 descreve a distribuição desses 161 casos por sítio anatômico, de acordo com estadiamento clínico e o estadiamento patológico (Anexo 4).

**Tabela 25:** Estadiamento clínico e patológico da amostra de pacientes com tumores de sítio único em cavidade oral

	cTNM			pTNM		
	I+II	III+IV	N INF	I+II	III+IV	N INF
ASSOALHO	18 (70%)	8 (30%)	0	13 (50%)	11 (42%)	2 (8%)
LABIO INF	22 (56%)	4 (10%)	13 (34%)	35 (90%)	4 (10%)	0
GENG INF	3 (50%)	3 (50%)	0	2 (33%)	4 (67%)	0
LINGUA	61 (74%)	21 (25%)	1 (1%)	36 (43%)	34 (41%)	13 (16%)
M JUGAL	2 (50%)	2 (50%)	0	4 (100%)	0	0
TRM	2 (67%)	1 (33%)	0	1 (33%)	1 (33%)	1 (33%)

Não houve associação entre sítio anatômico e estadiamento clínico. Contudo foi observada associação entre estadiamento patológico e sítio anatômico, onde os tumores de lábio inferior foram significativamente associados a um estadiamento patológico I e II (Teste exato de Fisher,  $p < 0,0001$ ). Os tumores de língua foram significativamente associados a um estadiamento patológico mais avançado (Teste exato de Fisher,  $p = 0,0096$ ). Removendo-se os tumores de lábio da análise não se observou mais a associação entre tumores de língua e estadiamento patológico mais avançado.

Não houve associação entre sítio anatômico, cN e o cT do TNM clínico (Teste Quiquadrado,  $p > 0,05$ ). A remoção dos tumores de lábio inferior da análise não alterou esse panorama.

Também não houve associação entre sítio anatômico e o pN do TNM patológico. Contudo foi observada associação entre sítio anatômico e o pT do TNM patológico (Teste Quiquadrado,  $p = 0,0275$ ). Os tumores de lábio inferior foram associados a um pT menor. Removendo-se os tumores de lábio da análise não se observou mais a associação entre os tumores de sítio único e o pT do TNM patológico.

## **6.2.2 PERFIL MUTACIONAL DE EGFR NOS TUMORES DE APENAS UM SÍTIO EM CAVIDADE ORAL**

Até o presente momento foram analisadas 61 amostras. Em um dos casos a quantidade e a qualidade do DNA extraído do material embocado em parafina inviabilizou a análise molecular. Ao todo, 11 mutações em EGFR foram identificadas em 10 casos.

**Tabela 26:** Casos analisados para mutação em EGFR até o momento

	TOTAL	CASOS ANALISADOS	
		PARCIAL	MUTAÇÕES ENCONTRADAS
ASSOALHO	26	12	1
LABIO INF	39	17	4
GENG INF	6	4	0
LINGUA	83	27	6
M JUGAL	4	1	0
TRM	3	0	0

Todas as amostras foram selvagens para o éxon 19 de EGFR. Com relação ao éxon 20, 54 das 60 amostras foram polimórficas para o códon 787 (CAG – CAA). As mutações encontradas estão descritas na Tabela 27. A mutação identificada no éxon 18, na posição +19 (íntron) foi a alteração mais comumente encontrada (36%). Dentre as mutações em éxons, três ocorreram no éxon 18 e três ocorreram no éxon 21, sendo que destas, três levam a mudanças na estrutura primária da proteína. Dos sítios analisados, língua (22%) e lábio inferior (18%) possuem a maior frequência de mutações, enquanto somente 8% das amostras de assoalho apresentaram estas alterações.

**Tabela 27:** Mutações em EGFR encontradas nos casos analisados

SÍTIO	MUTAÇÕES EM EGFR		
	ÉXON 18	ÉXON 21	ALTERAÇÃO
ASSOALHO	Íntron -3 (C/T)	Selvagem	?
LABIO INF	Códon 706 (ATC/GTT)	Selvagem	Isoleucina - Valina
LABIO INF	Códon 721 (GGT/GAT)	Provável inserção	Glicina – Ácido aspártico
LABIO INF	Íntron +19 (G/A)	Selvagem	?
LINGUA	Íntron +19 (G/A)	Selvagem	?
LINGUA	Códon 703 (CTC/TTC)	Selvagem	Leucina - Fenilalanina
LINGUA	Íntron +19 (G/A)	Selvagem	?
LINGUA	Íntron +19 (G/A)	Selvagem	?
LINGUA	Selvagem	Códon 836 CGC - CGT	Arginina – Arginina
LINGUA	Selvagem	Códon 829 GAG -GAA	Ácido glutâmico - Ácido glutâmico

### 6.2.3 SOBREVIDA DOS PACIENTES PORTADORES DE TUMORES DE APENAS UM SÍTIO EM CAVIDADE ORAL

A Figura 13 demonstra uma diferença estatisticamente significativa na sobrevida global dos pacientes portadores de tumores de apenas um sítio anatômico, com os pacientes com tumores de lábio inferior exibindo uma melhor sobrevida global ( $p = 0,0097$ , Teste de log-rank). A mediana de sobrevida (tempo no qual metade dos pacientes evoluiu a óbito) foi de 58,31 meses para os pacientes com tumores de assoalho, 58,78 meses para os pacientes com tumores de língua e 64,2 meses para os pacientes com tumores de outros sítios anatômicos (que foram agrupados para as análises de sobrevida). Não foi possível calcular a mediana de sobrevida para os pacientes com tumores de lábio uma vez que esse grupo não chegou a 50% de evolução para o desfecho óbito.

