

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ELAINE STUR

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES DE REPARO
EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE
CABEÇA E PESCOÇO E A RELAÇÃO DO PROGNÓSTICO E
RADIOSENSIBILIDADE TUMORAL**

VITÓRIA

2014

ELAINE STUR

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES DE REPARO EM
PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E
PESCOÇO E A RELAÇÃO DO PROGNÓSTICO E
RADIOSENSIBILIDADE TUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Iúri Drumond Louro

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira
Alvares da Silva Conforti

VITÓRIA

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

S935a Stur, Elaine, 1990 -
Avaliação de polimorfismos de genes de reparo em
pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e a
relação do prognóstico e radiosensibilidade tumoral/ Elaine
Stur. – 2014.
114 f. : il.

Orientador: Lúri Drumond Louro.

Coorientador: Adriana Madeira Alvares da Silva Conforti.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Neoplasias de Cabeça e Pescoço. 2. Tolerância a
Radiação. 3. Prognóstico. 4. Desoxirribonucleases. I. Louro, Lúri
Drumond. II. Conforti, Adriana Madeira Alvares da Silva. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDU: 61

ELAINE STUR

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES DE REPARO EM PACIENTES
COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO E A RELAÇÃO DO
PROGNÓSTICO E RADIOSENSIBILIDADE TUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 26 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Lúri Drumond Louro
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira Alvares da Silva
Conforti
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Magnus Régios Dias da Silva
Universidade Federal de São Paulo

VITÓRIA

2014

A Helmut, meu avô [in memoriam].

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pois sem dúvida, é minha força superior que guia cada um dos meus passos e me deu força suficiente para enfrentar cada um dos obstáculos para chegar até aqui e vencer. Meu deu coragem, ânimo e em nenhum momento me deixou nem sequer pensar em desistir.

Agradeço de todo meu coração a Felipe, que tem sido meu apoio, meu amor, minha base forte, que em todos os dias suportou meu estresse, meus problemas, dividiu comigo as alegrias e as dificuldades e que sei que sempre estará ao meu lado, independentemente da situação.

A meus pais, que me ensinaram o valor da luta, me ensinaram a importância de ser uma pessoa íntegra, que me incentivaram a ir para frente e que principalmente me deram a vida. E aos irmãos que fazem companhia, que empurram para a frente e que sempre tem uma palavra amiga. Agradeço infinitamente por vocês existirem!

A Lidiane, que nos últimos dois anos se mostrou uma boa companheira, dividimos muitos trabalhos, muitas alegrias e as tristezas também. Com a qual passei tanto tempo, tantos dias, tantas conversas. Você foi uma surpresa boa que me aconteceu nesses dois anos.

A Marcelo, pelos ensinamentos, pela ajuda no desenvolvimento em todas as etapas do trabalho e por todo o tempo e paciência dispensados.

As companheiras de laboratório Clara, Raquel, Gabriela, Fernanda, Jéssica e Danielle. Agradeço de verdade, por tantos sorrisos, por fazer os dias cansativos de laboratório tão mais alegres, divertidos e tão menos cansativos. Obrigada por toda amizade que foi oferecida, por toda força que foi dada, por toda ajuda. Sem vocês, com certeza teria sido muito mais difícil de suportar. Levarei vocês para sempre nas minhas melhores lembranças.

Aos menos presentes, mas companheiros, Vitor Stange, Vitor Aguiar, Quézia, Raquel Reis, Lucas e Suzzany, agradeço também pelo companheirismo e pelo aprendizado que tantas vezes juntos compartilhamos.

Ao orientador, Lúri, que mais do que orientador considero como bom amigo e conselheiro, que sabe as palavras certas na hora do desespero. Obrigada por todos os ensinamentos, pela consideração, pela confiança, pela paciência. Obrigada por já me apoiar há seis anos e obrigada por estar disposto e acreditar em mim por pelo menos mais quatro. Sem dúvida, sem seu auxílio, eu não estaria realizando meus sonhos, trabalhando, com o que de fato tanto gosto.

A co-orientadora, Adriana, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho, pela paciência, pelo apoio em tantos congressos e por nos passar tanto conhecimento.

A Dona Telma, que todos os dias de manhã, nos recebe com um sorriso, um café, um chá, uma conversa e muita alegria, deixando nossos dias mais alegres.

Ao Dr. Brasilino de Carvalho de Carvalho e Dra. Eloíza Helena Tajara da Silva, por cederem as amostras para a realização deste trabalho. E aos pacientes, que em algum momento, cederam suas amostras biológicas para que este fosse realizado.

Agradeço ao Prof. Dr Magnus e ao Prof. Dr Marco, pela participação na banca avaliadora desta dissertação.

A UFES e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade da realização da pós graduação.

A CAPES, pela concessão da bolsa de pós graduação.

“Uma das coisas que aprendi é que se deve viver apesar de. Apesar de, se deve comer. Apesar de, se deve amar. Apesar de, se deve morrer. Inclusive muitas vezes é o próprio apesar de que nos empurra para a frente. Foi o apesar de que me deu uma angústia que insatisfeita foi a criadora da minha própria vida.”

Clarice Lispector

RESUMO

Polimorfismos em genes de reparo de DNA são apontados como possíveis marcadores de prognóstico e radiosensibilidade tumoral em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP). Assim, objetivou-se analisar os polimorfismos dos genes de reparo de DNA XRCC1 (rs1799782 e rs25487), XRCC3 (rs861539), XPC (rs2228001), ERCC1 (rs11615) e RAD51 (rs1801320), para verificar a influência destes na resposta radioterápica e no prognóstico de pacientes com CECP. Para obtenção dos genótipos, foi utilizado DNA extraído de sangue periférico de 311 amostras de CECP e posteriormente analisadas em PCR-RFLP. Os resultados do polimorfismo XRCC1 Arg399Gln, demonstram que o alelo 399Gln aumenta o risco de recidiva local em pacientes com CE oral e de orofaringe irradiados (OR=3,35; CI= 1,10-10,13). No polimorfismo XPC Lys939Gln, o alelo 939Gln aumenta o risco de precocidade de recidiva local em pacientes com CE oral e de orofaringe irradiados (OR=6,04; CI=1,47-24,88). No polimorfismo XRCC3 Thr241Met, o alelo 241Met está relacionado a um aumento de recidiva local e maior precocidade para o desenvolvimento de recidiva local (HR=12,55; CI=2,47-63,73) e está relacionado com a pior sobrevida de doença específica, aumentando o risco de precocidade de óbito (HR=3,04; CI=1,08-8,61) em pacientes com CE de laringe irradiados. Já o polimorfismo RAD51 -98G>C, o alelo C aumenta a ocorrência de recidiva local (HR=2,84; CI=1,25-6,47) em pacientes com CE oral e orofaringe não irradiados. Assim, é possível concluir verificar que é possível a utilização de polimorfismos em genes de reparo como marcadores de prognóstico e de radiosensibilidade tumoral para o CECP.

Palavras-chave: Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço; Radiosensibilidade tumoral; Prognóstico; Genes de reparo de DNA.

ABSTRACT

DNA repair gene polymorphisms have been suggested as putative markers for prognosis and radiosensitivity in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Therefore, we have aimed to study polymorphisms in repair genes XRCC1 (rs1799782 and rs25487), XRCC3 (rs861539), XPC (rs2228001), ERCC1 (rs11615) and RAD51 (rs1801320), in order to evaluate their influence in the radiotherapy response and prognosis in HNSCC. Genotypes were determined by DNA extracted from peripheral blood of 311 patients with HNSCC, after PCR-RFLP analysis. Polymorphisms XRCC1 Arg399Gln showed that allele 399Gln increases disease relapse risk in irradiated patients with oral and oropharyngeal tumors (OR=3.35; CI= 1.10-10.13). As for XPC Lys939Gln polymorphism, 939Gln allele increases disease relapse risk in irradiated oral and oropharyngeal tumor patients (OR=6.04; CI=1.47-24.88). Allele 241Met of XRCC3 Thr241Met polymorphism, is related with increased local relapse, and faster disease local relapse (HR=12,55; CI=2,47-63,73), as well as worse disease-specific survival, increasing the risk of early death (HR=3,04; CI=1,08-8,61) in irradiated larynx SCC patients. In comparison with polymorphism RAD51–98G>C, allele C increases local recurrence risk (HR=2,84; CI=1,25-6,47) in non-irradiated patients with oral and oropharyngeal SCC. Our data suggest that it is possible to use DNA repair gene polymorphisms as prognostic and radiosensitivity markers for HNSCC.

Key Words: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; Tumor Radiosensitivity; Prognostic; Repair Genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo da via de BER.....	35
Figura 2: Via de NER- TCR e GGR.....	37
Figura 3: Via de Recombinação de quebra dupla de DNA: Recombinação não homóloga.....	38
Figura 4: Via de recombinação de quebra dupla de DNA: Recombinação homóloga.	40
Figura 5: Via de Mismatch Repair.	43
Figura 6: Gel de Agarose 3%, corado com Brometo de Etídio.	60
Figura 7: Curva de sobrevida livre de doença local do polimorfismo XPC Lys939Gln de pacientes com CE oral e orofaringe irradiados.....	82
Figura 8: Curva de sobrevida livre de doença local do polimorfismo RAD51 -98G>C de pacientes com CE oral e orofaringe não-irradiados.....	84
Figura 9: Curva de sobrevida livre de doença local do polimorfismo XRCC3 Thr241Met de pacientes com CE de laringe irradiados.....	85
Figura 10: Curva de sobrevida de doença específica do polimorfismo XRCC3 Thr241Met de pacientes com CE de laringe irradiados.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características epidemiológicas dos pacientes diagnosticados com CECP	54
Tabela 2: Sequência de <i>primers</i> e seus respectivos fragmentos gerados na reação de PCR.....	57
Tabela 3: Condições físicas da reação de PCR	57
Tabela 4: Condições Químicas da Reação de PCR.....	58
Tabela 5: Condições químicas e físicas da reação de RFLP	59
Tabela 6: Características clinicopatológicas dos pacientes com CECP	64
Tabela 7: Características clínicas dos tratamentos dos pacientes com CECP	66
Tabela 8: Dados de prognóstico e acompanhamento dos pacientes com CECP, conforme sítio anatômico.	67
Tabela 9: Frequência genotípica dos genes de reparo de DNA, conforme sítios anatômicos.....	70
Tabela 10: Análise de prognóstico de dados de Recidiva Geral em pacientes com CE oral e de orofaringe	72
Tabela 11: Análise de prognóstico de Recidiva Geral em pacientes com CE de laringe.....	73
Tabela 12: Análise de Prognóstico de Recidiva Local em pacientes com CE oral e de orofaringe	74
Tabela 13: Análise de Prognóstico de Recidiva Local em pacientes com CE de laringe.....	75

Tabela 14: Análise de Prognóstico de dados de Óbito em pacientes com CE oral e de orofaringe	76
Tabela 15: Análise de Prognóstico de dados de Óbito em pacientes com CE de laringe.....	77
Tabela 16: Análise multivariada de recidiva local em pacientes com CE oral e de orofaringe	78
Tabela 17: Análise multivariada de óbito em pacientes com CE oral e de orofaringe	79
Tabela 18: Análise multivariada de recidiva local em pacientes com CE de laringe de casos irradiados	80
Tabela 19: Análise multivariada de óbito em pacientes com CE de laringe	80
Tabela 20: Análise multivariada de sobrevida livre de doença local de pacientes com CE oral e de orofaringe	82
Tabela 21: Análise multivariada de sobrevida livre de doença local de pacientes com CE de laringe em casos irradiados.....	85
Tabela 22: Análise multivariada de sobrevida de doença específica em pacientes com CE de laringe de casos irradiados.....	87

LISTA DE SIGLAS

AIDS	Síndrome do Imunodeficiência Adquirida (do inglês, <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
ATP	Adenosina Trifosfato
BER	Reparo por Excisão de Base (do inglês, <i>Base Excision Repair</i>)
BRCA	<i>Breast Cancer</i>
C	Citosina
CE	Carcinoma Epidermóide
CECP	Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço
CPD	Dímeros de Pirimidina Ciclobutano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EBV	Epistein-Barr Vírus
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do inglês, <i>Ethylenediamine</i>)

tetraacetic acid)

ERCC1 *Excision Repair Cross Complementing-Group 1*

ERCC1 *Excision Repair Cross Complementing-Group 1*

G Guanina

GGR Reparo Genômico Global (do inglês, *Global Genomic Repair*)

Gln Glutamina

GST Glutathione S-Transferase

HCl Ácido clorídrico

HR *Hazard ratio*

HPV Papiloma Vírus Humano

IARC International Agency for Research on Cancer

IC Intervalo de confiança

INCA Instituto Nacional do Câncer

Lys Lisina

Met Metionina

MMR	Reparo de mal pareamento (do inglês, <i>Mismatch Repair</i>)
NaCl	Cloreto de sódio
NER	Reparo por Excisão de Nucleotídeo (do inglês, <i>Nucleotide Excision Repair</i>)
OD	<i>Odds Ratio</i>
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PARP	Poli (ADP-Ribose) Polimerase
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (do inglês, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RPA	Replication Protein A
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
T	Timina
TCR	Reparo acoplado a Transcrição (do inglês, <i>Transcription Coupled Repair</i>)
TE	Tris-EDTA

TNM Tumor-Nodo-Metástase (do inglês, Tumor-nodo-metastasis)

Thr Treonina

SDS Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês, Sodium Dodecyl Sulfate)

UV Ultra Violeta

XPC *Xeroderma pigmentosum group C*

XPF Xeroderma Pigmentosum Group F

XRCC1 *X-Ray Repair Cross-Complementing Group 1*

XRCC3 *X-Ray Repair Cross-Complementing Group 3*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Revisão Bibliográfica	25
1.1.1 Câncer	25
1.1.2 Câncer de cabeça e pescoço.....	28
1.1.3 Prognóstico do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	31
1.1.4 Mecanismos de reparo de DNA	32
1.1.5 Genes de reparo do DNA	43
1.1.6 Ação da radioterapia	46
2 OBJETIVOS.....	50
2.1 Objetivo Geral	50
2.2 Objetivos Específicos.....	50
3 METODOLOGIA	52
3.1 Considerações éticas	52
3.2 Casuística.....	52
3.3 Extração de DNA de sangue periférico.....	54
3.4 Escolha das regiões e Técnica de PCR-RFLP.....	56
3.5 Visualização e análise do produto	59
3.6 Análise estatística.....	60

4 RESULTADOS	63
4.1 Análise descritiva	63
4.1.1 Análise clinicopatológica	63
4.1.2 Características do tratamento	65
4.1.3 Dados de prognóstico	66
4.2 Análise Genotípica	68
4.3 Análise de prognóstico	71
5 DISCUSSÃO	89
6 CONCLUSÃO	101
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
8 ANEXOS	114

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer nos últimos anos vem se tornando um problema de saúde pública, deixando de ser predominante apenas em países em desenvolvimento (DING et al., 2013) e passando a apresentar altas taxas também em países desenvolvidos (INCA, 2011).

Entre os diversos tipos de cânceres, pode-se citar o câncer de cabeça e pescoço, que envolve um número extensivo de tumores entre eles, cavidade oral, laringe, faringe, seios maxilares, cavidade nasal, tumores das glândulas salivares e tireóide. Histologicamente, o tipo mais comum de tumores de cabeça e pescoço é o carcinoma epidermóide (UICC, 2004).

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) é uma causa significativa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com aproximadamente 540.000 casos e 271.000 mortes por ano, sua taxa de mortalidade atinge 50% dos casos (PEREZ et al., 2006).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento destas neoplasias, incluem hábitos etilistas, tabagistas, além de infecções virais, como o HPV (Papiloma Vírus Humano) e, ainda, a predisposição e susceptibilidade genética de cada indivíduo (PICCININ et al, 1998; COLOMBO, 2008; HAN et al., 2010; BRAKENHOFF, 2011; WARNAKULASURAYA, 2012).

Os estágios iniciais, que incluem os estádios I e II, são diagnosticados em cerca de 30 a 40% dos casos novos, com uma expectativa de sobrevida livre da doença variando de 60 a 90% após o tratamento. Nos casos restantes, onde a doença é detectada já em estágio avançado (estádio III e IV), cerca de 50% dos casos têm tumores potencialmente ressecáveis com chance de sobrevivência de 40-50%. Nos casos avançados não-ressecáveis, o prognóstico é pior, com uma taxa de 10 a 40% dos casos sobrevivendo à doença por 5 anos (GREENE et al., 2002; JEMAL et al., 2007).

O tratamento do CECP apresenta muitos desafios, principalmente devido aos danos que determinado tratamento pode trazer. A região da cabeça e pescoço é rica em estruturas sensíveis e facilmente danificáveis, tanto pelo tumor quanto pelo tratamento. Tais danos que incluem desde uma simples dificuldade em deglutir até deformações estruturais, podem comprometer a qualidade de vida dos pacientes (BARRIOS et al., 2013; MOORE et al., 2013).

De forma geral, o tratamento do câncer é multimodal, envolvendo cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Nas duas últimas décadas, muitos esforços foram feitos a fim de otimizar os resultados da radioterapia, visto que diversos estudos demonstram a possibilidade de um aumento de dose, com resultados mais significativos e mais direcionados ao tumor, o que limita os danos causados aos tecidos normais do organismo (DELANEY et al., 2005).

Assim, como tem aumentado as pesquisas sobre as bases do tratamento do câncer, também tem aumentado o entendimento sobre o funcionamento molecular das vias relacionadas à resposta ao tratamento radioterápico, o que permitiu a identificação de marcadores moleculares que podem auxiliar na eficácia do tratamento (BEGG et al., 2011).

As vias genéticas foram demonstradas em diversos estudos como tendo forte influência no desenvolvimento do câncer. Da mesma forma, polimorfismos podem ser responsáveis por auxiliar no desenvolvimento de um tumor, assim como intensificar o efeito de um determinado tratamento.