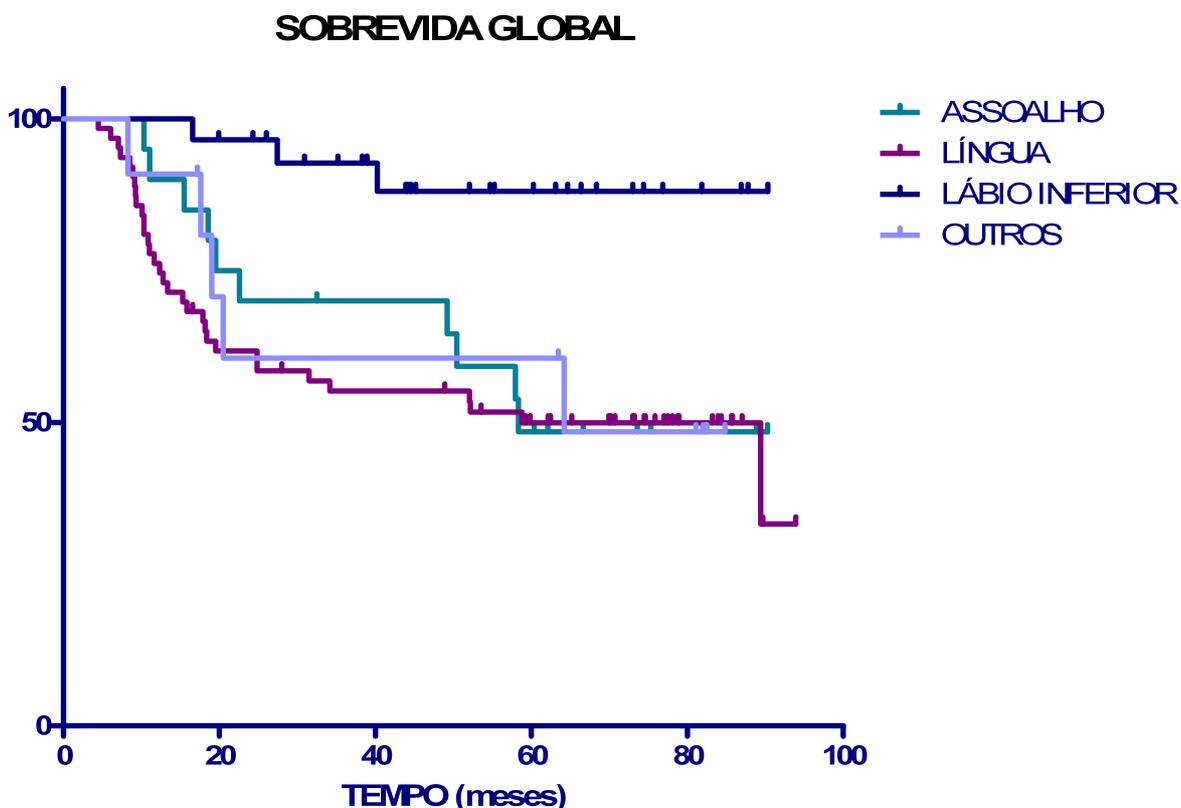
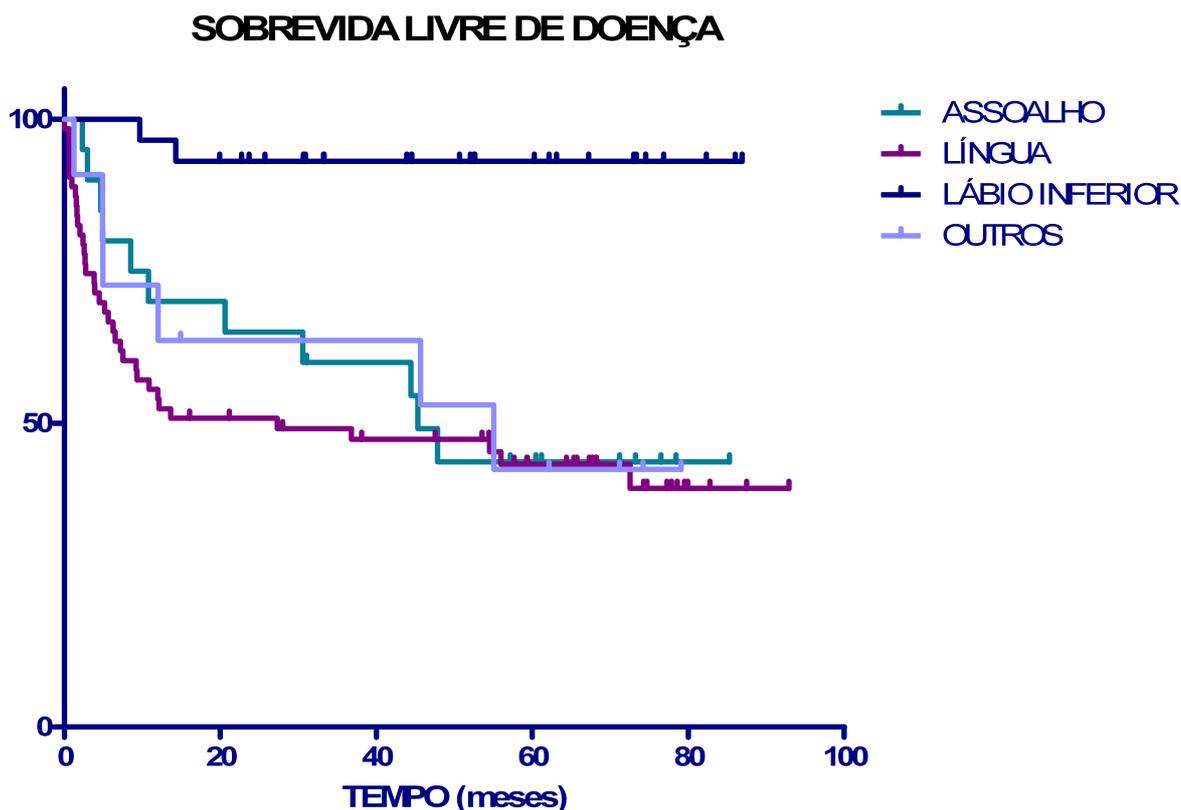


Figura 13: Sobrevida global dos pacientes portadores de tumores de apenas um sítio anatômico oral

A Figura 14 demonstra diferença estatisticamente significativa na sobrevida livre de doença dos pacientes portadores de tumores de apenas um sítio anatômico. Os pacientes com tumores de lábio inferior exibiram uma melhor sobrevida livre de doença ( $p = 0,0006$ ; Teste de log-rank). A mediana de sobrevida livre de doença (tempo no qual metade dos pacientes evoluiu com retorno do câncer) foi de 45,34 meses para os pacientes com tumores de assoalho, 27,3 meses para os pacientes com tumores de língua e 55,06 meses para os pacientes com tumores de outros sítios anatômicos. Isso demonstra que os pacientes com tumores de língua apresentam recidivas mais precocemente. Mais uma vez não foi possível calcular a mediana de sobrevida para os pacientes com tumores de lábio uma vez que esse grupo não chegou a 50% de evolução para o desfecho recidiva.



**Figura 14:** Sobrevida livre de doença dos pacientes portadores de tumores de apenas um sítio anatômico oral

---

Os tumores de assoalho foram significativamente associados ao surgimento de um STP ( $p=0,0168$ , Teste exato de Fischer). Os tumores de lábio exibiram uma tendência a não estarem associados ao surgimento de um segundo tumor primário ( $p= 0,0652$ , Teste exato de Fischer). Removendo os tumores de lábio da análise, os tumores de assoalho passaram a exibir uma tendência a estarem associados ao surgimento de um segundo tumor primário ( $p=0,0521$ , Teste exato de Fischer).

## **6.3 – PERSPECTIVAS**

Mais três meses serão necessários para a análise das 100 amostras restantes, a fim de concluirmos a análise do perfil mutacional de EGFR nos tumores de apenas um sítio oral.

## 7 – DISCUSSÃO GERAL

A cavidade oral situa-se na porção inicial do trato aerodigestivo superior, composto também pela orofaringe, hipofaringe, laringe e esôfago (SZYMANSKA *et al*, 2010). Essas diferentes regiões do trato aerodigestivo superior compartilham determinadas características. São revestidas por um epitélio escamoso estratificado e, quando acometidas por tumores malignos, estes são, em sua grande maioria, carcinomas de células escamosas (CCE). Segundo dados do GLOBOCAN, mais de um milhão de novos casos de câncer foram diagnosticados no trato aerodigestivo superior no ano de 2008. Além disso, essas regiões anatômicas compartilham também os mesmos fatores de risco principais, a saber: tabagismo e etilismo.

Tais semelhanças fizeram com que grande número de pesquisadores considerasse os carcinomas de células escamosas originários dessas regiões como sendo uma entidade única, denominada câncer de cabeça e pescoço ou câncer do trato aerodigestivo superior. Assim, para aumentar o espaço amostral, CCEs de diferentes regiões anatômicas são incluídos no mesmo estudo em uma abordagem extremamente comum na literatura.

Contudo, a partir dos trabalhos de GILLISON M *et al*. (2000), evidências crescentes tem demonstrado que tumores de diferentes regiões anatômicas do trato aerodigestivo superior podem apresentar etiologia e prognósticos distintos. Esse trabalho demonstrou claramente a presença da infecção pelo HPV em uma proporção considerável dos CCE de orofaringe nos EUA. Tais pacientes são tipicamente mais jovens, não possuem um histórico de tabagismo ou etilismo e

apresentam um nível socioeconômico mais alto. Essa associação também estava relacionada ao prognóstico desses pacientes, de modo que tumores HPV positivos de orofaringe apresentaram melhor sobrevida que os tumores HPV negativos, normalmente relacionados ao tabagismo e etilismo. Molecularmente os tumores HPV positivos apresentam tipicamente *TP53* selvagem e superexpressão de p16.

Enquanto a infecção pelo HPV tem papel importante em um subgrupo de pacientes com CCE de orofaringe, nosso grupo recentemente demonstrou que o mesmo não ocorre no esôfago, porção final do trato aerodigestivo superior. O trabalho de HERBSTER S *et al.* (2012) demonstra que dentre 264 CCE de esôfago analisados por PCR *nested* e hibridização *in situ*, apenas 34 (13%) foram positivos para HPV. Nesses casos foi observado sempre um baixo número de células tumorais positivas (menos de 10%), com marcação fraca nuclear; sem associação com a expressão de p16, com a ausência de mutação em *TP53* ou com o prognóstico. Tais fatos indicam que, ao contrário do observado em orofaringe, o papel do HPV na carcinogênese esofágica é questionável.

Mais evidências foram obtidas a partir do trabalho de ZIGON G *et al.* (2011), que analisou 51912 pacientes portadores de tumores dos variados sítios de cabeça e pescoço provenientes de 45 registros de câncer na Europa (cobrindo 20 países) durante os anos de 1995-1999. Esse trabalho demonstra que a sobrevida dos pacientes varia de forma marcante de acordo com o sítio anatômico. Os tumores de hipofaringe, base de língua, parede lateral e parede posterior de orofaringe além dos supraglóticos e subglóticos apresentaram pior sobrevida global. A distribuição por subsítios anatômicos foi capaz de explicar uma parte considerável das diferenças observadas na sobrevida.

Com relação a cavidade oral, alguns trabalhos indicam que esse comportamento também está presente. Já foi demonstrado que a incidência de metástase para linfonodo é maior nos pacientes com CCE de língua, quando comparado aos tumores de assoalho (DIAS F *et al.*, 2006). Outro trabalho de nosso grupo demonstrou que os tumores de língua foram significativamente mais propensos a recidivarem quando comparados com tumores de outros sítios (CAMISASCA DR *et al.*, 2011). Além disso, tumores localizados no lábio inferior

exibem os melhores prognósticos e os tumores de assoalho tem sido correlacionados com o surgimento de um STP (NEVILLE BW *et al.* , 2008).

KADEMANI, em 2007, afirmou que a maioria dos tumores está restrita a uma área que compreende apenas 10% da área de superfície da cavidade oral (concentrados em língua e assoalho de boca). Dificilmente o acaso poderia explicar uma concentração tão grande de tumores em uma área relativamente pequena do revestimento epitelial da cavidade oral.

Nós investigamos essa questão ao analisar a expressão das enzimas CYP (ativadoras de carcinógenos) na cavidade oral de pacientes sem câncer ou lesões precursoras e de modelos animais não expostos ao tabaco ou ao álcool. Somente são propensos a desenvolverem tumores causados por pré-carcinógenos tecidos que expressam enzimas que ativam esses pré-carcinógenos e os transformam em carcinógenos finais. Nosso objetivo era analisar a expressão constitutiva desses genes na cavidade oral. Os nossos resultados demonstram que os sítios que apresentam uma maior expressão de enzimas CYP são exatamente aqueles que concentram a maioria dos tumores. Em geral, nos animais de laboratório e nos humanos analisados, tanto língua quanto assoalho concentraram a maior quantidade e variedade dessas enzimas ativadoras de carcinógenos.

Para alcançarmos esse objetivo empregamos a metodologia padrão-ouro para a análise da expressão gênica, que é o RT-PCR seguido por PCRq. Além disso, adicionamos um nível suplementar de refino nas análises ao implementarmos a quantificação absoluta, possibilitando que o número de moléculas do gene de interesse presente em cada amostra pudesse ser demonstrado.

Durante esses experimentos tivemos que lidar com as limitações teóricas da reação de PCR, descritas originalmente por WITTEWER e KUSAKAWA em 2004, e fomos capazes de demonstrar experimentalmente esse limite teórico de detecção, que é de três cópias do *template* por reação de PCR. Dessa forma, pudemos depositar na literatura científica essa contribuição para o entendimento de uma técnica tão importante para as áreas de pesquisa e diagnóstico.

Esse é o primeiro trabalho a analisar de forma pormenorizada os múltiplos sítios anatômicos orais de humanos e das três espécies de animais de laboratório testadas. Outros trabalhos analisaram apenas alguns sítios de forma isolada, mais precisamente mucosa jugal e gengiva, onde a obtenção de amostras pode ser viabilizada nos pacientes submetidos a cirurgias orais menores eletivas, como cirurgias de remoção de sisos inclusos ou cirurgias periodontais.

VONDRACEK *et al.*, em 2001, avaliaram a expressão de CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C, 2D6, 2E1, 3A4/7 e 3A5 em 13 amostras de mucosa jugal de pacientes sem câncer por RT-PCR semiquantitativo. Os mesmos demonstraram a presença do RNAm de CYP1A1, 1A2, 2C, 2E1, 3A4/7 e 3A5 em todas as amostras, com CYP 2D6 sendo expresso apenas em seis amostras.

SARIKAYA *et al.*, em 2007, analisaram a expressão de CYP2B6, 2C, 2D6, 2E1, 3A3/4 e 3A5 por RT-PCR competitivo em cinco biópsias de mucosa jugal. Duas lesões pré-malignas e três espécimes de mucosa sem câncer foram obtidos de quatro pacientes, sendo observada expressão consistente de CYP 2C, 2E1 e 3A5 na mucosa jugal desses indivíduos.

Esses dois trabalhos apresentam algumas limitações, além do fato de analisarem apenas um subsítio anatômico oral. Primeiramente, não utilizaram PCR quantitativa em tempo real, o que aumenta o limiar de detecção consideravelmente, podendo esse fato explicar não ter sido observada a expressão das subfamílias 2A e 2B nesses estudos. Nós observamos uma baixa expressão de CYP2B6/7 em todos os pacientes analisados, o que apóia esse ponto de vista. Em segundo lugar os *primers* utilizados nesses trabalhos são diferentes dos que utilizamos e não há registro da eficiência dessas reações de PCR nesses artigos.

O mesmo também pode ser aplicado para outros trabalhos. LINDELL, LANG e LENNERNAS, em 2003, analisaram a expressão de CYP1A1, 1A2, 2B1, 2A3 e 2E1 no fígado de ratos Sprague-Dawley (machos e fêmeas, entre 8 e 9 semanas) por RT-PCR semi-quantitativo. Os pesquisadores relataram uma baixa expressão de CYP1A1, expressão maior de CYP2A3 e CYP2B1 e alta expressão de CYP2E1 e de CYP1A2. Contudo, ao se analisar as imagens dos géis representativos desses achados percebeu-se que essas diferem do padrão descrito, de modo que CYP2A3

e CYP1A1 parecem estar ausentes. RIBEIRO PINTO *et al.*, em 2001, analisaram a expressão de CYP2B1/2B2, 2E1 e 1A1 por Western blotting no fígado de ratos Wistar machos controle e observaram a presença de CYP2E1 e CYP2B1/2B2. Não foi observada a expressão de CYP1A1. Além disso, investigaram a expressão de CYP2A3 por RT-PCR semiquantitativo e também não observaram sua expressão no fígado. Essa “não expressão” parece estar diretamente relacionada ao limite de detecção mais alto dessas metodologias empregadas, uma vez que no nosso trabalho observamos a expressão de CYP1A1 e de CYP2A3 no fígado do rato Wistar em baixos níveis.

CHI *et al.*, em 2009, analisaram a expressão de CYP1A1 e CYP1B1 na gengiva humana. Para tal, 22 fumantes e 24 não fumantes submetidos a cirurgias periodontais foram os doadores de amostras de tecido. A metodologia empregada foi a PCRq com quantificação relativa. Foi observada uma expressão muito baixa de CYP1A1 e níveis mais altos de expressão de CYP1B1 na gengiva de não fumantes. Houve um aumento bastante significativo na expressão de CYP1A1 e CYP1B1 nos pacientes fumantes e uma considerável variabilidade interindividual na expressão de CYP1A1 e CYP1B1, tanto em tabagistas como em não tabagistas. Nossos resultados estão de acordo com esses achados, porém esses autores não fizeram distinção entre gengiva superior e a gengiva inferior, que se apresenta mais frequentemente acometida por tumores.