Os polimorfismos são pequenas variações no genoma que podem ocorrer em qualquer local e ocorrem com uma frequência mínima de 1% na população. Podem ser de tamanhos variados, podendo ter algumas repetições ou até mesmo uma variação de um único nucleotídeo, que são os chamados *SNP's*, do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism* (MANOLIO et al, 2010; CHU et al, 2012).

Estas pequenas variações genéticas podem, em determinados casos, alterar a expressão de um gene e levar a alteração da função proteica, predispondo à doença ou influenciando na resposta ao tratamento. (KOMAR et al., 2007; PARLIAMENT et al., 2010; HORGAN et al., 2011).

Atualmente, diversos estudos tem analisado tais variações em genes de reparo de DNA visto que as atividades de reparo são críticas para proteção do genoma e consequente prevenção do câncer. Polimorfismos em genes de reparo foram correlacionados com o processo carcinogênico de diversos cânceres, como câncer colorretal, de pulmão e de cabeça e pescoço (STURGIS et al., 1999).

Existem diversos genes que estão diretamente relacionados a importantes sistemas de reparo em eucariotos. Entre eles podemos citar o gene XRCC1, que age na via de reparo por excisão de bases (BER), ERCC1 e XPC que agem na via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e XRCC3 e RAD51 que agem na via de reparo de quebra dupla de DNA (STURGIS et al., 1999; WANG et al, 2010; WANG et al, 2013).

Justamente por apresentarem ação direta sobre os importantes mecanismos de reparo de DNA e por se saber que polimorfismos podem influenciar no processo carcinogênico e na resposta radioterápica, que este trabalho buscou avaliar 6 polimorfismos, sendo eles: XRCC1 Arg194Trp (rs1799782), XRCC1 Arg399Gln (rs25487), XRCC3 Thr241Met (rs861539), XPC Lys939Gln (rs2228001), ERCC1 Asn118Asn (rs11615) e RAD51 (rs1801320), com o objetivo principal de identificar a influência destes polimorfismos na resposta radioterápica e identificar como estes polimorfismos estão atuando no prognóstico dos pacientes com CECP.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 Câncer

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) define câncer como um conjunto de mais de cem doenças, que tem em comum a capacidade de crescer desordenadamente, invadir tecidos e órgãos e espalhar-se pelo corpo (INCA, 2012).

As neoplasias, dão origem aos popularmente chamados tumores. Estes, podem ser classificados em benignos ou malignos de acordo com seu comportamento clínico. Um tumor benigno é uma massa localizada de células, sem invasão a tecidos adjacentes, que se assemelha ao tecido original, raramente constituindo um risco a vida. Já o tumor maligno possui células agressivas, com capacidade de invadir tecidos próximos formando metástases (FILHO, 2004; WEINBERG, 2008; INCA, 2012).

Os cânceres são classificados de acordo com o tipo celular de origem. O tipo mais comum é o carcinoma, de origem epitelial. Este tipo é responsável por 80% das mortes causadas por câncer.

O câncer é o resultado de um processo de múltiplas etapas dirigidas por alterações genéticas em uma única célula, que leva ao surgimento de clones de células com vantagens proliferativas sobre as demais (ALBERTS et al., 2010). As alterações genéticas podem ser herdadas, como nas síndromes predisponentes ao câncer, ou estarem presentes apenas nas células tumorais, caracterizando os tumores esporádicos (PEREZ et al., 2006).

As alterações genéticas que ocorrem no desenvolvimento de neoplasias geralmente estão relacionadas a genes que regulam processos importantes como crescimento celular, apoptose, adesão celular, entre outros.

Os genes envolvidos no surgimento do câncer são classificados em dois tipos: oncogenes e genes supressores de tumor. Os oncogenes são aqueles cujas funções estão hiper-ativadas por mutações, o que resulta em um crescimento exacerbado das células cancerosas (VOGELSTEIN et al., 2000).

Mutações em genes supressores de tumor resultam na perda da função de manutenção do adequado número celular: quer pela prevenção do surgimento de novas células, quer pela promoção da morte celular programada, a apoptose (VOGELSTEIN et al., 2000; SCHUIJER et al., 2003). Ocorrem ainda outros tipos de alterações genéticas como deleção, translocação, amplificação, metilação e instabilidade de microssatélites (KRISHNA PRASAD et al., 2013).

O processo carcinogênico geralmente é lento. O estágio inicial de transformação de células saudáveis em células malignas caracteriza-se pela ação de carcinógenos na célula. No segundo estágio, o de promoção, tais transformações tornam-se mais evidentes e as células perdem a capacidade de completar o ciclo celular de forma correta, perdendo os pontos de checagem do ciclo celular (ALMEIDA et al., 2005).

No estágio inicial as células podem apresentar diferentes níveis de alterações morfológicas, desde levemente alteradas a mais diferenciadas do que as células normais. Um tecido levemente alterado é dito displásico, onde a aparência individual de cada célula não é mais normal. As primeiras mudanças citológicas que as células passam durante o processo de transformação incluem uma variabilidade no tamanho e na forma do núcleo, aumento na relação do tamanho entre núcleo e citoplasma, aumento de atividade mitótica e perda de características citoplasmáticas quando comparadas com as atividades do tecido normal (WEINBERG, 2008).

O próximo estágio é o de progressão, onde as células se dividem desordenadamente podendo aparecer as primeiras manifestações clínicas. É neste estágio que surgem as metástases, onde células malignas se desprendem do tecido, invadem a corrente sanguínea ou os vasos linfáticos e formam novas colônias de

tumores de células cancerosas que são chamados de tumores secundários ou metástases ALBERTS et al., 2010).

A formação de um câncer envolve células com sérias alterações fenotípicas e alterações em toda sua fisiologia, apresentando altas taxas metabólicas. Todo o ambiente de crescimento de um tumor é alterado, ao qual é dado o nome de microambiente tumoral (LI et al, 2013).

O microambiente tumoral é o conjunto de todas as condições fisiológicas e metabólicas do tumor. Na maioria dos tumores, este microambiente apresenta baixa concentração de glicose, altas concentrações de lactato, pH baixo e baixas concentrações de oxigênio, o que leva a hipóxia tumoral. A hipóxia é causada pela estrutura anormal e pela baixa capacidade de transporte de oxigênio dentro do tumor (TADDEI et al., 2013).

A frequência dos diversos cânceres é distinta nas populações do mundo, apesar de apresentarem fatores genéticos semelhantes. Os fatores que mais influenciam nestas taxas são a hereditariedade e o ambiente. Populações diferentes carregam alelos diferentes, o que muda a susceptibilidade genética ao câncer (WEINBERG, et al, 2008).

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) revela que o número de casos de cânceres dobrou nos últimos 30 anos, sendo que os mais afetados são países de médio e baixo desenvolvimento. Pelas estimativas, aproximadamente 12,7 milhões de pessoas tem câncer e 7,6 milhões morrem da doença a cada ano (CDC, 2011).

Os principais fatores etiológicos para o desenvolvimento de neoplasias são o tabagismo, tanto ativo como passivo; as infecções crônicas por vírus como o Papiloma Vírus Humano, o Epstein-Barr, Hepatite B e C, Herpes Vírus, Vírus da AIDS e parasitas como vermes que atingem o fígado; alcoolismo; hormônios endógenos que envolvem fatores reprodutivos e hormônios exógenos; obesidade; sedentarismo; radiação (solar, ionizante e eletromagnética) e exposições ocupacionais a carcinógenos. Pode-se considerar ainda a pré-disposição genética (BOYLE et al.,).

O tratamento para câncer geralmente se baseia em metodologias multimodais, incluindo cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Porém o melhor tratamento indicado depende das características clínicas de cada tumor, como o estadiamento do tumor no momento da descoberta da doença, localização e outras características clínicas do paciente. Atualmente, com o avanço da ciência estão sendo utilizadas, para diagnóstico e tratamento do câncer, as ferramentas da biologia molecular, que estão permitindo resultados mais promissores tanto para um diagnóstico mais exato da doença, como para um tratamento mais individualizado, considerando as características exclusivas de cada paciente (CHAWAPUN, 2006).

1.1.2 Câncer de cabeça e pescoço

Os tumores de cabeça e pescoço envolvem um número extensivo de tumores, classificados de acordo com sua posição anatômica. Conforme o Sistema TNM (T: Tamanho do tumor; N: Presença de células tumorais em linfonodos locais; M: Presença de metástase a distância- Sistema Internacional para classificação de tumores malignos), são classificados em: câncer de boca e lábio, câncer da laringe, câncer da faringe (subdivido em: orofaringe, nasofaringe e hipofaringe), seios maxilares, cavidade nasal e seios etmoidais, tumores das glândulas salivares e tumores de tireóide (UICC, 2004).

Histologicamente, o tipo mais encontrado é o carcinoma epidermóide ou espinocelular, o qual pode chegar a 90% dos casos (ALVARENGA et al, 2008). Atualmente, este é considerado o sexto tumor sólido mais comum no mundo e o sétimo mais comum no Brasil, com uma incidência estimada de 275 mil novos casos (MOORE et al., 2013; DING et al., 2013; COLOMBO et al., 2009; WANG et al., 2013).

A localização anatômica mais frequente é a cavidade oral, ocorrendo em aproximadamente 40% dos casos, seguidos da laringe (25%) e faringe (15%) (ALVARENGA et al., 2008; COLOMBO et al., 2009). Os menos frequentes são os carcinomas das cavidades paranasais e nasofaringe (CAHALI et al., 1999; GALBIATTI et al., 2012). No câncer oral, a doença acomete preferencialmente o palato mole, assoalho bucal, gengiva e língua (SINHA et al., 2013).

A maior incidência de carcinomas de cabeça e pescoço é verificada em indivíduos do sexo masculino. No carcinoma da cavidade oral a proporção pode chegar a 3:1 entre homens e mulheres acometidos (DEDIVITIS et al., 2004; REID et al., 2000). No entanto, tem-se observado um aumento no número de mulheres acometidas, provavelmente devido a mudanças nos hábitos etilistas e tabagistas (ALVARENGA et al., 2008; DEDIVITIS et al., 2004). Tem-se observado também, um aumento no número de caso em pessoas jovens, o que está ligado ao uso de tabaco e produtos relacionados (KRISHNA PRASAD et al., 2013; LI et al., 2013).

Evidências epidemiológicas demonstram ainda que a incidência do câncer de cabeça e pescoço aumenta com a idade, afetando de forma geral pessoas com mais de 50 anos e em 6% dos casos, pessoas com menos de 45 anos. Com relação ao gênero, os indivíduos do sexo masculino desenvolvem a neoplasia por volta dos 55,6 anos, e as mulheres, por volta dos 60 anos (DEDIVITIS et al., 2004; LI et al., 2013).

A epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço é muito heterogênea, devido principalmente a diversidade de sítios anatômicos. Porém, as principais causas etiológicas do CECP são o etilismo e o tabagismo, sendo a ocorrência dessa neoplasia mais frequente em pessoas que fazem o uso concomitante de ambos os fatores. O uso do tabaco expõe o usuário a uma série de metabólitos carcinogênicos. Além disso, variações genéticas individuais, como determinados polimorfismos em genes que codificam enzimas metabolizadoras destes carcinógenos, como o citocromo P-450 e a enzima GST (Glutathione S-Transferase) podem explicar a influência do tabaco no processo carcinogênico (COLOMBO et al., 2009; PICCININ et al., 1998; BRAKENHOFF, 2011; WARNAKULASURIYA et al., 2012; SINHA et al., 2013; REIBEL et al., 2003).

Existem também, cofatores que podem contribuir para o desenvolvimento dos tumores, como poluição ambiental, condições variadas de trabalho, infecção por vírus como o HPV (papiloma Vírus Humano) e EBV (Epstein Bar Vírus) e má alimentação com pouca ingestão de frutas e vegetais (COLOMBO et al., 2009; PICCININ et al., 1998; BRAKENHOFF et al., 2011; WARNAKULASURIYA et al., 2012; SINHA et al., 2013; PETERS et al., 2013; NELKE et al., 2013).

O estudo de Papagerakis et al (2013) revela que a perda da função dos genes ligados ao ciclo circadiano pode levar a dano no DNA e conseqüentemente levar ao desenvolvimento do câncer. Alterações de metilação destes também estão relacionadas com a progressão tumoral.

Segundo a estimativa do INCA para o ano de 2014, estima-se que o Brasil terá 576 mil novos casos de cânceres, sendo aproximadamente 190 mil casos em mulheres e 204 mil casos em homens. Para o câncer oral, estima-se que 11.280 homens e 4.010 mulheres sejam afetadas. Já para o câncer de laringe essa incidência diminui, estimando-se que 6.870 homens e 770 mulheres sejam acometidos pela doença. Para o estado do Espírito Santo estima-se 400 novos casos de câncer oral e 170 casos de câncer de laringe (INCA, 2014).

Um dos principais desafios é a detecção precoce do câncer, o que pode auxiliar no tratamento da doença. Diante disso, diversos estudos recentes têm demonstrado a importância da utilização de marcadores genéticos para diagnóstico e prognóstico de neoplasias.

Atualmente tem-se apostado no estudo de Genes de Reparo que estão altamente ligados à estabilidade genômica e conseqüentemente ao normal funcionamento do ciclo celular, evitando a carcinogênese. Além disso, tais genes podem auxiliar na melhor resposta do paciente ao tratamento.

O tratamento varia de acordo com o estágio da doença, sendo que tumores diagnosticados em estágio iniciais são tratados com cirurgia ou radioterapia, enquanto que tumores em estádios III e IV necessitam de um tratamento multimodal. Cerca de 2/3 com diagnóstico de CCEP são descobertos já em estágio avançado com linfonodos regionais acometidos. A metástase à distância acomete

aproximadamente 10% dos pacientes, o que diminui muito a sobrevida destes pacientes (GALBIATTI et al., 2012). A utilização da radioterapia é importante pois auxilia na regressão tumoral e aumenta a taxa de sobrevida livre de doença quando comparado apenas a cirurgia (KO et al., 2009).

Os efeitos da radioterapia e da quimioterapia são diversos como dor, mucosite, xerostomia, dificuldade na fala, saliva pegajosa, depressão e principalmente dificuldade para comer, o que leva a desnutrição (MOORE et al., 2013).

1.1.3 Prognóstico do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

Diversos fatores prognósticos podem influenciar na sobrevida de CECP, como grupo étnico, estágio tumoral no diagnóstico, sexo, idade, sítio anatômico, tipo morfológico e a terapia utilizada.

No estágio inicial da doença, os pacientes são tratados com cirurgia e/ ou radioterapia, porém 15 a 25% dos casos apresentam um segundo tumor primário em um período de 5 anos e 10% apresentam recorrência loco-regional neste período, comprometendo a sobrevivência a longo prazo do paciente (CHAWAPUN et al., 2006).

Além disso, o tratamento unimodal não apresenta alta eficiência em casos de tumores em estágios avançados e em alguns casos, o paciente não responde bem a primeira modalidade terapêutica, gerando recidivas e a necessidade de tratamentos multimodais (LI et al., 2013). Porém tratamentos multimodais podem aumentar a toxicidade para o paciente (CHAWAPUN, 2006; KO et al., 2009; LEE et al., 2011).

O estágio I e II da doença acometem 30 a 40% dos casos, com um longo tempo de sobrevida livre de doença variando de 60 a 90% dos casos. Já o restante dos casos,

que correspondem a tumores em estádios mais avançados (III e IV), 40 a 50% dos casos tem uma sobrevida de 5 anos. Pacientes com tumores localmente avançados e irresssecáveis tem um prognóstico pobre, com uma sobrevida livre de doença de 5 anos em apenas 10 a 40% dos pacientes (KO et al., 2009).

O prognóstico atual do câncer oral é de que 50% dos pacientes morram de complicações da doença em período de tempo que varia de poucos meses até 3-5 anos. Estas taxas podem ser atribuídas ao atraso no diagnóstico da doença (KRISHNA PRASAD et al., 2013; SINHA et al., 2013).

Diferentes tipos de cânceres respondem de formas diferentes ao tratamento, por isso é importante entender os mecanismos envolvidos na sensibilidade a radiação (CHAWPUN et al., 2006). Estudos recentes na área de genômica direcionam os tratamentos para uma medicina individualizada com o intuito de melhorar os resultados dos tratamentos indicados.

O tratamento do CECP ainda é bastante controverso, principalmente porque ainda não são usados marcadores biológicos para ajudar na definição do melhor tratamento a ser utilizado, o que muitas vezes pode reduzir a sobrevida do paciente em casos de recorrência (SILVA et al., 2007).

1.1.4 Mecanismos de reparo de DNA

Diversos estudos demonstram que polimorfismos em genes de reparo podem influenciar a atividade enzimática, a capacidade de reparo de danos ao DNA, e levar a instabilidade genômica. Acredita-se ainda, que determinados polimorfismos possam influenciar na resposta a tratamento quimioterápicos e na radiosensibilidade (ROHR et al., 2008; GOODE et al., 2008).

Durante o processo de crescimento e desenvolvimento celular, a célula pode passar por processos que levam a danos em seu DNA, muitos dos quais podem ou não ser corrigidos, dependendo do momento e em qual situação ocorrem. Diversos fatores podem causar estes danos, como radiação ultravioleta e ionizante, calor, dano oxidativo, substâncias químicas como fumaça de cigarro, metabólitos tóxicos do álcool, entre outros (BOHRER, 2009).

Se determinados danos no DNA forem reconhecidos pela maquinaria da célula, diversas respostas podem ser ativadas para evitar que a célula se replique mesmo na presença de erros genéticos. Pode ocorrer a ativação de checkpoints para parar o ciclo celular, modificação da transcrição gênica ou até mesmo a apoptose (GOODE et al., 2002).

Porém, em outros casos, o que ocorre é a reparação do DNA permitindo a replicação celular e a integridade e estabilidade do genoma. Existem até hoje bem conhecidas, 5 vias que podem ser ativadas para garantir este processo de reparo, dependendo de cada situação específica e o tipo de erro que ocorreu (GOODE et al., 2002; BOHRER, 2009).