De forma geral, o que podemos concluir nesse trabalho foi que houve expressão constitutiva de CYP2E1 por toda cavidade oral dos humanos testados, sendo esse o gene CYP mais expresso. Os locais de maior expressão foram exatamente língua e assoalho, em todos os voluntários. A expressão de CYP2A6/7 também foi observada em todos os humanos mas em quantidades inferiores a expressão de CYP2E1. Outro fato a ser ressaltado foi a variabilidade interindividual na expressão de CYPs. O humano 1 (que nunca fumou e nem consome bebidas alcoólicas) teve expressão mais alta de CYP2A6/7 do que todos os outros humanos. Além disso, foi o único indivíduo a expressar CYP1A2 em nível passível de quantificação. Essa expressão discrepante na gengiva superior é algo que pode ajudar a entender o porquê de certas pessoas desenvolverem tumores em algumas regiões e outras desenvolverem em sítios diferentes. Vale ressaltar que esse voluntário possui um caso de câncer oral em seus antecedentes familiares.

Com relação a expressão de CYP1A1 observamos que a mesma se situou no limite de detecção na cavidade oral de voluntários não tabagistas (exceção feita ao humano 2). Apenas no humano 5, tabagista, pudemos observar expressão consistente de CYP1A1, mais uma vez com níveis mais altos em língua e assoalho. Tal fato era esperado, uma vez que CYP1A1 é sabidamente induzido pelos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes na fumaça do cigarro.

Analisando a expressão de CYP na cavidade oral dos animais observamos que o rato apresenta um perfil de expressão diferente dos demais, com expressão maior em mucosa jugal, lábio superior e lábio inferior. YANG, MEDLING e RANER, em 2003, analisaram a expressão de CYP1A1, 1A2, 1B1, 2E1, 3A1 e 3A2 na língua de ratos por RT-PCR semiquantitativo e atividade enzimática, utilizando a expressão em fígado como controle positivo. Os autores não observaram a presença do RNAm desses genes na língua do rato, porém observaram níveis muito baixos de hidroxilação da cafeína (marcador da atividade de CYP1A2 e CYP3A) e oxidação de 4-nitrofenol (marcador da atividade de CYP2E1). Uma das explicações possíveis apresentadas pelos autores seria a de que seus *primers* teriam uma menor eficiência, aumentando portanto o limiar de detecção. Nossos resultados mostram uma expressão baixa de CYP1A1 na língua do rato, porém acima do limite de detecção, e expressões maiores de CYP1A2 e CYP2E1. Os autores não citam a linhagem de rato que utilizaram, além de terem usado a densitometria de bandas em gel de acrilamida para quantificação dos resultados do RT-PCR. Tais fatos podem explicar a não identificação desses genes na língua do rato por esses pesquisadores.

Esse ponto de vista é compartilhado por TAKIGUCHI *et al.* (2010), que analisaram a expressão de CYP1A1 na língua de ratos Wistar machos, de 8 semanas, por PCRq usando o sistema TaqMan e quantificação relativa. Uma expressão baixa mas consistente de CYP1A1 foi observada em língua. No fígado CYP1A1 também foi expresso. Tais achados foram confirmados por Western blotting (que revelou também a presença de CYP1A2 no fígado e na língua do rato Wistar) e por atividade enzimática. A imuno-histoquímica para CYP1A1 revelou que a sua expressão em língua ocorre no epitélio lingual, aponeurose lingual e células perivasculares. Nossos achados estão de acordo com esse trabalho.

NAGINI *et al*, em 2009, analisaram a expressão de CYP1A1 e 1B1 por Western Blotting na mucosa jugal de pacientes sem câncer (submetidos a excisão de terceiros molares inclusos) e a compararam com a expressão na mucosa jugal do Hamster sírio (machos). Ficou demonstrada a presença dessas duas isoformas, tanto na mucosa jugal dos humanos quanto na do hamster. Nossos resultados demonstraram que CYP1A1 foi expresso no limiar de detecção na mucosa jugal do Hamster sírio e de alguns humanos testados.

Uma variabilidade na expressão de CYP relacionada a linhagem de camundongo utilizada também ficou nítida no presente trabalho. Entre os camundongos observamos que o BALB/c teve a mais alta expressão de CYPs em cavidade oral, seguido pelo SV129 e pelo C57BL/6. Diferenças entre as linhagens de camundongo com relação aos padrões de expressão de CYP estão bem documentadas (HRYCAY & BANDIERA, 2009).

Contudo, observamos que a qualidade do RNA extraído dos sítios orais do C57BL/6 foi inferior a dos demais, o que certamente influenciou no resultado. Mesmo assim, como a qualidade do RNA foi similar entre os sítios desse animal comparações ainda podem ser feitas e, língua e assoalho mantiveram-se como os sítios com maior expressão de enzimas CYP. Os experimentos no camundongo C57BL/6 deverão ser repetidos para a publicação final do segundo capítulo.

Ainda que poucos trabalhos tenham analisado a expressão de enzimas CYP na cavidade oral de animais de laboratório, o mesmo não ocorre para a expressão de enzimas CYP no fígado. CHOUDHARY *et al.*, em 2003, demonstraram a expressão de CYP1a1, 1a2 e 2b10 no fígado de camundongos BALB/c machos (8 a 12 semanas) por RT-PCR semiquantitativo. Esse mesmo grupo analisou em 2005 a expressão de CYP1a1, 1a2 e 2e1 no fígado de camundongos BALB/c machos (8 a 12 semanas) e em humanos por RT-PCR semiquantitativo. Essas três isoformas foram expressas tanto no fígado humano quanto no do BALB/c. Nossos resultados estão de acordo com esses achados. RENAUD *et al.*, em 2011, analisaram a expressão de 78 CYPs no fígado de camundongos C57BL/6 machos e de 8 semanas por RT-PCR, PCRq (quantificação relativa) e Western blotting. Os autores relataram expressão de CYP1a1 em baixos níveis e de CYP1a2, 2a5, 2b9, 2b10 e 2e1, exatamente como nós também demonstramos. O fato do padrão de expressão

das enzimas CYP no fígado observado na presente tese de doutorado reproduzir os achados da literatura é mais um indício de que o padrão de expressão observado na cavidade oral é confiável.

Com relação a aplicação dessas informações no desenvolvimento de modelos de carcinogênese oral, o que os dados sugerem é que nenhum animal de laboratório expressa exatamente o perfil de enzimas CYP observado em humanos, apesar dos modelos de carcinogênese oral mais empregados serem os que utilizam a mucosa jugal do Hamster e a língua do rato (VAIRAKTARIS *et al.*, 2008). A expressão constitutiva em níveis mais altos de CYP2E1 e CYP2A6/7 na cavidade oral humana garante a capacidade de ativação metabólica eficiente de várias nitrosaminas (como as específicas do tabaco NNK e NNN) e do etanol a seu carcinógeno final, o acetaldeído, nesses subsítios anatômicos. O mais plausível é tentar selecionar o animal de acordo com a maior similaridade possível com o perfil observado naquele sítio em humanos não expostos ao tabaco e ao etanol. Assim os modelos de carcinogênese seriam sítio-específicos. Trabalhos de carcinogênese em língua e assoalho poderiam se valer do Hamster sírio, pela baixa expressão da família CYP1A nessas regiões anatômicas. Apesar de nenhum representante da família CYP2B ter sido descrito até o presente momento nesse animal tal fato é amenizado pela baixa expressão da família CYP2B nos humanos.

Face ao exposto pudemos concluir que, nos humanos, a língua e o assoalho apresentam uma maior expressão de enzimas CYP. Além disso, buscamos evidências de possíveis características sítio-específicas não apenas nesses humanos sem câncer ou lesões precursoras, mas também em amostras de tumores humanos. Em nossa opinião essa é a primeira vez na literatura que é utilizado como critério de seleção para a inclusão de pacientes em um estudo a presença de tumores de apenas um sítio anatômico oral. O fato dos sítios orais serem muito próximos e da maioria dos pacientes se apresentar com doença avançada ao diagnóstico, com o comprometimento de múltiplos sítios, dificulta a identificação exata do sítio de origem da lesão. Essas são as razões principais para que dos 824 pacientes revistos no biênio 2005/2006 apenas 161 terem sido incluídos no estudo.

Com a aplicação desse critério de inclusão várias associações puderam ser identificadas, uma vez que o viés de confundimento causado pela variável sítio

anatômico pôde ser minimizado. Os tumores do assoalho foram fortemente associados ao tabagismo e etilismo (100% dos casos), o que faz sentido na medida em que o assoalho apresenta a maior expressão de CYPs na cavidade oral. Esses tumores também foram associados ao surgimento de segundos tumores primários, o que corrobora a associação desses casos com a exposição aos carcinógenos ambientais pela formação de um campo de cancerização, algo já descrito na literatura (NEVILLE BW *et al.*, 2008). Houve também associação com pacientes do sexo masculino (92% dos casos).

Já os tumores de língua foram associados ao sexo feminino. Das 51 mulheres que apresentaram tumores em apenas um sítio anatômico oral, 33 delas (65%) tiveram a língua como sítio de acometimento. Se considerarmos que outras 10 mulheres tiveram tumores de lábio inferior (e que esses tumores tem seu processo de carcinogênese dirigido principalmente pela exposição a radiação ultravioleta) podemos concluir que no interior da cavidade oral o processo de carcinogênese em mulheres ocorre preferencialmente na língua (33 *versus* 8 casos). Apesar das associações com tabagismo e etilismo não terem alcançado significância estatística, 78% dos pacientes com tumores de língua tinham histórico de tabagismo e 75% deles tinham histórico de etilismo. Isso nos leva a pensar que parte desses tumores sejam direcionados pelo processo de carcinogênese mediado pela exposição ao tabaco e álcool e outra parte, principalmente em mulheres, possa ser ocasionada por outra via, que talvez envolva questões hormonais.

Os tumores de “outros sítios” orais foram significativamente associados a históricos negativos de tabagismo e etilismo, o que indica que eles seguem um processo de carcinogênese diverso do mediado pela exposição ao tabaco e álcool. Puderam ser observadas algumas diferenças entre os sítios que foram agrupados nessa categoria (TRM, mucosa jugal e gengiva inferior) mas devido ao pequeno número de casos de tumores dessas localizadas essas diferenças não puderam ser melhor exploradas. Provavelmente com a inclusão de mais pacientes ao se aumentar o período de inclusão de casos (de dois para cinco anos, por exemplo) novas diferenças serão identificadas e esses sítios analisados individualmente.

Os tumores de lábio inferior representam uma outra entidade, derivada principalmente da exposição a radiação UV, apresentando associação negativa com

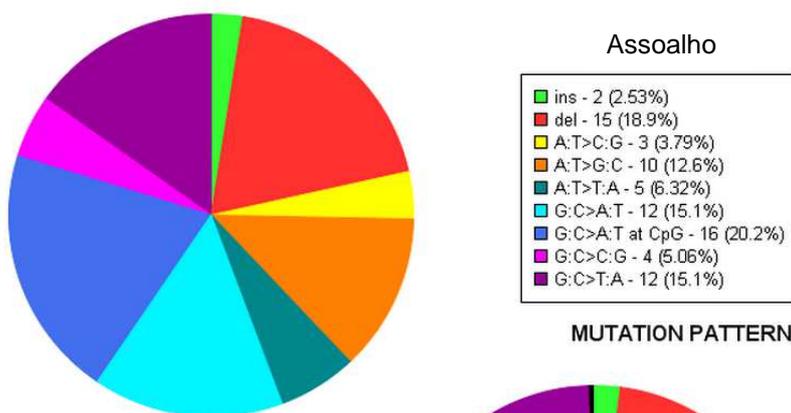
o etilismo, tumores de menor tamanho e estadiamento patológico mais baixo. Além disso, apresentaram uma sobrevida global e livre de doença significativamente melhor do que a dos tumores intraorais. Nossos achados corroboram o perfil já descrito na literatura para os CCE de lábio inferior.

Deve ser salientado o critério adotado no presente estudo para classificar os pacientes como tabagistas ou etilistas. Em muitos estudos são criadas categorias de acordo com o consumo de tabaco, normalmente medido pela unidade maços/ano. Nós agrupamos todos os pacientes que fazem ou fizeram uso de tabaco em suas variadas formas em uma única categoria (tabagistas) e os pacientes que nunca fizeram uso do tabaco na categoria de não tabagistas. Um critério semelhante foi utilizado para o etilismo, agrupando usuários e ex-usuários de quaisquer bebidas contendo etanol, mesmo que socialmente, na categoria etilistas. Essa atitude possibilita a remoção dos vieses relacionados a dose, difíceis de serem padronizados em estudos retrospectivos, sendo empregada também por GAMLBY, PATEL e SHAH (2012).

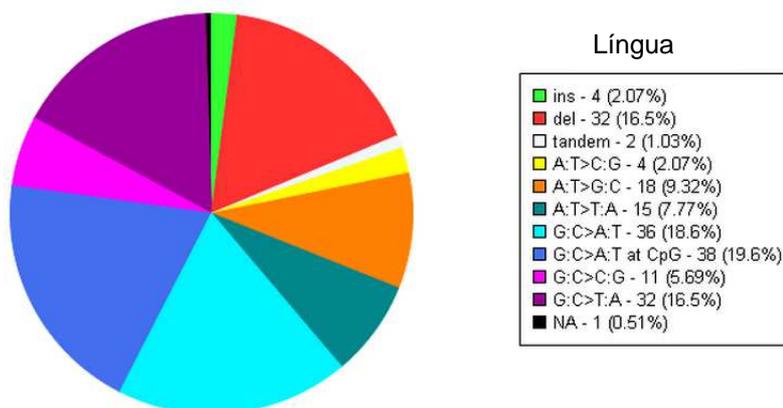
Para fins de comparação, a Figura 15 foi construída a partir do banco de dados de mutações em *TP53* do IARC e ilustra as mutações em *TP53* a partir de tumores de acordo com o seu epicentro. Isso não significa que são tumores de apenas um sítio anatômico apenas indicam o presumido sítio de origem da lesão.

Esses gráficos de setores mostram que os padrões de mutação observados em língua e assoalho são bastante similares e que os tumores de lábio apresentam um perfil mutacional diferente do observado nos sítios intraorais. Já os tumores de gengiva tem um perfil com maior tendência a se parecer com língua e assoalho porém observa-se maior frequência de mutações em ilhotas CpG.