1.1.4.1 Reversão direta do DNA danificado

Neste tipo de reparo o erro é revertido diretamente, para haver a regeneração da base alterada. Um caso bastante comum deste tipo de reversão é quando existe a formação de um fotodímero mutagênico causado por luz UV. Neste caso é formado um dímero chamado de ciclobutano (CPD) que pode ser corrigido pela enzima CPD fotoliase, onde a enzima irá se ligar ao dímero e por um processo de fotorreativação irá dividi-lo e regenerar as bases originais (GRIFFITHS et al., 2008).

Existe também um outro grupo de enzima capaz de reparar este tipo de lesão, as alquiltransferases. As enzimas desta família atuam removendo grupos alquila, quando são adicionados a guanina por mutágenos, porém este mecanismo ainda não é bem entendido (GRIFFITHS et al., 2008).

1.1.4.2 BER (*Base Excision Repair*)

Este mecanismo de reparo opera em pequenas lesões com bases oxidadas ou reduzidas, fragmentos ou adutos não volumosos, ou aqueles produzidos por agentes de metilação, atuando principalmente por modificações causadas por agentes endógenos (BERRA et al., 2006).

Uma única base danificada é removida por DNA glicosilase de base-específica (por exemplo, a base oxidada 8-oxoguanina é excisada por 8-oxoguanina DNA glicosilase) que corta ligações base-açúcar, liberando as bases alteradas. Após a excisão é formado um sítio abásico ou sítio AP (apurinico ou apirimidico). O sítio sem base é reconhecido pela enzima AP endonuclease que se liga ao local cortando e removendo a base danificada. Logo após, ocorre a remoção do resíduo de desoxirribose da ponta 3'OH para posterior síntese do DNA usando a outra cadeia como molde, finalizando o processo através da DNA ligase. A via longa de BER ocorre de forma semelhante, porém ao invés de haver a excisão de uma única base, ocorre a retirada de 2 a 13 bases (JANION et al., 2001; GOODE et al., 2002; AU et al., 2004; BERRA et al., 2006; ROHR, 2008; BOHRER, 2009; GRIFITTHS et al., 2008; ALBERTS et al., 2010). A figura 1 traz a representação de simplificada de como ocorre o processo.

Diversos genes estão correlacionados com este processo, entre os quais está o gene XRCC1, na qual a proteína produzida estimula a ação da endonuclease (após

o processo de excisão) atuando na restauração do sítio danificado. Dois polimorfismos em específico, localizados nos códons 194 e 399, tem sido amplamente estudados por resultarem em proteínas com maior e menor eficiência de reparo, respectivamente.

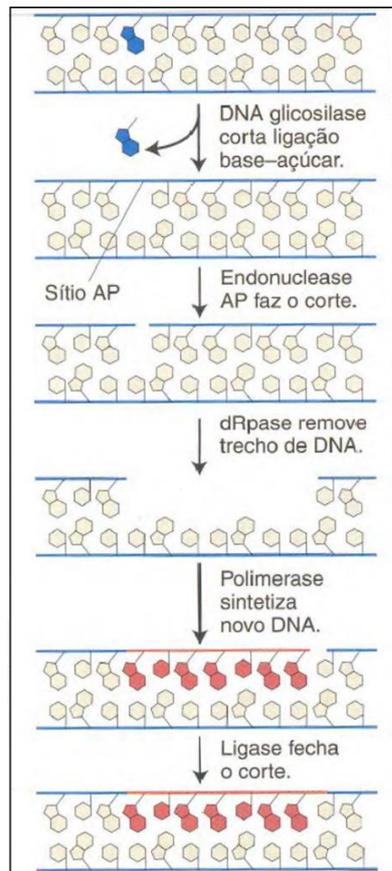


Figura 1: Esquema representativo da via de BER. A correção da via de ocorre através da remoção de uma única base pela DNA glicosilase. Após a excisão é formado um sítio abásico que será reconhecido pela enzima AP endonuclease que se liga ao local cortando e removendo a base danificada. Logo após, ocorre a remoção do resíduo de desoxirribose da ponta 3'OH para posterior síntese do DNA usando a outra cadeia como molde, finalizando o processo através da DNA ligase. Fonte: Griffiths et al., (2009).

1.1.4.3 NER (Nucleotide Excision Repair)

Esta via repara lesões volumosas como dímeros de pirimidina, lesões causadas por radiação ultra violeta, grandes adutos químicos e ligações cruzadas, atuando principalmente em danos causados por agentes exógenos. Este mecanismo é considerado um dos mais importantes processos de reparo da célula (JANION, 2001; GOODE et al., 2002; BERRA et al., 2006; ALBERTS et al., 2010; SMITH, 2008).

De uma forma geral, esta via envolve 4 etapas:

- i) Reconhecimento do dano por um complexo de proteínas incluindo o XPC;
- ii) Desenrolamento do DNA pelo complexo TFIIH que inclui XPD com diversas subunidades que atuarão como helicases e outras proteínas com a RPA que servirá para manter a estabilidade da estrutura;
- iii) Remoção do fragmento de fita simples danificado, sendo geralmente um fragmento de 27-30 pb, ou seja, maior do que a área do dano, sendo que o corte ocorre tanto nas pontas 3' e 5', por moléculas incluindo ERCC1 e XPF e
- iv) Síntese pela DNA polimerase utilizando a fita não danificada como molde e por fim a ligação da porção 5' da fita recém sintetizada à porção já existente, feita pela DNA ligase (GOODE et al., 2002; SMITH, 2008; BERRA et al., 2006).

Esta via de reparo é subdividida em duas. A primeira é o reparo acoplado a transcrição (TCR) que remove lesões presentes em genes ativos e o outro é o reparo genômico global (GGR), que remove lesões no DNA nuclear como um todo.

A diferença entre estas subvias está na sua iniciação. Para o TCR são utilizadas as enzimas CSB e CSA, as quais possuem papel exato ainda desconhecidos. Já para o GGR são utilizados os complexos de iniciação XPC-hHR23B, DDB1 e DDB2, que

irão distinguir os sítios que contém as lesões. As demais etapas são semelhantes em ambas as vias, como pode ser observado na figura 2.

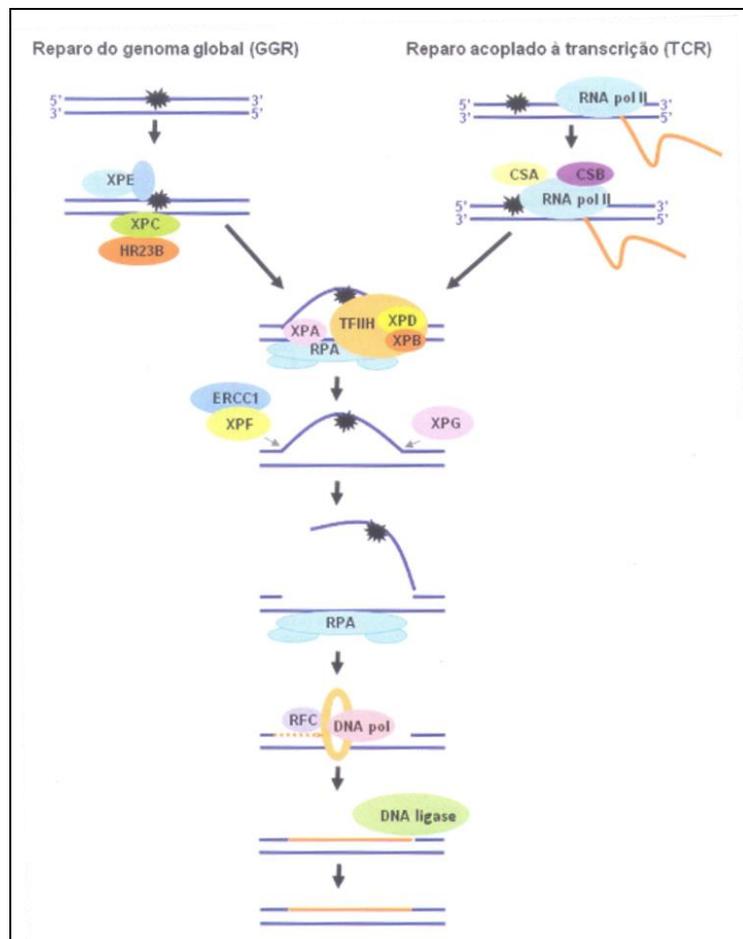


Figura 2: Via de NER- TCR e GGR. O reparo se inicia através do reconhecimento do dano por um complexo proteico e o desenrolamento do DNA. Em seguida, ocorre a remoção do fragmento de fita simples danificado para posterior síntese do mesmo, utilizando a fita não danificada como molde e finalizando com a ligação dos fragmentos pela DNA ligase. Fonte: Ferreira et al., (2010).

1.1.4.4 Reparo de quebras duplas no DNA:

Via de Recombinação Não-Homóloga:

A primeira etapa da via é o reconhecimento do erro. Para isso há a ligação de duas proteínas Ku70 e Ku80 no local da quebra, formando um heterodímero, com duas

funções principais: impedir outros danos e recrutar outro complexo chamado de DNA-PKcs, que apara as pontas do filamento para gerar as pontas 5'-P e 3'-OH, necessárias para a união das pontas. Além disso, será ativado também o complexo proteico XRCC4- ligase IV, que fará a junção das duas pontas (GRIFFITHS et al., 2008; BOHRER, 2009).

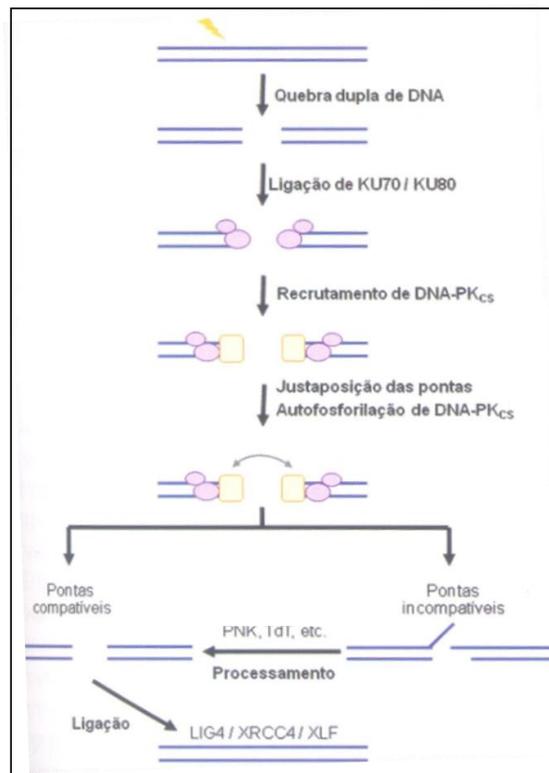


Figura 3: Via de Recombinação de quebra dupla de DNA: Recombinação não homóloga. A via se baseia basicamente em reconhecer o erro e a ligação de um complexo para fazer a ligação da dupla fita que sofreu a quebra, refazendo a junção das duas pontas. Fonte: Ferreira et al., (2010).

Via de Recombinação Homóloga: Diferentemente da recombinação não homóloga, este tipo de recombinação utiliza uma fita como molde, portanto a possibilidade de haver erros no local do reparo é reduzida. Esta via conta com a participação das proteínas da família RAD, que serão as principais responsáveis pelo processo de correção. O processo ocorre no final da fase S até G2 (BOHRER, 2009).

Este mecanismo é também chamado de helicoidização de filamento dependente de síntese. Ele utiliza cromátides irmãs disponíveis na mitose como moldes, para garantir o reparo. A primeira etapa é a ligação das pontas quebradas por um complexo proteico onde ocorre também o apareamento das pontas 5' para expor as regiões unifilamentares e o posterior revestimento destas regiões pela proteína RAD51. Este novo filamento formado de DNA-RAD51, invade o filamento da cromátide irmã em um tipo de cross over, formando a chamada alça D. A ponta 3' do filamento que está invadindo vai deslocar uma das cromátides não danificadas, iniciando assim uma nova síntese de DNA a partir da ponta 3' livre. A síntese irá continuar até que os filamentos se desenrolem dos moldes e se helicoidizem, a ligação fechará os cortes, terminando assim o processo (figura 4) (GRIFFITHS et al., 2008; GOODE et al., 2002).

Esta via envolve diversas famílias gênicas, entre as mais estudadas estão a RAD e a XRCC3, sendo que estas proteínas interagem diretamente neste processo de reparo (GOODE et al., 2002).

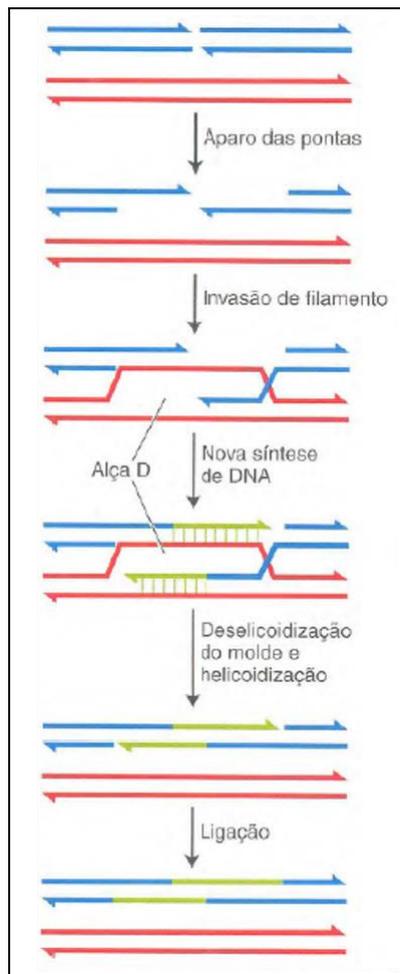


Figura 4: Via de recombinação de quebra dupla de DNA: Recombinação homóloga. A primeira etapa da via é a ligação das pontas quebradas por um complexo proteico. Este novo filamento formado de DNA e complexo proteico invade o filamento da cromátide irmã em um tipo de cross over, formando uma alça, invadindo a cromátide não danificada iniciando a síntese da nova fita, processo este que irá ocorrer até o fechamento completo dos cortes terminando o processo. Fonte: Griffiths et al., (2009).

1.1.4.5 MMR (Mismatch Repair):

A maioria do conhecimento que se tem desta via é a partir de estudos com *E. coli*. Porém, estudos recentes têm permitindo um avanço no entendimento destes mecanismos. E o principal motivo deste avanço é a ligação deste sistema de reparo,

com doenças humanas, já que defeitos nesta comumente levam a instabilidade de microssatélites e a presença de diversos polimorfismos, o que pode levar ao surgimento de câncer, dentre os mais conhecidos, o câncer colorretal e de mama (AQUILINA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2009; ROHR, 2008; PONTES et al., 2005).

O sistema de reparo de mismatch ou reparo de mal pareamento, tem como principal função corrigir erros de replicação causados pela DNA polimerase, elevando a fidelidade do processo e garantindo a manutenção da estabilidade genômica por remover erros de replicação do DNA. (AQUILINA et al., 2001; ROHR, 2008).

O sinal iniciador para o processo de correção, em *Escherichia Coli*, se dá pela ausência de metilação na posição N6 da adenina nos sítios dGATC da fita recém sintetizada. Existe ainda, a presença de estruturas em forma de “gaps” na cadeia não metilada, que auxilia no direcionamento da reação, porém em eucariotos, estes não tem uma função tão exata e bem definida como em procariotos. (OLIVEIRA et al., 2009)

Assim, o sistema de MMR tem que ser capaz de reconhecer a fita recém sintetizada, encontrar e corrigir o erro. O reparo se inicia com a ligação de um homodímero chamado de MutS nos nucleotídeos que foram adicionados incorretamente, seguido pela ligação de um segundo homodímero, o MutL (as funções destas proteínas são semelhantes em células de mamíferos). Em seguida, são formados dois grandes complexos por proteínas homólogas ao MutS, chamadas de hMutS α (que em eucariotos são formados pelas proteínas MSH2 e MSH6), que tem como função reconhecer pequenos mismatches e pequenos erros de inserção e deleção, e hMutS β (em eucariotos, MSH2 e MSH3) que reconhece erros de tamanhos mais expressivos. Estes complexos se ligarão ao MutL α para de fato realizar a correção dos mismatches, que irá depender da presença de ATP. (OLIVEIRA et al., 2009; PONTES et al., 2004)

Haverá também a ativação da proteína UvrD (com atividade de helicase) e a endonuclease MutH, que é a principal responsável pela clivagem da cadeia que necessita de reparo, que conseqüentemente irá iniciar os mecanismos de reparo, substituindo os nucleotídeos adicionados incorretamente.

É importante destacar, que o complexo enzimático tem a função de reconhecer os erros na fita recém-sintetizada. Tal processo só é possível devido ao processo de metilação nas bases citosina que ocorre logo após o processo de replicação do DNA, sendo assim, é importante que a correção aconteça antes que a fita recém sintetizada seja metilada, para permitir sua identificação.

A metilação ocorre no sítio 5'-GATC- 3' e é no "A" que a enzima MutH irá realizar a clivagem, mesmo que este encontre-se centenas de pares de base antes do sítio que necessita de correção. A enzima com atividade de helicase fará o desenrolamento da fita até chegar ao local da excisão. A figura 5 traz um esquema representativo de como ocorre este processo (GRIFFITHS et al., 2008).

Em eucariotos, até o momento, está descrito um mecanismo principal e mais simples pelo qual ocorre a correção dos mismatches. Este mecanismo requer a participação dos complexos proteicos MutS α , MutL α , Exo1, RPA e ATP. O complexo proteico de MutS α irá ativar a enzima Exo1, o que fará a hidrólise da região 5' no erro encontrado no DNA. Em seguida, o complexo formado irá fazer a hidrólise dos nucleotídeos, podendo remover aproximadamente 2000 nucleotídeos. A enzima RPA atua diminuindo a capacidade de excisão do complexo para aproximadamente 250 nucleotídeos. Já o complexo MutL α atua na finalização na excisão tanto suprimindo a RPA como atuando em conjunto com a mesma. Tem sido demonstrado ainda, que a fosforilação é um método eficiente para reduzir a afinidade da molécula de RPA pelo DNA, o que conseqüentemente irá diminuir a excisão dos nucleotídeos e estimular a síntese da nova cadeia de DNA. (OLIVEIRA et al., 2009).