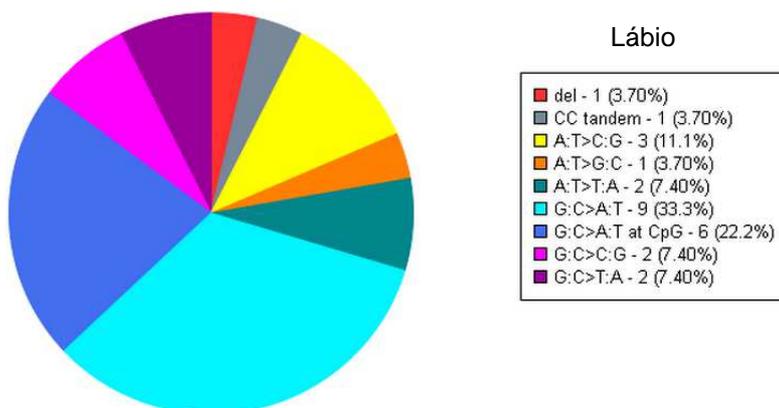
MUTATION PATTERN / 79 mutations



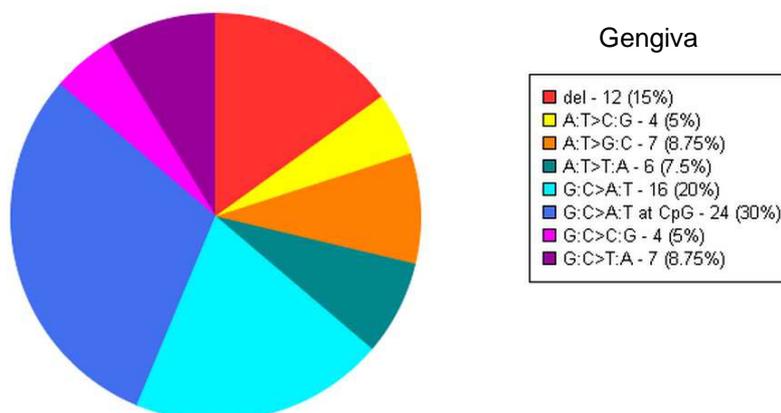
MUTATION PATTERN / 193 mutations



MUTATION PATTERN / 27 mutations



MUTATION PATTERN / 80 mutations



(C) IARC TP53 Database, R15 release, November 2010

Figura 15: Perfil mutacional de TP53 entre tumores de acordo com o epicentro da lesão

As mutações em *TP53* associadas ao tabagismo normalmente são transversões G>T e as mais associadas a nitrosaminas são transições G>A e C>T. Já aquelas associadas ao etilismo são normalmente transições G>A enquanto as associadas a radiação UVB são transições C>T, normalmente em ilhotas CpG (PUTZ *et al*, 2002, BUNZ F, 2008).

O fato do assoalho da boca e da língua apresentarem perfis mutacionais de *TP53* muito parecidos sugere que pode haver um grande número de casos que foram classificados como de língua quando na verdade surgiram no assoalho (e vice-versa) ou que realmente esses casos são originários da exposição aos carcinógenos presentes no tabaco e no álcool, principalmente. Informações sobre o gênero desses pacientes não estão disponíveis no site do IARC. A análise do perfil mutacional de *TP53* dos casos de tumores de apenas um sítio oral identificados e, em particular das mulheres portadoras de tumores de língua, seria de grande valia para ajudar a elucidar as associações observadas no presente estudo.

A conclusão da análise do perfil mutacional de *EGFR* permitirá que possa ser investigada a possibilidade de uma ocorrência preferencial de mutações em *EGFR* nos tumores de determinado sítio. Tal informação será extremamente relevante ao fornecer mais evidências sobre a possível existência de processos de carcinogênese específicos em sítios orais que, apesar de anatomicamente tão próximos, podem ser molecularmente bastante distintos.

## 8 – CONCLUSÕES

- 1- Existe uma expressão constitutiva de enzimas CYP em toda a cavidade oral de humanos e de animais de laboratório;
- 2- Existe uma ampla variabilidade interindividual nos níveis de expressão de enzimas CYP na cavidade oral de humanos, que pode explicar o motivo pelo qual pessoas expostas aos mesmos fatores de risco desenvolvem tumores em sítios anatômicos diferentes;
- 3- Existem diferenças nos níveis de expressão de enzimas CYP em cavidade oral entre as espécies de animais de laboratório testadas;
- 4- Existem diferenças nos níveis de expressão de enzimas CYP em cavidade oral entre as linhagens de camundongo testadas;
- 5- Em geral, a língua e o assoalho da boca expressam a maior variedade e a maior quantidade de enzimas CYP, tanto em animais de laboratório quanto em humanos, sendo exatamente esses os sítios com maior incidência de tumores em cavidade oral;

- 6- Nenhuma espécie entre os de animais de laboratório testados, apresentou níveis de expressão de enzimas CYP comparáveis aos observados em humanos. Contudo, estudos de carcinogênese sítio-específicos podem se valer de similaridades observadas para selecionar o animal que apresente padrões de expressão mais parecidos com o humano no sítio a ser investigado;
  
- 7- Os níveis de expressão de CYP1A1 foram baixos em humanos, sendo fortemente induzidos apenas no humano tabagista.
  
- 8- Os tumores de sítio único em cavidade oral apresentaram padrões de associação específicos com as variáveis sexo, tabagismo/etilismo e estadiamento patológico.

## 9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNARDT R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. **J. Biotechnol.** n.124, p. 128-145, 2006
- BUNZ F. **Principles of Cancer Genetics**, 3ed. Baltimore, Springer, 2008, 325p.
- BUSTIN SA. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative realtime PCR experiments. **Clin. Chem.** n.55, p.611–622, 2009.
- CAMISASCA DR *et al.* Expression of Bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.** n.45, p.225–233, 2009.
- CAMISASCA DR *et al.* Oral Squamous Cell Carcinoma: Clinicopathological Features in Patients with and without Recurrence. **ORL.** n.73,p.170–176, 2011.
- CHI AC *et al.* Differential induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo[a]pyrene in oral squamous cell carcinoma cell lines and by tobacco smoking in oral mucosa. **Oral Oncol.** n. 45, p.980–985, 2009.
- CHOUDHARY D *et al.* Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues **Arch. Biochem. Bioph.** n.414, p. 91–100, 2003.
- CHOUDHARY D *et al.* Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1–4) during development and in different adult tissues. **Arch. Biochem. Bioph.** n.436, p. 50–61, 2005.
- COSTA ALL *et al.* Correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e localização anatômica em carcinoma de células escamosas oral. **Pesqui. Odontol. Bras.** 16, p.216–220, 2002.

- DALY AK. Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Fundam & Clin. Pharmacol.* 2003;17:27-41.
- DANIELSON PB. The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. **Curr. Drug Metabol.** n. 3, p.561-597, 2002.
- DIAS FL *et al.* Relevance of Skip Metastases for Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue and the Floor of the Mouth. **Otolaryngol. Head Neck Surg.** n.134, p.460-465, 2006.
- GANLY I.; PATEL S. & SHAH J. Early Stage Squamous Cell Cancer of the Oral Tongue – Clinicopathologic Features Affecting Outcome. **Cancer** n. 118, p101-111, 2012.
- GILLISON ML. *et al.* Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. **J Nat. Canc Inst.** n. 92, p709-720, 2000.
- GILLISON M. HPV casts a wider shadow. **Science** n.323, p. 580-581, 2009.
- GLOBOCAN 2008. Disponível em [globocan.iarc.fr](http://globocan.iarc.fr).
- GODOY W *et al.* CYP2A6/2A7 and CYP2E1 expression in human oesophageal mucosa: regional and inter-individual variation in expression and relevance to nitrosamine metabolism. **Carcinogenesis** n.23, p 611–616, 2002.
- HASHIBE M. Risk factors: tobacco and alcohol. In: OLSHAN, AF (ed). **Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention of Head and Neck Cancer.** 1 ed. New York: Springer, 2010. p. 65-85.
- HASHIBE M; FERLAY J; SANKARANARAYANAN R. Descriptive Epidemiology: International Patterns. In: OLSHAN, AF (ed). **Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention of Head and Neck Cancer.** 1 ed. New York: Springer, 2010. p. 41-63.
- HASLER JA. Pharmacogenetics of cytochromes P450. **Mol Aspects Med.** 1999; 20:12-24.
- HERBSTER S *et al.* HPV infection in Brazilian patients with esophageal squamous cell carcinoma: Interpopulational differences, lack of correlation with surrogate markers and clinicopathological parameters. **Cancer Letters.** n.326, p.52–58, 2012.

- HONORATO J *et al.* Análise de Sobrevida Global em Pacientes Diagnosticados com Carcinoma de Células Escamosas de Boca no INCA no ano de 1999. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, n.12, p.69-81, 2009.
- HRYCAY EG & BANDIERA SM. Expression, Function and Regulation of Mouse Cytochrome P450 Enzymes: Comparison With Human Cytochrome P450 Enzymes. **Current Drug Metabolism**. n.10, p.1151-1183, 2009.
- HSIEH, L. L. *et al.* Characteristics of mutations in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma associated with betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwanese. **Carcinogenesis** n.22, p.1497-1503, 2001.
- IARC. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Lyon, 2004.
- IARC TP53 *database*. Disponível em [p53.iarc.fr](http://p53.iarc.fr).
- IARC. Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific *N*-Nitrosamines. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Lyon, 2007.
- INCA. Estimativa 2012 - Incidência de câncer no Brasil. 2012; Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>.
- JOHNSON N *et al.* Squamous Cell Carcinoma. In: BARNES L *et al.* (ed) **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC Press, 2005. p. 168-175.
- KADEMANI D. Oral Cancer. **Mayo Clin Proc** n.82:878–887, 2007.
- KALSCHEUER S *et al.* Differential expression of microRNAs in early-stage neoplastic transformation in the lungs of F344 rats chronically treated with the tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. **Carcinogenesis**, n.29,p.2394–2399, 2008.
- KUROSE K *et al.* Cloning and characterization of Syrian Hamster testosterone 7 $\alpha$ -hydroxylase, CYP2A9. **Arch. Biochem. Biophys**. n.351 p. 60-65, 1998.
- LEWIS D.F.V. **Guide to cytochromes P450 structure and function**. London: Taylor & Francis, 2001, 215p.

- LINDELL M; LANG M; LENNERNAS H. Expression of genes encoding for drug metabolizing cytochrome P450 enzymes and P-glycoprotein in the rat small intestine; comparison to the liver **Eur. J. Drug Metab. Pharm.** n.28,p.41-48, 2003.
- MILAS Z; MYERS J; CAULIN C. Animal models of oral cancer metastasis. In: MYERS J (ed) **Oral Cancer Metastasis**. Toronto, Springer, 2010, p. 135-161.
- MORRIS LGT *et al.* Second primary cancers after an index head and neck cancer: subsite-specific trends in the era of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. **J. Clin. Oncol.** n.29, p. 739-746, 2011.
- NAGINI S *et al.* Of humans and hamsters: A comparative evaluation of carcinogen activation, DNA damage, cell proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis in oral cancer patients and hamster buccal pouch carcinomas. **Oral Oncol.** n.45, p.31-37, 2009.
- NEBERT DW; DALTON TP. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. **Nature Rev** n.6, p.947-960, 2006.
- NELSON DR. The Cytochrome P450 Homepage. **Human Genomics** n.4, p.59-65, 2009.
- NEVILLE BW *et al.* Epithelial Pathology. In: **Oral & Maxillofacial Pathology**, 3ed. New York: Saunders, 2008. p. 362–452.
- PINDBORG JJ *et al.* **Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa**. WHO International Classification of Tumors. 2 ed. Berlin: Springer Verlag; 1997. 87 p.
- PUTZ A *et al.* TP53 Mutation Pattern of Esophageal Squamous Cell Carcinomas in a High Risk Area (Southern Brazil): Role of Life Style Factors. **Int. J. Cancer.** n.98, p.99–105,2002.
- RAZFAR A; GRANDIS JR, Growth factor receptor signaling and metastasis of oral cancer. In: MYERS J (ed) **Oral Cancer Metastasis**. Toronto, Springer, 2010, p. 185-196.
- RENAUD HJ *et al.* Tissue Distribution and Gender-Divergent Expression of 78 Cytochrome P450 mRNAs in Mice. **Toxicol Sci.** n.124, p.261–277,2011.
- RIBEIRO PINTO LF *et al.* Rat oesophageal cytochrome P450 (CYP) system: comparison to the liver and relevance in N-nitrosodiethylamine carcinogenesis. **Carcinogenesis** n.22, p.1877–1883, 2001.

- RIBEIRO PINTO LF *et al.* Mechanisms of esophageal cancer development in Brazilians. **Mutation Research** n.544, p.365–373, 2003.
- ROBOTTOM-FERREIRA; RIBEIRO PINTO LF; ALBANO RM. An optimized reverse transcription-polymerase chain reaction procedure for the amplification of low-copy CYP2A3 mRNA in rat esophagus. **Anal. Biochem.** 2003; n.319:323–6.
- SAMBROOK J *et al.* **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 3ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1, p.9.20, 2001.
- SARIKAYA D. *et al.* RT-PCR-based cytochrome P450 expression profile of oral tissue samples. **J. Clin. Pharm. Therap** n.32, p445-448, 2007.
- SLAUGHTER DP; SOUTHWICK HW; SMEJKAL W. “Field Cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. **Cancer** n.6, p.963-968, 1953.
- SOUSSI T. Analysis of p53 gene alterations in cancer: a critical view. In: **25 years of p53 research.** HAINAUT P; WIMAN KG (ed), Dordrecht, Springer, 2007, p.255-292.
- SWORDS WE. Chemical transformation of *E.Coli* . In: *E. coli* plasmid vectors. Methods and Applications. **Methods in Molecular Biology**, n.235, p. 49-53, 2003.
- SZYMANSKA K, HAINAUT P. TP53 and mutations in human cancer. **Acta Biochim Pol.** n. 50, p. 231-238, 2003.
- SZYMANSKA K *et al.* TP53 and EGFR mutations in combination with lifestyle risk factors in tumours of the upper aerodigestive tract from South America. **Carcinogenesis.** n.31, p.1054–1059, 2010.
- TAKIGUCHI M. *et al.* Metabolic Activation of Heterocyclic Amines and Expression of CYP1A1 in the Tongue. **Toxicol Sci.** n.116, p.79-91, 2010.
- TOYOOKA S, TSUDA T, GAZDAR AF. The *TP53* gene, tobacco exposure, and lung cancer. **Hum. Mutat.** n.21, p. 229-239, 2003.
- VAIRAKTARIS E *et al.* The Hamster Model of Sequential Oral Oncogenesis. **Oral Oncol.** n.44, p.315–324, 2008.

- VISONI S, LANG M, RIBEIRO PINTO LF. Hamster exhibits major differences in organ-specific metabolism of the esophageal carcinogen N-nitrosodiethylamine. **Toxicology Letters** n.181, p.1–25, 2008.
- VONDRACEK M *et al.* Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa. **Carcinogenesis** n.22, p.481–488, 2001.
- WARNAKULASURIYA KAAS, ROBINSON D; EVANS H. Multiple primary tumours following head and neck cancer in southern England during 1961-98. **J. Oral Pathol. Med.** n.32, p.443-449, 2003.
- WARNAKULASURIYA S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol.** n. 45, p.309-315, 2009.
- WITTEWER CT; KUSAKAWA N. Real-time PCR, In: PERSING, DH *et al* . (eds.) **Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice**, Washington, ASM Press, p. 71–84, 2004.
- YANG S-P , MEDLING , RANER .Cytochrome P450 expression and activities in rat, rabbit and bovine tongue. **Comp Biochem Physiol PartC** n.136, p.297–308, 2003.
- ZIGON G. *et al.* Prognoses for head and neck cancers in Europe diagnosed in 1995–1999: a population-based study. **Ann. Oncol.** n.22, p.165–174, 2011.