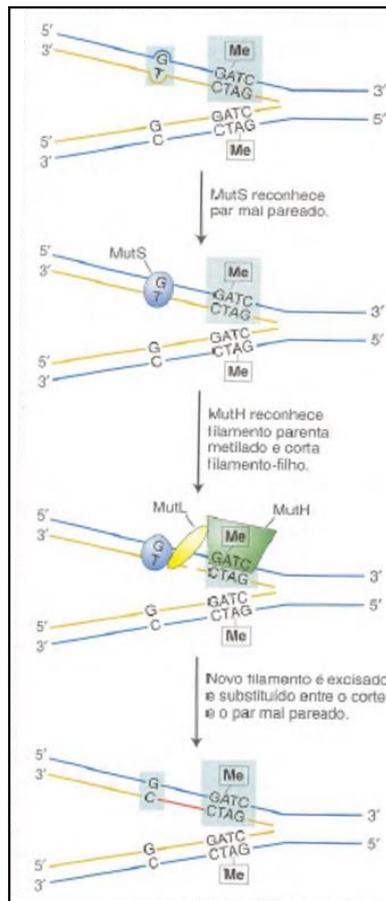


Figura 5: Via de Mismatch Repair. Para o início da ativação da via, haverá a ativação de complexos proteicos com atividade de helicase para posterior clivagem, iniciando de fato o reparo com a substituição dos nucleotídeos que foram adicionados incorretamente. Fonte: Griffiths et al., (2009).

1.1.5 Genes de reparo do DNA

O gene XRCC1 (*X-Ray Repair Cross-Complementing Group 1*) está localizado no cromossomo 19q13.2 e contém 17 éxons que codificam 633 aminoácidos (KUMAR et al., 2012). Sua principal função é na via de reparo de BER, com o reparo de quebras de fita simples. Sua atividade se dá pela interação com outras proteínas como a poli (ADP-Ribose) polimerase (PARP), DNA polimerase β e a ligase III (AU et al., 2004; KUMAR et al., 2012).

Existem descritos para este gene 200 polimorfismos, dentre os mais estudados estão os polimorfismos Arg280His, Arg194Trp e Arg399Gln, sendo que os dois últimos estão sendo estudados neste trabalho (WANG et al., 2013). O polimorfismo Arg399Gln é o que tem sido mais amplamente estudado. Muitos estudos tem relatado sua associação com o risco de diversos cânceres (AU et al., 2004; STURGIS et al., 1999; YIN et al., 2009).

O polimorfismo XRCC1 Arg399Gln (rs1799782) é causado por uma substituição de uma arginina por um glutamina na posição 399 do éxon 10, que é um resíduo conservado de domínio de ligação da poli (ADP-Ribose) polimerase (PRAMANIK et al., 2011; OLSHAN et al., 2002).

O polimorfismo XRCC1 Arg194Trp (rs1799782) ocorre devido a uma substituição de arginina por um triptofano no éxon 6 do gene. (RAMACHADRAN et al, 2006). Não se conhece bem por qual mecanismo que este polimorfismo irá agir no sistema de reparo. Porém, o estudo de Hu et al (2008) revelou que o polimorfismo Arg194Trp está relacionado a uma diminuição de risco de câncer. O grupo de pesquisa de Au et al (2004) vem tentando elucidar por qual mecanismo que este polimorfismo atua no processo de reparo.

O gene XPC (*Xeroderma Pigmentosum Group C*) está localizado no cromossomo 3p25.1 e faz parte da via de NER, codificando parte do complexo de XPC-HR23B, que tem o papel de detectar o erros do DNA. As proteínas codificadas pelo gene XPC funcionam como um sensor de danos e recrutam outros fatores do complexo da via de NER. Acredita-se que estas proteínas tenham maior afinidade por danos causados por luz UV (WANG et al., 2013).

Para o gene XPC existem descritos até o momento 692 polimorfismos, sendo PAT, Ala499Val e Lys939Gln os mais estudados (WANG et al., 2013). O polimorfismo XPC Lys939Gln (rs2228001) se dá por uma substituição de uma lisina por uma glutamina na posição 939 do éxon 15 (JI et al., 2012). O estudo de Wang et al (2013) traz que os polimorfismos PAT e Ala499Val estão diretamente relacionados com uma diminuição na capacidade de reparo.

O gene ERCC1 (*Excision Repair Cross Complementing-Group 1*) também atua na via do NER, tendo um papel crítico na estabilidade genômica. O gene está localizado no cromossomo 19q13.2-q13.3 e possui 10 éxons (LIMA et al., 2012).

A proteína ERCC1 tem a função de posicionar a endonuclease XPC que irá catalisar a incisão do DNA na porção 5' da fita lesionada. A proteína possui um domínio central com sítios de ligação para o DNA de fita simples e de fita dupla e um sítio de ligação para a proteína XPA, responsável pela ligação entre a maquinaria de reparo e a proteína XPF. Acredita-se que ERCC1 atue não apenas em NER mas também no mecanismo de reparo de recombinação homóloga e não homóloga (LIMA et al., 2012).

Para este gene, existem descritos 437 polimorfismos, sendo que os mais estudados são os Asn118Asn, IVS5+33C>A e 8092C>A (WANG et al., 2013). Diversos SNPs deste gene foram descritos como aumentando suscetibilidade à carcinogênese.

No polimorfismo ERCC1 Asn118Asn (rs11615) não ocorre substituição de aminoácidos, ocorrendo apenas a alteração de uma timina por uma citosina na posição 118 do éxon 4 (YIN et al, 2009). Alguns estudos demonstram que o polimorfismo Asn118Asn apresenta baixa penetrância para a carcinogênese e ainda não se conhece seu mecanismo de ação, o que se sabe é que apesar de não modificar a sequência de aminoácidos, o alelo T está associado com menores níveis de mRNA e consequente menores níveis de proteína (VAEZI et al., 2011).

O gene XRCC3 (*X-Ray Repair Cross-Complementing Group 3*) está localizado no cromossomo 14q32.33 e faz parte da via de recombinação homóloga. Para o gene XRCC3 foram descritos 438 polimorfismos, sendo que o mais estudado é o Thr241Met (WANG et al., 2013). O polimorfismo XRCC3 Thr241Met (rs861539) é causado por uma substituição de uma treonina por uma metionina na posição 241 do éxon 8, e o polimorfismo não está no sítio de ligação de ATP, que é o único sítio funcional da proteína.

Células deficientes na proteína XRCC3 apresentam uma redução na capacidade de reparo por recombinação homóloga. Mutações no gene XRCC3 causam instabilidades cromossômicas severas. O polimorfismo XRCC4 241Met está

relacionado a um aumento significativo de deleções cromossômicas em células sob Raios-X. Foi identificado que o genótipo variante não tem efeito sobre o reparo do dano induzido por luz UV quando comparado com o genótipo selvagem (AU et al, 2004).

A proteína RAD51 está envolvida na via de reparo por recombinação homóloga e auxilia na manutenção na estabilidade cromossômica, apresentando atividade de ATPase. Seu gene se localiza no cromossomo 15q15.1 é uma proteína homóloga à RecA de *E. coli* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5888>; <http://www.uniprot.org/uniprot/Q06609>).

Para o gene RAD51, existem descritos 737 polimorfismos, sendo que -98G>C e 172G>T são os mais comumente estudados (WANG et al., 2013). O gene RAD51 está associado aos genes BRCA1 e BRCA2 que são genes supressores tumorais, sugerindo que um defeito na recombinação pode levar ao desenvolvimento tumoral. O polimorfismo RAD51 -98G>C (rs1801320), também chamado de RAD51 135G/C se dá por uma substituição de guanina por uma citosina a 98 pares de base antes do promotor no éxon 1 e seu mecanismo de ação ainda permanece bastante obscuro.

1.1.6 Ação da radioterapia

A radioterapia tem sido usada como um dos tratamentos mais eficazes para o tratamento do câncer. Seu funcionamento se baseia na indução de radiação ionizante baseada em raios X de alta energia. Ela age de forma a atingir um determinado volume tumoral para erradicar o tumor e danificar minimamente os tecidos normais (RUYCK, 2007).

A ação da radiação ionizante sobre as células pode ser direta ou indireta, dependendo da interação com o ambiente celular. O efeito direto é aquele em que a

radiação irá agir diretamente sobre o próprio DNA gerando a quebra da dupla fita. Já a ação indireta é aquela em que a radiação interage com moléculas de água gerando outros intermediários como as espécies reativas de oxigênio, onde estas serão responsáveis por 70% do dano causado ao DNA. Sendo assim, o principal dano causado pela radiação é o dano ao DNA que na maioria das vezes, levará a morte celular, dependendo da intensidade do tratamento (RUICK, 2007; LIMA, 2011).

Apesar da radiação na maioria das vezes levar à morte, os danos causados ao DNA tendem a ser corrigidos para evitar que a célula não seja levada à apoptose ou à necrose e diversas cascatas são ativadas com o intuito de controle do ciclo celular, reparo aos danos causados ao DNA, apoptose e outros (RUICK, 2007).

Após o início do tratamento, os processos patológicos logo começam a ser sentidos, porém os efeitos clínicos e patológicos podem demorar muito tempo a aparecer. A resposta aguda à radioterapia, ocorre em tecidos de rápida proliferação, como tecidos epiteliais e medula óssea, levando a resposta inflamatória e ao aparecimento de edemas e eritemas na pele (KO et al., 2009).

Os efeitos tardios podem levar até anos para aparecer e ocorrem em tecidos de proliferação lenta, como músculo, rim e fígado. Estes efeitos podem trazer graves consequências aos pacientes, visto que muitas vezes deixam sequelas intratáveis

Após a radioterapia, diversos fatores estão relacionados a resposta obtida pelo paciente. Em diversos casos, existe a necessidade do tratamento cirúrgico e o aparecimento de comorbidades, como hipertensão e diabetes, que podem estar associados ao estilo de vida e fatores genéticos. Existem ainda, pacientes que apresentam uma hiper-radiossensibilidade, o que acredita-se estar também relacionado a fatores genéticos.

A resposta tumoral à radiação é medida principalmente pela regressão do tumor e hipóxia, além de respostas inflamatórias angiogênicas dentro do microambiente tumoral (TADDEI et al., 2013).

A resposta do tumor primário do CECF à radioterapia pode ser afetada pelo sítio anatômico, classificação TNM e gênero do paciente. (HUANG et al., 2013).

A radiação gera radicais livres altamente reativos com o DNA, processo que é melhorado na presença de altas taxas de oxigênio, o que indica que tumores hipóxicos têm respostas menos eficazes em termos de controle loco regional e sobrevida. Para tanto, tem sido desenvolvidas técnicas para medir e identificar tumores hipóxicos com o intuito de melhorar o tratamento. Diversos marcadores já foram identificados como a proteína HIF1 α . Com isso, a principal intenção é identificar os pacientes em que a hipóxia pode ser modificada e melhorar o tratamento nestes pacientes. Tem sido indicado até mesmo o controle da anemia, visto que estudos recentes indicam que baixas taxas de hemoglobina são indicadores de mau prognóstico após a radioterapia (SILVA et al, 2007).

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os polimorfismos de genes de reparo de DNA XRCC1 Arg194Trp (rs1799782), XRCC1 Arg399Gln (rs25487), XRCC3 Thr241Met (rs861539), XPC Lys939Gln (rs2228001), ERCC1 Asn118Asn (rs11615) e RAD51 -98G>C (rs1801320) em relação ao prognóstico de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, segundo a modalidade terapêutica

2.2 Objetivos Específicos

- Correlacionar os diferentes genótipos dos polimorfismos estudados com o prognóstico dos pacientes, segundo a ocorrência de recidiva local, óbito e sobrevidas livre de doença local e doença específica nos casos de carcinoma epidermóide oral e de orofaringe e separadamente de laringe, segundo a modalidade terapêutica.
- Avaliar os diferentes resultados relacionados a radiosensibilidade tumoral entre os tumores de cavidade oral, orofaringe e laringe.

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações éticas

O material utilizado para a realização do estudo foi coletado após entrevista e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O DNA extraído das amostras de sangue coletadas são responsabilidade do Dr. Marcos Brasilino de Carvalho - Coordenador de Grupo no Projeto Genoma do Hospital Heliópolis – e da Dra. Eloíza Helena Tajara da Silva - Coordenadora do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço. Todos os dados clínicos obtidos e as informações contidas nos prontuários são mantidas em sigilo, garantindo assim a confidencialidade das informações. O Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço (projeto mestre, do qual esta dissertação faz parte) foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sob protocolo o nº 135, conforme anexo 1.

3.2 Casuística

Para avaliar os polimorfismos selecionados, foram estudados 311 pacientes com CECP tratados no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis entre o período de 2001 a 2011. Entre estes, 151 pacientes foram operados e irradiados e 160 foram apenas operados.

Os casos incluídos no estudo se restringem aos carcinomas epidermóides de cavidade oral, orofaringe e laringe. Todos os casos possuem confirmação histológica do diagnóstico oncológico e não haviam sido previamente submetidos a qualquer forma de tratamento para a doença em questão. Os casos com diagnóstico de metástase à distância foram excluídos do presente estudo.

O acompanhamento dos pacientes foi feito por uma equipe multidisciplinar de acordo com a rotina estabelecida no serviço do hospital, garantindo um seguimento mínimo de 24 meses após o tratamento inicial. Os registros incluem informações epidemiológicas abrangentes quanto aos fatores de risco relacionados à doença.

Os critérios utilizados para o diagnóstico da doença primária incluem a suspeita clínica através de anamnese e exame físico, e posterior confirmação com exame histopatológico do produto de biópsia.

A suspeita clínica para metástase cervical (N+) inclui exame físico e radiológico confirmados pela análise histológica do esvaziamento cervical. Em alguns casos foi utilizada a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) para coleta de material e análise citológica.

O grupo de 311 casos que foram analisados é composto por 40 indivíduos do gênero feminino (12,9%) e 271 indivíduos do gênero masculino (87,1%). Destes, 7 possuem idade inferior aos 40 anos (2,3%), 70 indivíduos possuem idade entre 41 e 50 anos (22,5%), 123 indivíduos com idade entre 51 a 60 anos (39,5%), 82 indivíduos com idade entre 61 e 70 anos (26,4%) e 29 indivíduos com mais de 70 anos de idade (9,3%).

Quanto ao hábito tabagista, foram considerados não tabagistas, os pacientes que nunca fumaram ou pararam de fumar a mais de um ano, característica esta, representada por 28% dos pacientes (87 indivíduos) e o grupo de fumantes é composto por 224 pacientes (72%). Já o hábito etilista, apresentou uma frequência de 49,5% de pacientes etilistas (154 indivíduos) e 50,5% de pacientes não etilistas (157 indivíduos) (tabela 1).

Tabela 1: Características epidemiológicas dos pacientes diagnosticados com CECP

Características epidemiológicas	Total		Sítio			
			Oral, orofaringe		Laringe	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
Gênero						
Feminino	40	12,9	31	14,8	9	8,9
Masculino	271	87,1	179	85,2	92	91,1
Faixa etária, anos						
≤ 40	7	2,3	6	2,9	1	1,0
41 - 50	70	22,5	47	22,4	23	22,8
51 - 60	123	39,5	84	40,0	39	38,6
61 - 70	82	26,4	53	25,2	29	28,7
> 70	29	9,3	20	9,5	9	8,9
Tabagismo						
Não	87	28,0	58	27,6	29	28,7
Sim	224	72,0	152	72,4	72	71,3
Etilismo						
Não	157	50,5	103	49,0	54	53,5
Sim	154	49,5	107	51,0	47	46,5
Total	311	100,0	210	67,5	101	32,5

Durantes as análises, a cavidade oral e orofaringe foram combinados em um único grupo por apresentarem características histopatológicas semelhantes, e por apresentarem características semelhantes quanto ao tratamento aplicado. Sendo assim, foram analisadas 210 amostras da cavidade oral e orofaringe e 101 amostras da laringe, como pode ser observado na tabela 1.

3.3 Extração de DNA de sangue periférico

Para a extração do DNA de sangue periférico foi utilizada a metodologia de extração por sal, na qual o sangue coletado foi misturado a 25 ml da Solução Tampão 1,

composta por 1550mM Cloreto de Amônio (82,91g), 100mM Carbonato ácido de Potássio (10,01g), 10mM EDTA, pH: 7,4 (50ml de EDTA 0,2 M. pH: 7,4) e quantidade suficiente para 1000ml de água Milli-Q.

Em seguida, o material foi homogeneizado por inversão e mantido no gelo por 30 minutos. Após esse período, foi centrifugado por 15 minutos a 1800 rpm a 4°C e o sobrenadante descartado. Ao pellet formado, foi adicionado 5 ml da Solução Tampão 1 e centrifugado por 5 minutos a 1800 rpm a 4°C.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido através de agitação em 3 ml da Solução Tampão 2, composta por 100 mM Tris-HCl, pH: 8,0 (10 ml Tris 1M, pH: 8,0), 4 M NaCl (23,38 g), EDTA (10ml EDTA 0,2 M; pH: 8,2) e quantidade suficiente para 1000 ml de Água Milli-Q. Em seguida, adicionou-se junto à solução, 10 µL de proteinase-K e posteriormente 300µL de SDS 10%. Em seguida, a solução foi incubada a 37°C por 16 horas.

Após o período de repouso, foi adicionado 1 ml de NaCl saturado (6 M) e homogeneizado vigorosamente por 15 segundos (vórtex), e centrifugado em seguida por 20 minutos a 3000 rpm. Após esse período, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde o DNA foi precipitado e adicionado 2 volumes de etanol absoluto em temperatura ambiente. O DNA precipitado foi içado e passado no etanol 70% em temperatura ambiente.

Posteriormente, o DNA foi dissolvido em um tubo contendo 800 µL de TE – composto por 10 mM Tris (1 ml Tris 1 M, pH: 7,5), 1 mM EDTA (0,5 ml EDTA 0,2 M; pH: 7,4) e quantidade suficiente para 1000 ml de água Milli-Q – e incubado a 65°C por 30 minutos e posteriormente armazenado em congelador -20°C.

3.4 Escolha das regiões e Técnica de PCR-RFLP

A escolha das regiões se deu principalmente pela influência dos genes de reparo no processo carcinogênico e sua possível relação com a radioterapia. Os polimorfismos escolhidos XRCC1 Arg194Trp (rs1799782), XRCC1 Arg399Gln (rs25487), XRCC3 Thr241Met (rs861539), XPC Lys939Gln (rs2228001), ERCC1 Asn118Asn (rs11615) e RAD51 -98G>C (rs1801320), fazem parte das principais vias de reparo de DNA, o que permite a ampla visão de como o sistema de reparo pode influenciar o prognóstico e o tratamento radioterápico dos pacientes com CECP.

A amplificação das regiões de interesse foi realizada através de técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction*), no termociclador Veriti® Thermal Cycler da Applied Biosystems. A técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição, revela polimorfismos devido à presença ou ausência de sítios de restrição, que são identificados com a utilização de enzimas de restrição.

A tabela 2 descreve a sequência dos *primers* utilizados na reação de PCR e os fragmentos gerados após a reação de PCR.

Após a padronização da técnica de PCR, foram alcançadas as condições físicas e químicas ideais para a realização da técnica. As mesmas estão representadas nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 4: Condições Químicas da Reação de PCR

Condições Químicas	
Taq Platinum DNA Polimerase	0,2µl
25 µM de primer F/R	0,6 µl
10 mM de dNTP	0,3 µl
50 mM de MgCl ₂	0,45 µl
10X buffer	1X
H ₂ O ultrapura	10,35 µl
Volume final	15µl

As reações de digestão (RFLP) foram padronizadas conforme indicação do protocolo do fabricante. As condições químicas e físicas ideais estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5: Condições químicas e físicas da reação de RFLP

Condições Químicas	XRCC1 Arg194Trp	XRCC1 Arg399Gln	XRCC3	XPC	ERCC1	RAD51
Enzima	PvuII 0,5µL	MspI 0,25µL	Hin1II 0,125 µL	PvuII 0,5 µL	BseMI 0,125 µL	MvaI 0,17 µL
Buffer	1,0µl	0,75µL	0,875 µL	1,0 µL	0,875 µL	1,0 µL
Produto	5,0µl	8,0µL	5,0 µL	5,0 µL	5,0 µL	5,0 µL
H2O ultrapura	8,5µl	6,0µL	5,0 µL	8,5 µL	5,0 µL	3,83 µL
<i>Condições Físicas</i>						
Temperatura	37°C	37°C	37°C	37°C	55°C	37°C
Tempo	35min	60min	16h	35min	16h	1h20min

3.5 Visualização e análise do produto

Os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose 3%, por 35 minutos a 150 volts e corados com Brometo de Etídio. O resultado obtido em cada uma das regiões está apresentado na figura 6.

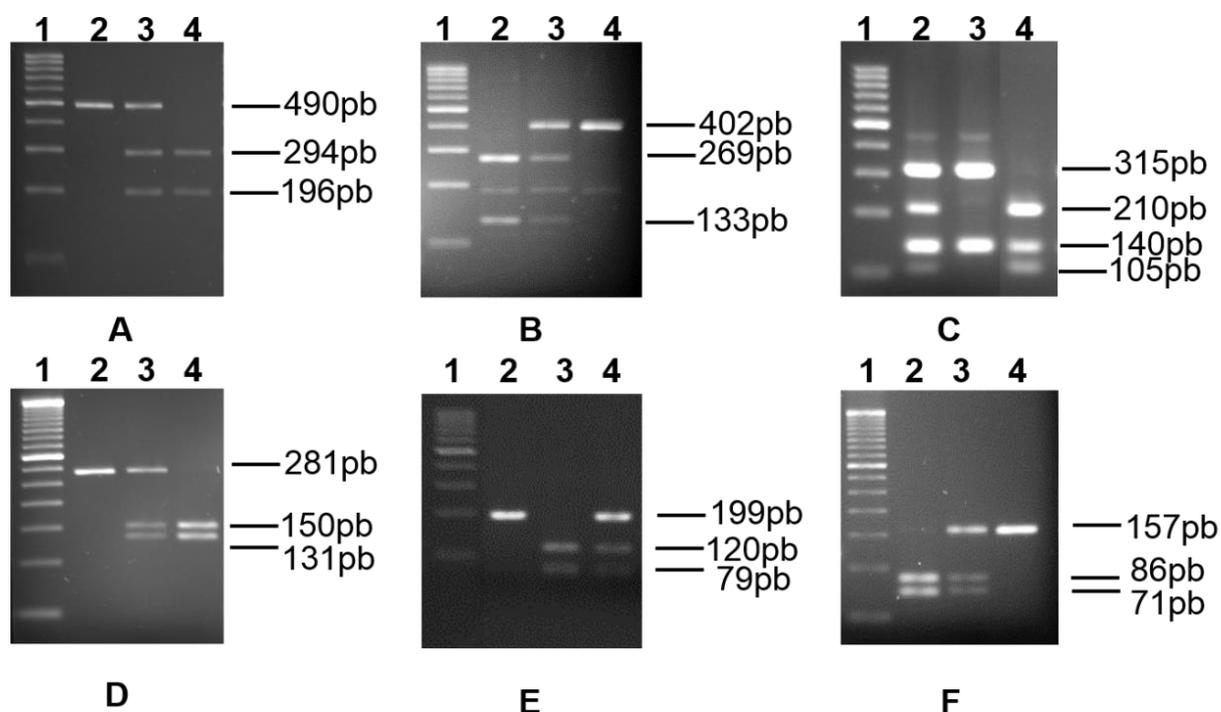


Figura 6: Gel de Agarose 3%, corado com Brometo de Etídio. **A) XRCC1 Arg194Trp**- 1: Ladder 100pb; 2: Homozigoto selvagem (Arg/Arg); 3: Heterozigoto (Arg/Trp); 4: Homozigoto variante (Trp/Trp). **B) XRCC1 Arg399Gln**- 1: Ladder 100pb; 2: Homozigoto selvagem (Arg/Arg); 3: Heterozigoto (Arg/Gln); 3: Homozigoto variante (Gln/Gln). **C) XRCC3 Thr241Met**- 1: Ladder 100pb; 2: Heterozigoto (Thr/Met); 3: Homozigoto selvagem (Thr/Thr); 4: Homozigoto variante (Met/Met). **D) XPC Lys939Gln**- 1:Ladder 50pb; 2: Homozigoto selvagem (Lys/Lys); 3: Heterozigoto (Lys/Gln); 4: Homozigoto variante (Gln/Gln). **E) ERCC1 Asn118Asn**- 1: Ladder 100pb; 2: Homozigoto selvagem (Asn/Asn); 3: Homozigoto variante (Asn/Asn); 4: Heterozigoto (Asn/Asn). **F) RAD51 -98G>C-** 1: Ladder 50pb; 2: Homozigoto selvagem (GG); 3: Heterozigoto (GC); 4: Homozigoto variante (CC).

3.6 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizada a margem de erro estipulado em menor que 5%, de acordo com o teste de significância de Lilliefors (significância quando $p < 0,05$). Para os testes de associação foram utilizados o teste Qui-quadrado e quando necessário, o teste exato de Fisher. Para a análise da sobrevida foi

calculado o intervalo de tempo (em meses) entre as datas de cirurgia e óbito de cada paciente, ou do último retorno nos casos sobreviventes. Adicionalmente, o intervalo de tempo para a análise da sobrevida livre de doença local foi calculado utilizando como ponto final a data da recidiva local ou a data do último retorno nos casos assintomáticos. As curvas de sobrevidas foram avaliadas segundo o modelo Kaplan-Meier, e sua significância confirmada pelo valor de p de Wilcoxon.

As análises de regressão logística multivariada e de *Cox Proportional Hazard* foram utilizadas para ajustar os valores de *Odds ratio* (OD), *Hazard ratio* e Intervalo de Confiança (IC 95%) dos resultados significativos. A relação clinico-biológica e o valor de $p < 0,10$ foram considerados para selecionar as variáveis a serem utilizadas no modelo de análise multivariada. Os cálculos estatísticos foram realizados com a utilização do software Epi Info® v3.4.3

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise descritiva

4.1.1 Análise clinicopatológica

Os pacientes analisados foram caracterizados quanto as características clinicopatológicas dos tumores, como pode ser observado na tabela 6. O primeiro dado apresentado diz respeito ao estágio do tumor, que foram divididos em 4 estádios. Conforme o UICC, o grupamento por estádios é realizado conforme as características TNM do tumor, sendo T tamanho do tumor, N linfonodos acometidos e M metástases a distância. Sendo assim, o estágio I agrupa os tumores que apresentam T1N0M0, o estágio II os tumores com T2N0M0, estágio III os tumores T1,T2, T3N0 e N1 e o estágio IV qualquer T e N2.

Das amostras aqui analisadas, 35 pacientes apresentam tumores nos estágio I (11,3% dos pacientes), sendo que destes, 21 correspondem ao sítios da cavidade oral e orofaringe e 14 da laringe. No estágio II estão inclusos 50 pacientes, onde 13 tiveram CE de laringe e outros 37 CE de cavidade oral ou orofaringe. Já no estágio III, 49 pacientes apresentaram CE oral ou de orofaringe e outros 19 na laringe, totalizando 68 pacientes. No estágio IV, foram inclusos 158 pacientes, sendo que destes, 103 apresentaram tumores na cavidade oral e orofaringe e 55 na laringe.

Foi realizada também a classificação patológica dos tumores de acordo com seu tamanho (pT1, pT2, pT3 e pT4), onde foi possível observar que 40,8% dos tumores

estão classificados como pT1 e pT2, 25,1% como pT3 e 34,1% como pT4, distribuídos nos três sítios anatômicos (tabela 6).

Quanto a análise de linfonodos acometidos (pN), resultados também comprovados pela anatomia patológica, foi possível observar que 166 pacientes apresentaram resultado negativo e 145 apresentaram resultado positivo, sendo que na cavidade oral e orofaringe 112 pacientes apresentaram linfonodos acometidos e no caso da laringe apenas 33 apresentaram linfonodos acometidos.

A análise de metástase a distância (pM), mostra que 100% dos pacientes estão livres de metástase, resultado importante para o estudo, visto que a presença de metástase, principalmente quando acompanhado de linfonodos acometidos, reduz em muito a expectativa de vida do paciente, o que não seria benéfico, visto que este estudo necessita de um acompanhamento mínimo de 36 meses.

Tabela 6: Características clinicopatológicas dos pacientes com CECP

Características clinicopatológicas	Total		Sítios			
			Oral, Orofaringe		Laringe	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
Estádio						
I	35	11,3	21	10,0	14	13,9
II	50	16,1	37	17,6	13	12,9
III	68	21,9	49	23,3	19	18,8
IV	158	50,8	103	49,0	55	54,5
Tamanho do tumor (pT)						
pT1, pT2	127	40,8	95	45,2	32	31,7
pT3	78	25,1	59	28,1	19	18,8
pT4	106	34,1	56	26,7	50	49,5
Linfonodos acometidos (pN)						
Negativo	166	53,4	98	46,7	68	67,3
Positivo	145	46,6	112	53,3	33	32,7
Metástase (pM)						
Negativo	311	100,0	210	100,0	101	100,0
Positivo	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Total	311	100,0	210	67,5	101	32,5

4.1.2 Características do tratamento

Quanto as características do tratamento foram analisadas as variáveis cirurgia, radioterapia, quimioterapia e margens cirúrgicas livres ou positivas. Todos os pacientes que fazem parte deste estudo foram operados, como pode ser observado na tabela 7. Já para o tratamento radioterápico, 151 pacientes (48,6%) foram tratados, enquanto que 160 pacientes (51,4%) não passaram pelo tratamento. Distribuindo por sítio anatômico, 108 pacientes com CE oral ou de orofaringe não passaram pelo tratamento radioterápico, enquanto que 102 foram tratados. Já para a laringe, 52 pacientes não foram tratados e 49 pacientes receberam a radioterapia.

Para o tratamento da quimioterapia, 291 pacientes, o que corresponde a 93,6%, não receberam a quimioterapia e destes, 194 são pacientes com CE oral e orofaringe e 97 com CE de laringe. Os demais, o que totaliza 20 pacientes, foram tratados com quimioterapia, sendo que apenas 4 destes foram acometidos por câncer na laringe.

Quanto as margens cirúrgicas, 87,1% dos pacientes apresentam margens livres de tumores, enquanto 12,9% possuem margem cirúrgica positiva. Quando considerado os sítios anatômicos, 85,7% dos tumores de cavidade oral e orofaringe e 90,1% dos tumores de laringe apresentaram margem cirúrgica livre (tabela 7).

Tabela 7: Características clínicas dos tratamentos dos pacientes com CECp

Características do tratamento	Total		Sítios			
			Oral, Orofaringe		Laringe	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
Cirurgia						
Sim	311	100,0	210	100,0	101	100,0
Não	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Radioterapia						
Não	160	51,4	108	51,4	52	51,5
Sim	151	48,6	102	48,6	49	48,5
Quimioterapia						
Não	291	93,6	194	92,4	97	96,0
Sim	20	6,4	16	7,6	4	4,0
Margens cirúrgicas						
Livres de Tumor	271	87,1	180	85,7	91	90,1
Positiva	40	12,9	30	14,3	10	9,9
Total	311	100,0	210	67,5	101	32,5

4.1.3 Fatores de prognóstico

Foram analisados dados de recidiva geral, que inclui a recidiva local, regional e metástase; recidiva local que analisa o retorno da doença no local do tumor primário e ainda dados de óbito.

Em todas as três categorias especificadas anteriormente, existem casos que foram classificados como “não avaliados”. No caso das recidivas, isso ocorreu porque o tumor não pode ser eliminado mesmo após cirurgia, quimioterapia e radioterapia, portanto o aparecimento do tumor não pode ser considerado recidiva e sim tumor residual. E no caso do óbito mais especificamente, estes pacientes classificados como não avaliados, vieram a óbito, porém foram de motivos não relacionados a doença, o que elimina totalmente a possibilidade de estar neste grupo para análise de prognóstico na categoria óbito.

Os dados de recidiva apontam que 51,8% (161 pacientes) dos pacientes não recidivaram e 30,2% (94 pacientes) recidivaram, enquanto os outros 18% não puderam ser avaliados, pelos motivos já explicitados anteriormente. Quanto aos sítios anatômicos, destes 161 pacientes que não apresentaram recidiva, 100 possuíam tumores na cavidade oral ou orofaringe e os outros 61 na laringe. Dos 94 pacientes que recidivaram, 25 apresentaram tumores de laringe e 69 tiveram CE oral ou de orofaringe (tabela 8).

Quanto a recidiva local, 22,5% (70 pacientes) tiveram a recidiva local contra 59,5% (185 pacientes) que não apresentaram a recidiva e 18% dos casos não puderam ser avaliados. Considerando os sítios anatômicos, 117 dos que não recidivaram foram diagnosticados com CE oral ou orofaringe e 68 com câncer de laringe, enquanto os que recidivaram, são 52 com CE oral e orofaringe e 18 com CE de laringe.

Para o óbito, apenas 6,4% (20 pacientes) dos casos não puderam ser avaliados. Do número total de pacientes, 120 vieram a óbito (38,6%), sendo 83 acometidos por tumores na cavidade oral e orofaringe e 37 na laringe (tabela 8).

Tabela 8: Dados de prognóstico e acompanhamento dos pacientes com CECP, conforme sítio anatômico.

Dados do acompanhamento	Total		Sítios			
			Oral, Orofaringe		Laringe	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
Recidiva						
Não	161	51,8	100	47,6	61	60,4
Sim	94	30,2	69	32,9	25	24,8
Não avaliado*	56	18,0	41	19,5	15	14,9
Recidiva local						
Não	185	59,5	117	55,7	68	67,3
Sim	70	22,5	52	24,8	18	17,8
Não avaliado*	56	18,0	41	19,5	15	14,9
Óbito						
Não	171	55,0	113	53,8	58	57,4
Sim	120	38,6	83	39,5	37	36,6
Não avaliado*	20	6,4	14	6,7	6	5,9
Total	311	100,0	210	67,5	101	32,5

*Não incluído nos cálculos estatísticos

4.2 Análise Genotípica

A análise genotípica foi realizada nos seis polimorfismos que este trabalho propôs analisar. Em todos os genes foram considerados as três possibilidades genotípicas (homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto variante). Foram demonstrados também a porcentagem das amostras que não puderam ser analisadas, isso porque não foi possível visualizá-las no gel após a reação de amplificação, o que pode ter ocorrido por degradação da região que se desejava amplificar, não permitindo assim que a reação ocorresse.

O gene XRCC1 Arg194Trp, possui como possibilidades de genótipo Arg/Arg; Arg/Trp e Trp/Trp. O genótipo Trp/Trp é pouco frequente e foi observado em 0,6% (2 amostras) das amostras analisadas, em contraste com o homozigoto Arg/Arg que foi encontrado em 84,2% (262 amostras) das amostras. Já o heterozigoto, foi observado em 14,1% dos casos. No caso deste polimorfismo, 1% das amostras não puderam ser analisadas.

O polimorfismo XRCC1 Arg399Gln, pode apresentar os genótipos Arg/Arg; Arg/Gln e Gln/Gln. Destes genótipos, o mais frequente foi o homozigoto selvagem Arg/Arg, presente em 51,1% das amostras analisadas, sendo que o menos frequente foi o homozigoto variante Gln/Gln presente em apenas 10% das amostras. Neste SNP, apenas 1 amostra não pode ser analisada, representando um total de 0,3% das amostras.

O polimorfismo XRCC3 Thr241Met, também apresentou suas maiores e menores frequências genotípicas em seus homozigotos selvagens-Thr/Thr (45,7%) e variantes- Met/Met (13,8%). O heterozigoto Thr/Met apresentou uma frequência genotípica de 39,9%. Apenas 2 amostras (0,6%) não puderam ser avaliadas.