## 10 – ANEXOS E APÊNDICES

### ANEXO 1

#### LINEARIZAÇÃO DOS PLASMÍDEOS

	Volume necessário para chegar a 2,5µg de plasmídeo (µL)	Tampão 10x (µL)	Enzima <i>Pst</i> I (µL)	H <sub>2</sub> O (µL)
1a1 camundongo	14	10	5	71
1a2 camundongo	11	10	5	74
2a5 camundongo	43	10	5	42
2b9 camundongo	18	10	5	67
2b10 camundongo	22	10	5	63
2e1 camundongo	12	10	5	73
GAPDH camundongo	9	10	5	76
1A1 rato	16	10	5	69
1A2 rato	8	10	5	77
2A3 rato	25	10	5	60
2B1 rato	13	10	5	72
2E1 rato	15	10	5	70
GAPDH rato	9	10	5	76
β actina rato	47	10	5	33
1A1 hamster	33	10	5	52
1A2 hamster	20	10	5	65
2A8 hamster	19	10	5	66
2A9 hamster	18	10	5	67
2A16 hamster	18	10	5	67
2E1 hamster	15	10	5	70
GAPDH hamster	18	10	5	67
1A1 humano	27	10	5	58
1A2 humano	30	10	5	55
2A6 humano	21	10	5	64
2B6 humano	19	10	5	66
2E1 humano	20	10	5	65
GAPDH humano	8	10	5	77
Plasmídeo sem inserto	10	10	5	75

## ANEXO 2

### APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA



Memo 440/11-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 5 de dezembro de 2011.

A(o): Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto  
Pesquisador(a) Principal

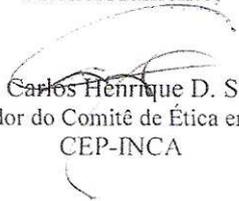
**Registro CEP nº 116/11** (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)  
**CAAE – 0086.0.007.000-11**  
**Título do Estudo – Marcadores Moleculares de Tumores Secundários de Esôfago em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas em Cabeça e Pescoço: Uso Potencial no Diagnóstico Precoce e na Terapia de Rotina**

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do INCA **aprovou** após reanálise o estudo intitulado: **Marcadores Moleculares de Tumores Secundários de Esôfago em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas em Cabeça e Pescoço: Uso Potencial no Diagnóstico Precoce e na Terapia de Rotina versão 2**, bem como seu TCLE para estudo prospectivo **CECP versão 3** e TCLE para estudo retrospectivo **CECP e CEE versão 3**, em 30 de novembro de 2011.

Ressalto o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

Atenciosamente,

  
Dr. Carlos Henrique D. Silva  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP-INCA

C/c – Dr. Luiz Augusto Maltoni – Direção Geral



## ANEXO 4

## CLASSIFICAÇÃO TNM DOS TUMORES DE CAVIDADE ORAL

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

pTNM – Classificação Patológica – pT, pN e pM			
Grupamento por Estádios			
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T1, T2 T3	N1 N0, N1	M0 M0
Estádio IVA	T1, T2, T3 T4a	N2 N0, N1, N2	M0 M0
Estádio IVB	Qualquer T T4b	N3 Qualquer N	M0 M0
Estádio IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

TNM Classification of Malignant Tumours 7th edition, Leslie H Sobin, Mary K Gospodarowicz and Christian Wittekind ed. UICC, 2011

## APÊNDICE

### PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO 2009/2012

#### Capítulo de livro

1. BERNARDO, Vagner ; FARINA, M ; SILVA, Licínio Esmeraldo ; LINS, U . Digital Image Subtraction, Blue Filter, Enhancement (DISBE): A new approach for quantitative immunohistochemical analysis in light microscopy. In: Antonio Méndez-Vilas; Jesús Díaz Álvarez. (Org.). Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. Badajoz: Formatex Research Center, 2010, v. 2, p. 828-835

#### Artigos científicos

1. Simão, Tatiana ; Souza-Santos, Paulo T. ; de Oliveira, Diego S.L. ; BERNARDO, Vagner ; Lima, Sheila C.S. ; Rapozo, Davy C.M. ; Krueel, Cleber D.P. ; Faria, Paulo A. ; Ribeiro Pinto, Luis F. ; Albano, Rodolpho M. . Quantitative evaluation of SPRR3 expression in esophageal squamous cell carcinoma by qPCR and its potential use as a biomarker. Experimental and Molecular Pathology (Print), v. 91, p. 584-589, 2011.

2. CAMISASCA, Danielle Resende ; HONORATO, J. ; Vagner Bernardo ; SILVA, Licínio Esmeraldo ; FONSECA, Eliene Carvalho ; FARIA, Paulo Antônio Silvestre de ; DIAS, Fernando Luiz ; LOURENÇO, S Q C . Expression of BCL-2 Family Proteins and Associated Clinicopathologic Factors Predict Survival Outcome in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. Oral Oncology, v. 45, p. 225-233, 2009.

3. GVO Fernandes ; M. Calasans-Maia ; F F Mitri ; BERNARDO, Vagner Gonçalves ; A. Rossi ; G.D.S. Almeida ; J.M. Granjeiro . Histomorphometric Analysis of Bone Repair in Critical Size Defect in Rats Calvaria Treated with Hydroxyapatite and Zinc-Containing Hydroxyapatite 5%. Key Engineering Materials, v. 396-8, p. 15-18, 2009.

4. Neusa Motta de Freitas Costa ; Bruno Raposo Melo ; Rosana Tavares Brito ; Gustavo Vicentis de Oliveira Fernandes ; BERNARDO, Vagner Gonçalves ; Eliene Carvalho da Fonseca ; Márcio Baltazar Conz ; Glória de Almeida Soares ; José Mauro Granjeiro . Techniques to study cellular response in critical size bone defect healing on rat calvaria treated with hydroxyapatite implants. Key Engineering Materials, v. 396-8, p. 285-288, 2009.

5. Cunha, K. S. G. ; Caruso, A. C. ; Goncalves, A. S. ; BERNARDO, Vagner ; Pires, A. C. ; da Fonseca, E. C. ; Silvestre de Faria, P. A. ; da Silva, L. E. ; Geller, M. ; de Moura-Neto, R. S. ; Lopes, V. S. . Validation of tissue Microarray technology in malignant peripheral nerve sheath tumours. Journal of Clinical Pathology, v. 62, p. 629-633, 2009.

6. BERNARDO, Vagner ; Lourenço, Simone Q.C. ; Cruz, Renato ; Monteiro-Leal, Luiz H. ; Silva, Licínio E. ; Camisasca, Danielle R. ; Farina, Marcos ; Lins, Ulysses . Reproducibility of Immunostaining Quantification and Description of a New Digital Image Processing Procedure for Quantitative Evaluation of Immunohistochemistry in Pathology. Microscopy and Microanalysis (Print), v. 15, p. 353, 2009.

---

**APÊNDICE (continuação)**

7. Neusa Motta de Freitas Costa ; Bruno Raposo Melo ; Rosana Tavares Brito ; Gustavo Vicentis de Oliveira Fernandes ; BERNARDO, Vagner Gonçalves ; Eliene Carvalho da Fonseca ; Márcio Baltazar Conz ; Glória de Almeida Soares ; José Mauro Granjeiro . Quality and Intensity of the Tissue Response to Two Synthetic Granular Hydroxyapatite Implanted in Critical Defects of Rat Calvaria. *Materials Research*, v. 12, p. 245-251, 2009.

8. SILVA JUNIOR, José de Assis ; BERNARDO, Vagner Gonçalves ; Balassiano, Karen Zavaró ; Flávia Dantas Soares ; da Fonseca, E. C. ; LE Silva ; LOURENÇO, S Q C . Análise comparativa da imunexpressão da proteína p53 (clones DO-7 e PAb-240) em carcinomas de células escamosas intrabucais e labiais. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (Impresso)*, v. 45, p. 335-342, 2009.