O polimorfismo XPC Lys939Gln, possui como genótipos Lys/Lys, Lys/Gln e Gln/Gln. Neste caso, o homozigoto selvagem (Lys/Lys) e o heterozigoto apresentam frequências muito próximas (44,4% e 42,4%), respectivamente. Já o heterozigoto

variante (Gln/Gln), apresenta uma frequência menor, de apenas 12,5%. Do total, 2 amostras (0,6%) não puderam ser analisadas.

Já para o polimorfismo ERCC1 Asn118Asn (T>C), a maior frequência genotípica foi observada no heterozigoto TC, com uma frequência de 49,8%. Já o homozigoto selvagem TT apresentou uma frequência de 29,3% contra 20,3% do genótipo variante CC. Dois casos não puderam ser avaliados.

Para o polimorfismo RAD51 -98G>C, são possíveis os genótipos GG, GC e CC. Os três genótipos apresentam frequências muito diferentes, sendo que o genótipo GG apresenta uma frequência elevada de 74,9%, o heterozigoto uma frequência intermediária (20,6%) e o CC uma frequência baixa de 3,5%. Este fato se repete, nesta mesma ordem, quando se observa as frequências também em cada sítio anatômico individualmente. As frequências genotípicas para todos os polimorfismos em questão estão melhor apresentadas na tabela 9.

Tabela 9: Frequência genotípica dos genes de reparo de DNA, conforme sítios anatômicos.

Genótipos	Total		Sítios			
			Oral, Orofaringe		Laringe	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
XRCC1 Arg194Trp						
Arg/Arg	262	84,2	177	84,3	85	84,2
Arg/Trp	44	14,1	30	14,3	14	13,9
Trp/Trp	2	0,6	1	0,5	1	1,0
Não avaliado*	3	1,0	2	1,0	1	1,0
XRCC1 Arg399Gln						
Arg/Arg	159	51,1	104	49,5	55	54,5
Arg/Gln	120	38,6	84	40,0	36	35,6
Gln/Gln	31	10,0	22	10,5	9	8,9
Não avaliado*	1	0,3	0	0,0	1	1,0
XRCC3 Thr241Met						
Thr/Thr	142	45,7	104	49,5	38	37,6
Thr/Met	124	39,9	82	39,0	42	41,6
Met/Met	43	13,8	22	10,5	21	20,8
Não avaliado*	2	0,6	2	1,0	0	0,0
XPC Lys939Gln						
Lys/Lys	138	44,4	94	44,8	44	43,6
Lys/Gln	132	42,4	89	42,4	43	42,6
Gln/Gln	39	12,5	27	12,9	12	11,9
Não avaliado*	2	0,6	0	0,0	2	2,0
ERCC1 Asn118Asn (T>C)						
TT	91	29,3	56	26,7	35	34,7
TC	155	49,8	108	51,4	47	46,5
CC	63	20,3	44	21,0	19	18,8
Não avaliado*	2	0,6	2	1,0	0	0,0
RAD51 -98G>C						
GG	233	74,9	156	74,3	77	76,2
GC	64	20,6	43	20,5	21	20,8
CC	11	3,5	8	3,8	3	3,0
Não avaliado*	3	1,0	3	1,4	0	0,0
Total	311	100,0	210	67,5	101	32,5

*Não incluído nos cálculos estatísticos

4.3 Análise de prognóstico

Não foi encontrada relação dos polimorfismos estudados com a recidiva geral dos casos de CE oral e orofaringe irradiados. Igualmente, nos casos não irradiados não foi verificada relação significativa com a recidiva geral (XRCC1 Arg194Trp- $p=0,624$ e $p=0,234$; XRCC1 Arg399Gln- $p=0,089$ e $p=0,984$; XRCC3- $p=0,310$ e $0,700$; XPC- $p=0,097$ e $p=0,127$; ERCC1- $p= 0,482$ e $0,982$ e RAD51- $p= 0,213$ e $0,147$). Dados apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Análise de prognóstico de dados de Recidiva Geral em pacientes com CE oral e de orofaringe

Genótipos	ORAL, OROFARINGE									
	Casos irradiados (=81)					Casos não irradiados (n=88)				
	Recidiva geral					Recidiva geral				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p
No.	(%)	No.	(%)	No.		(%)	No.	(%)		
XRCC1 Arg194Trp										
Arg/Arg	44	86,3	23	76,7	0,624	45	91,8	33	84,6	0,234
Arg/Trp+Trp/Trp	7	13,7	5	16,7		4	8,2	6	15,4	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
XRCC1 Arg399Gln										
Arg/Arg	32	62,7	13	43,3	0,089	20	40,8	16	41,0	0,984
Arg/Gln+Gln/Gln	19	37,3	17	56,7		29	59,2	23	59,0	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
XRCC3 Thr241Met										
Thr/Thr+Thr/Met	45	88,2	25	83,3	0,310	44	89,8	34	87,2	0,700
Met/Met	5	9,8	4	13,3		5	10,2	5	12,8	
Não avaliado*	1	2,0	1	3,3		0	0,0	0	0,0	
XPC Lys939Gln										
Lys/Lys+Lys/Gln	46	90,2	23	76,7	0,097	40	81,6	36	92,3	0,127
Gln/Gln	5	9,8	7	23,3		9	18,4	3	7,7	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
ERCC1 Asn118Asn										
TT	13	25,5	10	33,3	0,482	13	26,5	10	25,6	0,982
TC+CC	37	72,5	20	66,7		36	73,5	28	71,8	
Não avaliado*	1	2,0	0	0,0		0	0,0	1	2,6	
RAD51 -98G>C										
GG	41	80,4	21	70,0	0,213	39	79,6	25	64,1	0,147
GC+CC	9	17,6	9	30,0		10	20,4	13	33,3	
Não avaliado*	1	2,0	0	0,0		0	0,0	1	2,6	
Total	51	63,0	30	37,0		49	55,7	39	44,3	

*Não incluído nos cálculos estatísticos

Na análise de recidiva geral de CE de laringe irradiados e não irradiados, os polimorfismos XRCC1 Arg194Trp ($p=0,057$ e $p=0,401$), XRCC1 Arg399Gln ($p=0,852$ e $p=0,386$), XPC ($p=0,449$ e $p=0,631$), ERCC1 ($p=0,633$ e $0,227$) e RAD51 ($p=0,613$ e $0,536$), não apresentaram resultados estatisticamente significativos. Já o gene XRCC3 apresentou resultado estatisticamente significativo ($p=0,003$) para os casos irradiados, sendo que a presença do alelo Thr foi mais encontrada nos casos

que não tiveram a recidiva geral do que nos casos que tiveram a recidiva geral (tabela 11).

Tabela 11: Análise de prognóstico de Recidiva Geral em pacientes com CE de laringe

Genótipos	LARINGE									
	Casos irradiados (n=49)					Casos não irradiados (n=37)				
	Recidiva geral					Recidiva geral				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p
No.	(%)	No.	(%)	No.		(%)	No.	(%)		
XRCC1 Arg194Trp										
Arg/Arg	28	73,7	11	100,0	0,057	21	91,3	13	92,9	0,401
Arg/Trp+Trp/Trp	10	26,3	0	0,0		2	8,7	0	0,0	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	1	7,1	
XRCC1 Arg399Gln										
Arg/Arg	18	47,4	5	45,5	0,852	14	60,9	10	71,4	0,386
Arg/Gln+Gln/Gln	19	50,0	6	54,5		9	39,1	4	28,6	
Não avaliado*	1	2,6	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
XRCC3 Thr241Met										
Thr/Thr+Thr/Met	33	86,8	5	45,5	<u>0,003</u>	19	82,6	14	100,0	0,134
Met/Met	5	13,2	6	54,5		4	17,4	0	0,0	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
XPC Lys939Gln										
Lys/Lys+Lys/Gln	34	89,5	11	100,0	0,449	19	82,6	11	78,6	0,631
Gln/Gln	3	7,9	0	0,0		4	17,4	2	14,3	
Não avaliado*	1	2,6	0	0,0		0	0,0	1	7,1	
ERCC1 Asn118Asn										
TT	24	63,2	7	63,6	0,633	14	60,9	11	78,6	0,227
TC+CC	14	36,8	4	36,4		9	39,1	3	21,4	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
RAD51 -98G>C										
GG	28	73,7	8	72,7	0,613	17	73,9	11	78,6	0,536
GC+CC	10	26,3	3	27,3		6	26,1	3	21,4	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Total	38	77,6	11	22,4		23	62,2	14	37,8	

*Não incluído nos cálculos estatísticos

Para a análise de recidiva local, foi utilizado o mesmo grupo amostral utilizado na análise de recidiva geral. Para o polimorfismo do gene XPC foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos casos irradiados de CE oral e de orofaringe ($p=0,018$), onde a presença do alelo Lys é mais frequente não casos em que não houve

recidiva local. Foi encontrada diferença também, no caso do polimorfismo do gene RAD51 ($p=0,042$), em casos não irradiados, onde a presença do alelo G é mais frequente em casos que não tiveram a recidiva local. Já nos demais casos, tanto irradiados quanto não irradiados de CE oral e de orofaringe, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos polimorfismos XRCC1 Arg194Trp ($p=0,526$ e $0,397$), XRCC1 Arg399Gln ($p= 0,102$ e $0,832$), XRCC3 ($p=0,269$ e $0,602$), ERCC1 ($p= 0,553$ e $0,374$) (tabela 12).

Tabela 12: Análise de Prognóstico de Recidiva Local em pacientes com CE oral e de orofaringe

Genótipos	ORAL, OROFARINGE									
	Casos irradiados (n=81)					Casos não irradiados (n=88)				
	Recidiva local					Recidiva local				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p
No.	(%)	No.	(%)	No.		(%)	No.	(%)		
XRCC1 Arg194Trp										
Arg/Arg	47	82,5	20	83,3	0,526	54	90,0	24	85,7	0,397
Arg/Trp+Trp/Trp	8	14,0	4	16,7		6	10,0	4	14,3	
Não avaliado*	2	3,5	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
XRCC1 Arg399Gln										
Arg/Arg	35	61,4	10	41,7	0,102	25	41,7	11	39,3	0,832
Arg/Gln+Gln/Gln	22	38,6	14	58,3		35	58,3	17	60,7	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
XRCC3 Thr241Met										
Thr/Thr+Thr/Met	50	87,7	20	83,3	0,269	53	88,3	25	89,3	0,602
Met/Met	5	8,8	4	16,7		7	11,7	3	10,7	
Não avaliado*	2	3,5	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
XPC Lys939Gln										
Lys/Lys_Lys/Gln	52	91,2	17	70,8	<u>0,018</u>	50	83,3	26	92,9	0,192
Gln/Gln	5	8,8	7	29,2		10	16,7	2	7,1	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
ERCC1 Asn118Asn										
TT	15	26,3	8	33,3	0,553	17	28,3	6	21,4	0,374
TC+CC	41	71,9	16	66,7		43	71,7	21	75,0	
Não avaliado*	1	1,8	0	0,0		0	0,0	1	3,6	
RAD51 -98G>C										
GG	45	78,9	17	70,8	0,349	48	80,0	16	57,1	<u>0,042</u>
GC+CC	11	19,3	7	29,2		12	20,0	11	39,3	
Não avaliado*	1	1,8	0	0,0		0	0,0	1	3,6	
Total	57	70,4	24	29,6		60	68,2	28	31,8	

*Não incluído nos cálculos estatísticos

Para a análise de recidiva local da laringe, foi encontrada diferença estatisticamente significativa para o gene XRCC3 ($p < 0,001$) nos casos irradiados, sendo que a presença do alelo Thr foi encontrada mais frequentemente nos casos em quem não foi observada a recidiva local (tabela 13). Nos demais genes, tanto para os casos irradiados quanto para os casos não irradiados não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa (XRCC1 Arg194Trp – $p = 0,136$ e $0,0557$; XRCC1 Arg399Gln – $p = 0,302$ e $0,503$; XPC – $p = 0,571$ e $0,475$; ERCC1- $p = 0,627$ e $0,079$ e RAD51- $p = 0,355$ e $0,462$).

Tabela 13: Análise de Prognóstico de Recidiva Local em pacientes com CE de laringe

Genótipos	LARINGE									
	Casos irradiados (n=49)					Casos não irradiados (n=37)				
	Recidiva local					Recidiva local				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p
No.	(%)	No.	(%)	No.		(%)	No.	(%)		
XRCC1 Arg194Trp										
Arg/Arg	31	75,6	8	100,0	0,136	25	92,6	9	90,0	0,557
Arg/Trp+Trp/Trp	10	24,4	0	0,0		2	7,4	0	0,0	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
XRCC1 Arg399Gln										
Arg/Arg	18	43,9	5	62,5	0,302	17	63,0	7	70,0	0,503
Arg/Gln+Gln/Gln	22	53,7	3	37,5		10	37,0	3	30,0	
Não avaliado*	1	2,4	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
XRCC3 Thr241Met										
Thr/Thr+Thr/Met	36	87,8	2	25,0	<u>< 0,001</u>	23	85,2	10	100,0	0,265
Met/Met	5	12,2	6	75,0		4	14,8	0	0,0	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
XPC Lys939Gln										
Lys/Lys_Lys/Gln	37	90,2	8	100,0	0,571	23	85,2	7	70,0	0,475
Gln/Gln	3	7,3	0	0,0		4	14,8	2	20,0	
Não avaliado*	1	2,4	0	0,0		0	0,0	1	10,0	
ERCC1 Asn118Asn										
TT	15	36,6	3	37,5	0,627	11	40,7	1	10,0	0,079
TC+CC	26	63,4	5	62,5		16	59,3	9	90,0	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
RAD51 -98G>C										
GG	31	75,6	5	62,5	0,355	21	77,8	7	70,0	0,462
GC+CC	10	24,4	3	37,5		6	22,2	3	30,0	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Total	41	83,7	8	16,3		27	73,0	10	27,0	

*Não incluído nos cálculos estatísticos

Na análise de óbito para as amostras de CE oral e de orofaringe dos casos irradiados e não irradiados não foram encontrados resultados estatisticamente significativos, como pode ser observado na tabela 14 (XRCC1 Arg194Trp – p=0,108 e 0,863; XRCC1 Arg399Gln – 0,212 e 0,307; XRCC3 – p= 0,631 e 0,275; XPC – p=0,101 e 0,076; ERCC1 – p=0,558 e 0,884 e RAD51 – p=0,141 e 0,427).

Tabela 14: Análise de Prognóstico de dados de Óbito em pacientes com CE oral e de orofaringe

Genótipos	ORAL, OROFARINGE									
	Casos irradiados (n=97)					Casos não irradiados (n=99)				
	Óbito					Óbito				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p
No.	(%)	No.	(%)	No.		(%)	No.	(%)		
XRCC1 Arg194Trp										
Arg/Arg	46	86,8	31	70,5	0,108	53	88,3	34	87,2	0,863
Arg/Trp+Trp/Trp	7	13,2	11	25,0		7	11,7	5	12,8	
Não avaliado*	0	0,0	2	4,5		0	0,0	0	0,0	
XRCC1 Arg399Gln										
Arg/Arg	32	60,4	21	47,7	0,212	23	38,3	19	48,7	0,307
Arg/Gln+Gln/Gln	21	39,6	23	52,3		37	61,7	20	51,3	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
XRCC3 Thr241Met										
Thr/Thr+Thr/Met	48	90,6	39	88,6	0,631	55	91,7	33	84,6	0,275
Met/Met	5	9,4	4	9,1		5	8,3	6	15,4	
Não avaliado*	0	0,0	1	2,3		0	0,0	0	0,0	
XPC Lys939Gln										
Lys/Lys_Lys/Gln	49	92,5	36	81,8	0,101	50	83,3	37	94,9	0,076
Gln/Gln	4	7,5	8	18,2		10	16,7	2	5,1	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
ERCC1 Asn118Asn										
TT	14	26,4	14	31,8	0,558	15	25,0	10	25,6	0,884
TC+CC	39	73,6	30	68,2		45	75,0	28	71,8	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	1	2,6	
RAD51 -98G>C										
GG	44	83,0	31	70,5	0,141	45	75,0	25	64,1	0,427
GC+CC	9	17,0	13	29,5		15	25,0	12	30,8	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	2	5,1	
Total	53	54,6	44	45,4		60	60,6	39	39,4	

*Não incluído nos cálculos estatísticos

Na análise de óbito dos casos de laringe irradiados e não irradiados, também não foram observados dados estatisticamente significativos para os genes XRCC1 Arg194Trp ($p=0,144$ e $0,664$), XRCC1 Arg399Gln ($p=0,67$ e $0,947$), XRCC3 ($p=0,247$ e $0,209$), XPC ($p= 0,355$ e $0,378$), ERCC1 ($p= 0,939$ e $0,109$) e RAD51 ($p=0,337$ e $0,411$). Dados completos apresentados na tabela 15.

Tabela 15: Análise de Prognóstico de dados de Óbito em pacientes com CE de laringe

Genótipos	LARINGE									
	Casos irradiados (n=48)					Casos não irradiados (n=47)				
	Óbito					Óbito				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p
No.	(%)	No.	(%)	No.		(%)	No.	(%)		
XRCC1 Arg194Trp										
Arg/Arg	21	72,4	17	89,5	0,144	26	89,7	17	94,4	0,664
Arg/Trp+Trp/Trp	8	27,6	2	10,5		2	6,9	1	5,6	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		1	3,4	0	0,0	
XRCC1 Arg399Gln										
Arg/Arg	13	44,8	10	52,6	0,676	18	62,1	11	61,1	0,947
Arg/Gln+Gln/Gln	15	51,7	9	47,4		11	37,9	7	38,9	
Não avaliado*	1	3,4	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
XRCC3 Thr241Met										
Thr/Thr+Thr/Met	24	82,8	13	68,4	0,247	25	86,2	13	72,2	0,209
Met/Met	5	17,2	6	31,6		4	13,8	5	27,8	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
XPC Lys939Gln										
Lys/Lys_Lys/Gln	27	93,1	17	89,5	0,355	24	82,8	14	77,8	0,378
Gln/Gln	1	3,4	2	10,5		4	13,8	4	22,2	
Não avaliado*	1	3,4	0	0,0		1	3,4	0	0,0	
ERCC1 Asn118Asn										
TT	11	37,9	7	36,8	0,939	11	37,9	3	16,7	0,109
TC+CC	18	62,1	12	63,2		18	62,1	15	83,3	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
RAD51 -98G>C										
GG	20	69,0	15	78,9	0,337	22	75,9	15	83,3	0,411
GC+CC	9	31,0	4	21,1		7	24,1	3	16,7	
Não avaliado*	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Total	29	60,4	19	39,6		29	61,7	18	38,3	

*Não incluído nos cálculos estatísticos

Segundo a análise multivariada do polimorfismo XRCC1 Arg399Gln em pacientes com CE oral e de orofaringe irradiados, quando na presença do alelo Gln, os pacientes tem um risco aumentado de recidiva local em 3 vezes quando comparado com a ausência do mesmo (OR= 3,35; IC=1,10-10,13) (tabela 16).

Já para o polimorfismo XPC, no mesmo grupo de pacientes, a presença do alelo Gln aumenta em 6 vezes o risco de recidiva local, comparado ao alelo Lys (OR= 6,04; IC=1,47-24,88) (tabela 16).

Ainda na análise multivariada de recidiva local para o CE oral e de orofaringe, agora para os indivíduos não irradiados, a análise multivariada, demonstra que a presença do alelo C no polimorfismos RAD51 -98G>C aumenta em mais de 3 vezes a chance da recidiva local, comparada a ausência do mesmo alelo (OR=3,13; IC=1,12-8,78), como pode ser observado na tabela 16.

Tabela 16: Análise multivariada de recidiva local em pacientes com CE oral e de orofaringe

Variáveis	RECIDIVA LOCAL			
	Oral, Orofaringe			
	Irradiados		Não irradiados	
	OR (95% CI)*	p	OR (95% CI)	p
Margens cirúrgicas				
Negativa	1		1	
Positiva	2,47 (0,65-9,38)	0,185	2,30 (0,62-8,49)	0,212
XRCC1 Arg399Gln				
Arg/Arg	1		—	—
Arg/Gln+Gln/Gln	<u>3,35 (1,10-10,13)</u>	<u>0,033</u>	—	—
XPC Lys939Gln				
Lys/Lys_Lys/Gln	1		—	—
Gln/Gln	<u>6,04 (1,47-24,88)</u>	<u>0,013</u>	—	—
RAD51 -98G>C				
GG	—	—	1	
GC+CC	—	—	<u>3,13 (1,12-8,78)</u>	<u>0,030</u>

*OR e IC: foram ajustados pelo modelo de regressão logística multivariada.

Na análise multivariada de óbito para as mesmas regiões anatômicas citadas acima, não houve resultados estatisticamente significativos para os indivíduos

irradiados, como pode ser observado na tabela 17. Porém, para os indivíduos não irradiados, foi observado que tumores classificados em estágio IV (neste caso, foi observado por regressão logística que tanto o tamanho do tumor, quanto os linfonodos acometidos influenciam no óbito, por isso a análise multivariada foi baseada em estágio) aumentam em quase 6 vezes o risco de óbito (OR=5,99; IC= 2,08-17,23).

Tabela 17: Análise multivariada de óbito em pacientes com CE oral e de orofaringe

Variáveis	ÓBITO			
	Oral, Orofaringe			
	Irradiados		Não irradiados	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Estádio				
I, II	1		1	
III	<i>undefined</i>		1,90 (0,63-5,69)	0,253
IV	<i>undefined</i>		<u>5,99 (2,08-17,23)</u>	<u>< 0,001</u>
XRCC1 Arg194Trp				
Arg/Arg	1		—	—
Arg/Trp+Trp/Trp	2,42 (0,79-7,41)	0,122	—	—
XPC Lys939Gln				
Lys/Lys_Lys/Gln	1		1	
Gln/Gln	2,74 (0,72-10,50)	0,141	0,26 (0,05-1,36)	0,111

*OR e IC: foram ajustados pelo modelo de regressão logística multivariada.

A análise multivariada de recidiva local no CE da laringe, revelou que em indivíduos irradiados a presença do alelo Met no SNP XRCC3 Thr241Met aumenta em mais de 33 vezes a chance de recidiva local, comparado ao alelo Thr, como pode ser observado na tabela 18. Margem cirúrgica e o polimorfismo XRCC1 Arg194Trp, não apresentaram resultados estatisticamente significativos.

Tabela 18: Análise multivariada de recidiva local em pacientes com CE de laringe de casos irradiados

Variáveis	RECIDIVA LOCAL	
	Laringe	
	Irradiados	
	OR (95% CI)	p
Margens cirúrgicas		
Negativa	1	
Positiva	9,56 (0,57-159,64)	0,116
XRCC1 Arg194Trp		
Arg/Arg	1	
Arg/Trp+Trp/Trp	<i>undefined</i>	
XRCC3 Thr241Met		
Thr/Thr+Thr/Met	1	
Met/Met	<u>33,64 (3,23-350,85)</u>	<u>0,003</u>

*OR e IC: foram ajustados pelo modelo de regressão logística multivariada.

A análise multivariada de óbito de CE de laringe, demonstra resultados semelhantes à análise de óbito em CE oral e de orofaringe, onde pacientes com tumores em estágio IV tem uma chance aumentada em 6 vezes de vir a óbito (tabela 19). A análise de polimorfismos não demonstrou resultados estatisticamente significativos.

Tabela 19: Análise multivariada de óbito em pacientes com CE de laringe

Variáveis	ÓBITO			
	Laringe			
	Irradiados		Não irradiados	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Estádio				
I, II	1		1	
III	0,62 (0,04-9,39)	0,733	1,21 (0,24-6,02)	0,817
IV	0,57 (0,07-4,75)	0,606	<u>6,22 (1,21-31,86)</u>	<u>0,028</u>
XRCC1 Arg194Trp				
Arg/Arg	1		—	—
Arg/Trp+Trp/Trp	0,36 (0,07-1,98)	0,240	—	—
ERCC1 Asn118Asn (T>C)				
TT	—	—	1	
TC+CC	—	—	5,02 (0,94-26,74)	0,059

A análise de sobrevida livre de doença local em pacientes com CE oral e de orofaringe em pacientes tratados com radioterapia mostrou relação com o polimorfismo XPC Lys939Gln ($p=0,038$; figura 7). Conforme a figura, pode-se observar que nos primeiros 12 meses após o tratamento, 30% dos indivíduos portadores do alelo Gln já haviam recidivado localmente, enquanto somente 10% dos portadores do alelo Lys haviam recidivado. Aos 18 meses, aproximadamente 50% dos portadores de Gln já haviam desenvolvido a recidiva e somente 20% dos portadores de Lys havia recidivado. Aos 36 meses, período de estabilidade quanto a recidiva, pouco mais de 25% dos portadores de pelo menos um alelo Lys haviam recidivado, enquanto neste período o tempo não houve mudanças quanto ao período anterior para os portadores do alelo Gln.

A análise multivariada revelou ainda, que a homozigose Gln aumenta em mais de 2 vezes o risco de precocidade de ocorrência de recidiva local ($HR=2,63$; $IC=1,04-6,70$), como pode ser observado na tabela 20.

As demais análises de sobrevida livre de doença local de CE oral e de orofaringe de indivíduos irradiados para os XRCC1 Arg194Trp ($p=0,589$), XRCC1 Arg399Gln ($p=0,127$), XRCC3 Thr241Met ($p=0,299$), ERCC1 Asn118Asn (T>C) ($p=0,309$) e RAD51 -98G>C ($p=0,741$), não apresentaram resultados estatisticamente significativos.

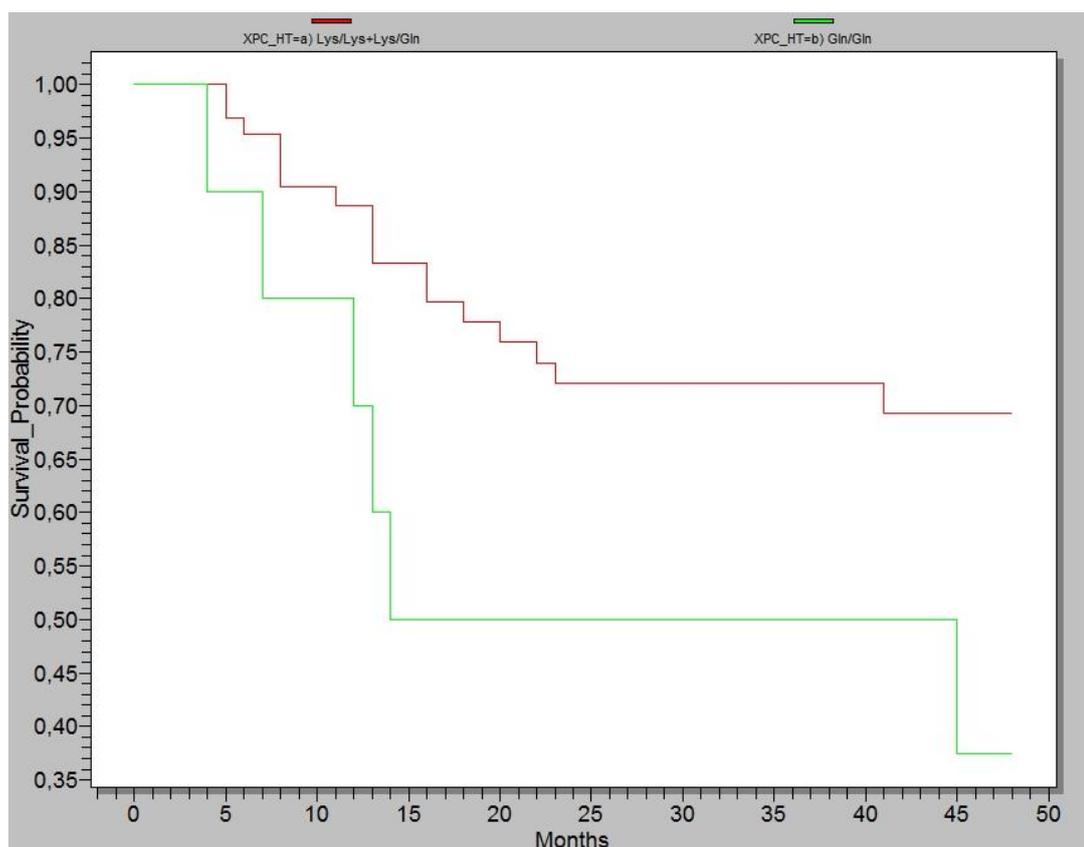


Figura 7: Curva de sobrevida livre de doença local do polimorfismo XPC Lys939Gln ($p=0,038$) de pacientes com CE oral e orofaringe irradiados ($n=24$).

Tabela 20: Análise multivariada de sobrevida livre de doença local de pacientes com CE oral e de orofaringe

Variáveis	LIVRE DE DOENÇA LOCAL			
	Oral, Orofaringe			
	Irradiados		Não irradiados	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Margens cirúrgicas				
Negativa	1		1	
Positiva	1,45 (0,54-3,91)	0,465	2,46 (0,87-6,98)	0,090
XPC Lys939Gln				
Lys/Lys_Lys/Gln	1		—	—
Gln/Gln	<u>2,63 (1,04-6,70)</u>	<u>0,042</u>	—	—
RAD51 -98G>C				
GG	—	—	1	
GC+CC	—	—	<u>2,84 (1,25-6,47)</u>	<u>0,013</u>

Já a análise de sobrevida livre de doença local em pacientes com CE oral e de orofaringe não irradiados demonstrou relação com o polimorfismo RAD51 -98G>C ($p=0,009$). A análise da curva da figura 8, demonstra que em um período de 12 meses aproximadamente 15% dos indivíduos portadores do alelo G haviam recidivado localmente, enquanto que 45% dos portadores do alelo C haviam recidivado no mesmo período e se mantido estável até o tempo final de 36 meses. Aos 36 meses, pouco mais de 25% dos portadores do alelo G haviam recidivado. A análise multivariada mostra que a presença do alelo C aumenta em mais de 2 vezes a precocidade de ocorrência de recidiva local, comparada com ausência do alelo C (HR= 2,84; IC= 1,25-6,47), como pode ser observado na tabela 20.

Os polimorfismos XRCC1 Arg194Trp ($p=0,457$), XRCC1 Arg399Gln ($p=0,841$), XRCC3 Thr241Met ($p=0,926$), XPC Lys939Gln ($p=0,301$) e ERCC1 Asn118Asn (T>C) ($p=0,667$) não apresentaram resultados estatisticamente significativos para esta análise.

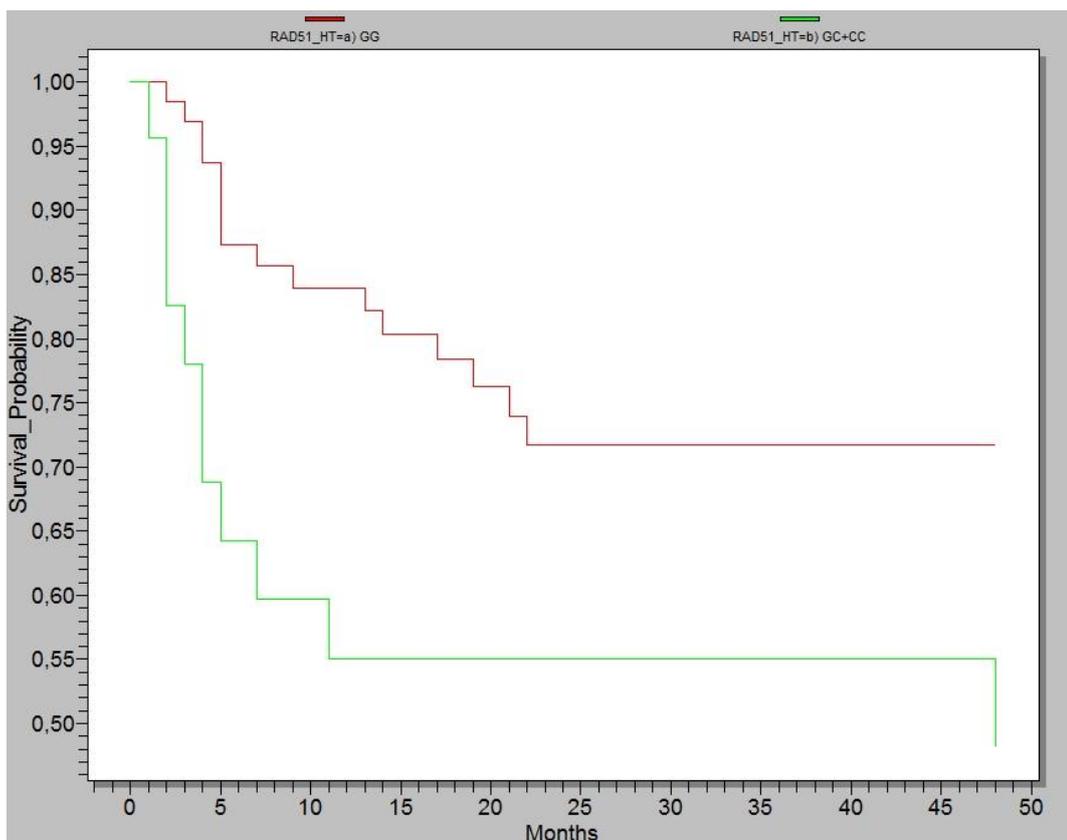


Figura 8: Curva de sobrevida livre de doença local do polimorfismo RAD51 -98G>C ($p=0,009$) de pacientes com CE oral e orofaríngea não-irradiados ($n=28$).

Foi analisado também a sobrevida livre de doença local para CE de laringe de casos irradiados e não irradiados. Conforme a figura 9, o polimorfismo XRCC3 Thr241Met ($p<0,001$) apresentou relação significativa com a sobrevida livre de doença local nos casos irradiados. É possível observar que no 12º mês, 70% dos portadores do alelo Met já haviam desenvolvido a recidiva enquanto menos de 10% dos portadores de pelo menos um alelo Thr haviam desenvolvido a recidiva. Em um período de 36 meses estes valores se mantiveram estáveis para os portadores do alelo Thr, enquanto que para os portadores do alelo Met mais de 50% dos portadores já haviam recidivado. Como pode ser vista na tabela 21, a análise multivariada demonstrou ainda, que a presença do alelo Met em homozigose aumenta em mais de 12 vezes a precocidade para o desenvolvimento da recidiva, comparada com o alelo Thr (HR= 12,55; IC=2,47-63,73).

Os demais polimorfismos, XRCC1 Arg194Trp ($p=0,163$), XRCC1 Arg399Gln ($p=0,305$), XPC Lys939Gln ($p=0,543$), ERCC1 Asn118Asn (T>C) ($p=0,969$) e RAD51 -98G>C ($p=0,334$), não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

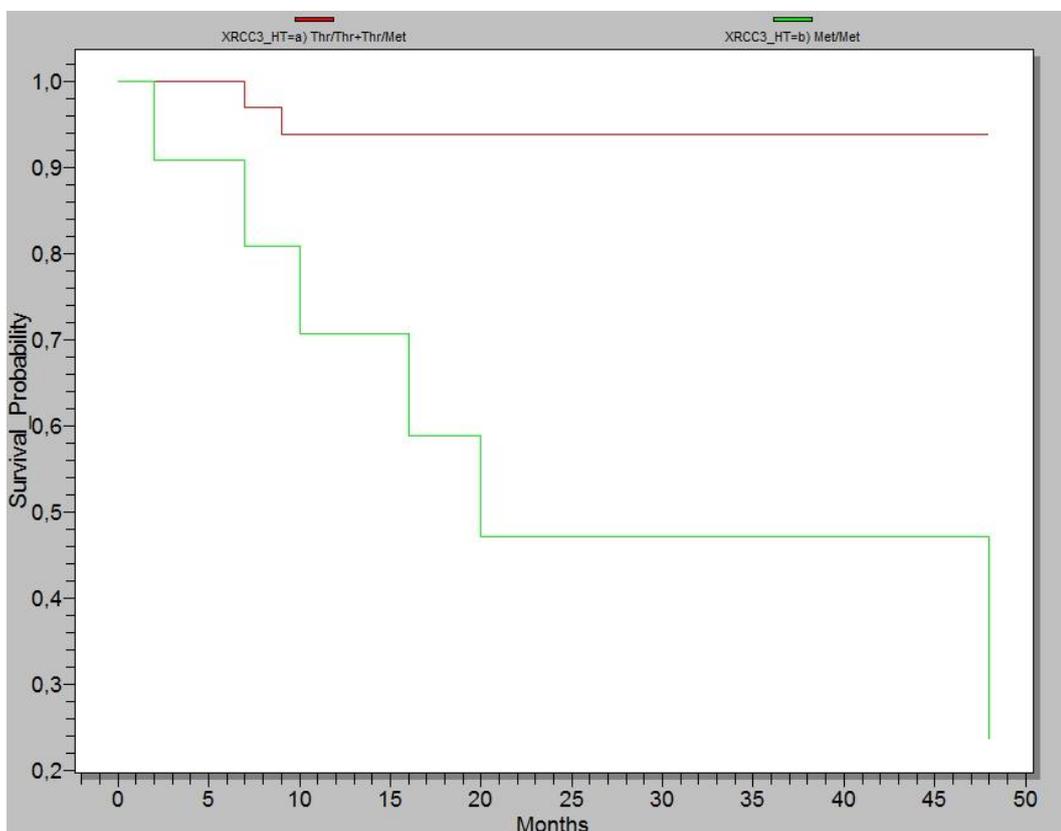


Figura 9: Curva de sobrevida livre de doença local do polimorfismo XRCC3 Thr241Met ($p<0,001$) de pacientes com CE de laringe irradiados ($n=8$).

Tabela 21: Análise multivariada de sobrevida livre de doença local de pacientes com CE de laringe em casos irradiados

Variáveis	LIVRE DE DOENÇA LOCAL	
	Laringe	
	Irradiados	
	HR (95% CI)	p
Margens cirúrgicas		
Negativa	1	
Positiva	1,98 (0,38-10,36)	0,417
XRCC3 Thr241Met		
Thr/Thr+Thr/Met	1	
Met/Met	<u>12,55 (2,47-63,73)</u>	<u>0,002</u>

Para as análises de sobrevida livre de doença local de CE de laringe não irradiados e sobrevida de doença específica de CE oral e de orofaringe irradiados e não irradiados não houve diferença estatisticamente significativa.

A análise de sobrevida de doença específica de CE de laringe para os casos irradiados revelou relação significativa com o polimorfismo XRCC3 Thr241Met ($p=0,046$). Observando a figura 10, é possível observar que aos 12 meses, 70% dos portadores do alelo Met já haviam morrido, enquanto que apenas 10% dos portadores de pelo menos 1 alelo Thr morreram. Aos 18 meses, estes valores se modificaram pouco, porém aos 36 meses, aproximadamente 25% dos portadores do alelo Thr haviam morrido, enquanto que mais de 50% dos portadores do alelo Met vieram a óbito. A análise multivariada, como pode ser observado na tabela 22, demonstra que a homozigose do alelo 241Met está relacionado com a pior sobrevida de doença específica, aumentando o risco da precocidade de óbito em mais de 3 vezes, quando comparada com o alelo Thr ($HR=3,04$; $IC= 1,08-8,61$). Para os demais polimorfismos, não houve diferença estatisticamente significativa, assim como para os casos não irradiados.

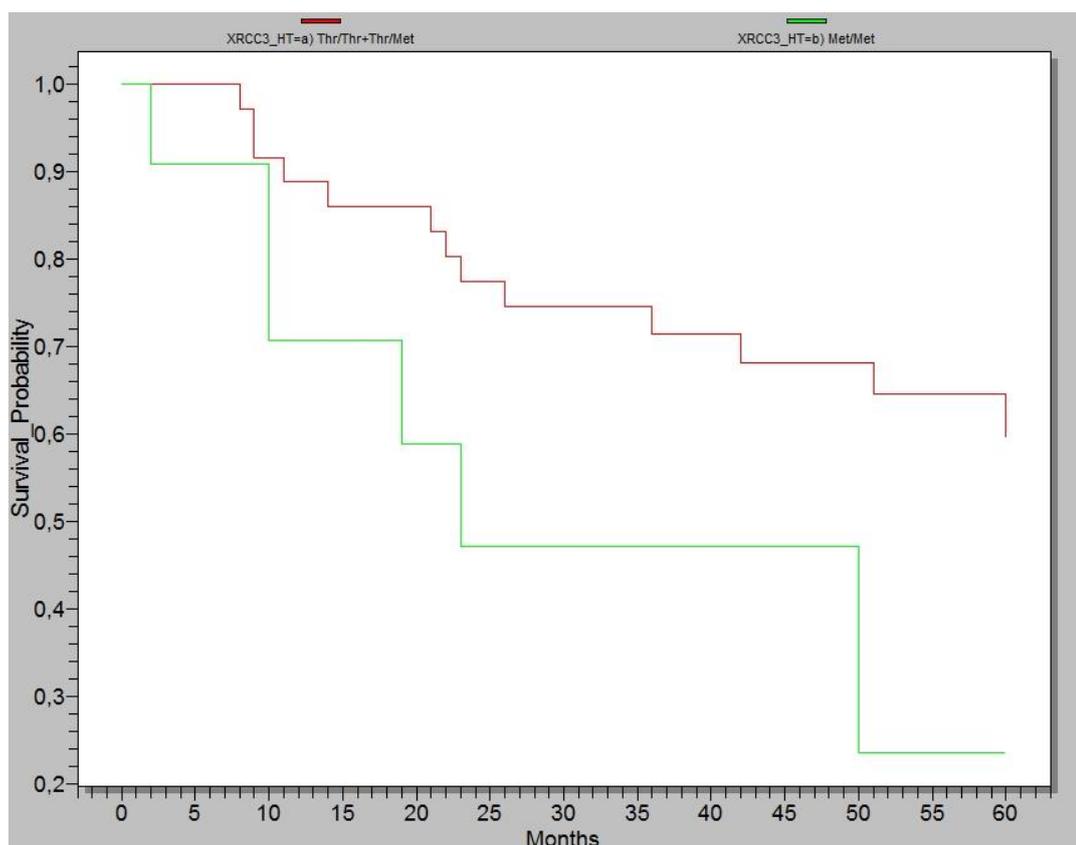


Figura 10: Curva de sobrevida de doença específica do polimorfismo XRCC3 Thr241Met de pacientes com CE de laringe irradiados ($p=0,046$) ($n=19$).

Tabela 22: Análise multivariada de sobrevida de doença específica em pacientes com CE de laringe de casos irradiados

Variáveis	DOENÇA ESPECÍFICA	
	Laringe	
	Irrradiados	
	HR (95% CI)	p
Estádio		
I, II	1	
III	0,55 (0,08-3,96)	0,554
IV	0,39 (0,08-1,80)	0,226
XRCC3 Thr241Met		
Thr/Thr+Thr/Met	1	
Met/Met	<u>3,04 (1,08-8,61)</u>	<u>0,036</u>

Discussão

5 DISCUSSÃO

O presente estudo analisou pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, mais especificamente com CE oral, orofaringe e de laringe, sendo todos atendidos no Hospital Heliópolis, São Paulo, Brasil, com o objetivo de analisar genes de reparo de DNA, com suposto papel na carcinogênese de diversos cânceres como pulmão, bexiga, trato aerodigestivo e no câncer de cabeça e pescoço.

Este trabalho analisou inicialmente as frequências genótípicas dos genes em questão. Os resultados demonstram, na maioria dos casos, frequências bem próximas as encontradas na literatura, como pode ser observado no estudo de Pramanik et al (2011), que descreveu a frequência genotípica para os polimorfismos XRCC1 Arg399Gln e XRCC3 Thr241Met, analisados em indivíduos saudáveis. Para o gene XRCC1, o autor observou uma maior frequência do genótipo Arg/Gln, diferente dos resultados obtidos neste estudo, onde o genótipo mais frequente foi o Arg/Arg. Os estudos de Olshan et al (2002), Sobti et al (2007) e Kumar et al (2012) analisaram a frequência genotípica tanto em pacientes saudáveis quanto em doentes, e em ambos os casos obtiveram resultados semelhantes aos obtidos por Pramanik et al (2011). Já o estudo de Duarte et al (2005), que estudou a população brasileira, observou uma maior frequência genotípica em Arg/Arg, assim como em nosso estudo.

A respeito do gene XRCC3, o nosso estudo e o de Pramanik apresentaram frequências genótípicas mais altas para os genótipos Thr/Thr, Thr/Met e Met/Met, porém em proporções diferentes. Já o estudo de Duarte et al (2005), que também analisou uma população brasileira, encontrou maior frequência para o genótipo Thr/Met.

O estudo de Olshan et al (2002) analisou a frequência genotípica para o polimorfismo XRCC1 Arg194Trp tanto em pacientes com CECP como em um grupo controle. Os resultados para ambos os grupos são bastante semelhantes aos nossos. O estudo de Duarte et al (2005) analisou a frequência genotípica na

população brasileira e realizou a análise dividindo a população em dois grupos, os descendentes europeus e os afro descendentes, apresentando resultados compatíveis com os resultados obtidos neste trabalho e com os resultados de Olshan (2002).

Sobre o polimorfismo RAD51, o estudo de Dufloth (2004), que analisou um grupo de mulheres com câncer de mama, observou maior frequência do genótipo GG e menor frequência do alelo CC, assim como no presente estudo.

No que diz respeito ao XPC Lys939Gln, Abbasi et al (2009) analisaram pacientes com câncer de laringe e observaram que o genótipo mais frequente foi Lys/Gln com uma frequência de 48%, diferentemente dos nossos resultados, onde foi observada uma maior frequência do genótipo Lys/Lys (44,4%) seguido de Lys/Gln (42,4%).

Abbasi et al (2009) analisaram também o polimorfismo ERCC1 Asn118Asn e seus resultados foram compatíveis com os apresentados neste trabalho, com maiores frequências para os genótipos TC, TT e CC. Comparando os estudos, é possível observar uma frequência um pouco maior dos genótipos TT (42% contra 29,3% deste estudo) e CC (13% contra 20,3%) no estudo de Abbasi et al (2009).

A diferença encontrada entre estes resultados pode ser explicada principalmente pela diversidade genética dos grupos populacionais estudados. O estudo de Pramanik foi realizado na Índia, num grupo descrito como formado por diferentes etnias e com uma alta diversidade genética, situação comum a diversas populações.

É importante ressaltar também, que em alguns estudos, a casuística é composta por indivíduos doentes, como em nosso estudo. Esta característica pode alterar as frequências genotípicas, devido a alterações genéticas que podem ocorrer, principalmente quando analisa-se genes que apresentam influência na carcinogênese, motivo que justifica a não realização do teste de Hardy-Weinberg, visto que as frequências gênicas poderiam estar alteradas.

Os resultados que relacionam o prognóstico e a modalidade terapêutica foram obtidos a partir da análise de 311 amostras de pacientes com CECP. Destes, foram obtidas e analisadas características clinicopatológicas como estágio, tamanho do tumor, linfonodos acometidos e presença de metástase.

Quanto às características do tratamento, foram analisadas as modalidades cirurgia, radioterapia, quimioterapia e margem cirúrgica livre de tumor ou positiva. Para correlacionar com a modalidade terapêutica, a qual este trabalho focou na radioterapia, foram utilizadas as variáveis de recidiva geral, recidiva local e óbito.

A análise do polimorfismo XRCC1 Arg399Gln, permitiu identificar através da análise multivariada, que a presença do alelo 399Gln (alelo variante) aumenta o risco de recidiva local, quando comparado com a ausência do mesmo, em pacientes com CE oral e de orofaringe irradiados.

Os resultados descritos na literatura ainda são poucos, principalmente em relação ao carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e os existentes apresentam-se contraditórios. Em uma revisão realizada por Borchiellini et al (2012), os autores descrevem que a presença do alelo Arg399 está relacionado a uma pior resposta do tumor ao tratamento radioterápico e a sobrevida em pacientes asiáticos. Outros estudos descrevem que a presença do alelo 399Gln está relacionada a pior sobrevida e grau reduzido de regressão tumoral, resultados estes semelhantes aos nossos achados. Outro estudo descreveu ainda, que pacientes heterozigotos tem uma melhor resposta ao tratamento. (BORCHIELLINI et al., 2012)

O estudo de Wu et al (2006) analisou pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago tratados com quimioradioterapia pré-operatória, onde observaram resultados semelhantes aos encontrados neste estudo. O autor observou que os indivíduos portadores do alelo 399Gln do polimorfismo XRCC1 Arg399Gln tiveram um risco aumentado de óbito em comparação com o genótipo Arg/Arg. Além disso, portadores do genótipo Arg/Arg tiveram um tempo médio de sobrevida maior (57,4 meses) do que portadores do genótipo Gln/Gln e Arg/Gln (13,7 e 22,9 meses, respectivamente). No presente estudo, a presença do alelo 399Gln aumenta o risco de recidiva local, o que conseqüentemente pode levar a um risco aumentado de morte. Mesmo que as análises estatísticas não tenham demonstrado significância relacionando o polimorfismo com o risco de óbito, sabe-se que a ocorrência da recidiva aumenta em muito as chances do paciente vir a óbito, devido as implicações de não se atingir um controle local satisfatório da doença.

Biologicamente, o mecanismo para explicar tal atividade se deve ao fato de que o gene XRCC1 repara danos por excisão de bases, pela via de BER. Diversos estudos relatam que a variante Gln resulta em um reparo de DNA deficiente e conseqüentemente maiores danos cromossômicos. Assim, é possível que o pior prognóstico esteja relacionado com o aumento da instabilidade genética gerada pelo tratamento radioterápico, já que se relata que anormalidades cromossômicas estão relacionadas ao pior prognóstico e conseqüentemente aumento da chance de recidiva local.

O estudo de Lamas et al (2012), analisou pacientes com câncer retal tratados com quimiorradioterapia e cirurgia e observou que o polimorfismo XRCC1 Arg399Gln está associado com a resposta ao tratamento. O genótipo Arg/Arg está relacionado à melhor resposta ao tratamento e maior regressão tumoral quando comparado ao genótipo Arg/Gln. Porém, Lamas se contradiz em seu trabalho, onde relata que a variante Gln resulta em reparo deficiente, tornando-a um bom marcador, que é explicado pelo fato da baixa capacidade de reparo favorecer a carcinogênese, mas potencializando a sensibilidade tumoral às drogas ou tratamentos ionizantes. Assim, genes que atuam em um reparo muito eficiente seriam um artifício de resistência a determinados tratamentos. Tal fato torna-se de difícil compreensão, uma vez que o autor apresenta resultados que o genótipo Arg/Arg está associado a maior regressão tumoral e melhor resposta ao tratamento. Contudo, apesar da referida contradição, seus resultados são compatíveis aos discutidos em nosso trabalho.

O polimorfismo XRCC1 Arg399Gln está localizado no domínio de BRCT1, que é uma região crítica para o reparo de BER, necessária para o recrutamento de PARP1 e mediada por XRCC1. Sugere-se que a substituição de uma arginina para uma glutamina poderia causar a perda de uma estrutura secundária da proteína, como uma alfa-hélice, que é importante para corrigir as interações proteína-proteína no domínio BRCT1, comprometendo assim a capacidade de reparo. (GAO et al., 2003). Sabe-se ainda, que o alelo 399Gln pode prejudicar a interação entre XRCC1 e outras proteínas, resultando na remoção ineficiente dos danos causados pela radiação induzindo danos ao DNA e uma parada no ciclo celular.

Nossos resultados indicam que o alelo 399Gln do gene XRCC1 está relacionado a uma pior sobrevida em pacientes irradiados, o que nos permite inferir que o alelo Gln está associado a pior resposta ao tratamento radioterápico e pior prognóstico do paciente, estando relacionado à recidiva local. Observa-se também é o que alelo Gln está relacionado a uma redução do reparo de DNA, o que como previsto na literatura está ligado, de uma forma geral, a maior sensibilidade tumoral pós radioterapia, o que não foi observado em nossos resultados.

Nossa hipótese é de que, apesar de apresentar uma atividade de reparo reduzida, esta redução não é suficiente para tornar a célula inviável após a radioterapia, podendo levar a um acúmulo de mutações, favorecendo a evolução da célula tumoral, o que resultaria em um fenótipo tumoral ainda mais agressivo, consequentemente, piorando o prognóstico dos pacientes em questão.

Além disso, a via de BER apesar de ser uma das vias mais importantes de correção e estabilização do genoma, atua corrigindo quebras de fita simples que são menos severas ao genoma do que as quebras duplas de DNA, que é o dano mais letal causado pela radioterapia, reforçando mais uma vez a hipótese de que o genótipo XRCC1 399Gln possa auxiliar em um acúmulo de mutações, não melhorando a radiosensibilidade tumoral.

Na análise do polimorfismo XPC Lys939Gln em casos de CE oral e de orofaringe irradiados, foi observado diferença estatisticamente significativa para a recidiva local, onde foi possível identificar que a presença do alelo Lys939 é mais frequente nos casos que não recidivaram localmente. A análise de sobrevida livre de doença local também foi estatisticamente significativa. A análise multivariada revelou que a homozigose do alelo 939Gln aumenta em duas vezes o risco de precocidade da recidiva local, quando comparado com a presença do alelo Lys e aumenta em mais de 6 vezes o risco de recidiva local.

O estudo de Yang et al (2013) analisou pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago e seus resultados demonstraram que o genótipo Gln/Gln é um fator de risco para recidiva e óbito após o tratamento de quimioradioterapia. No estudo, os autores observaram que portadores do genótipo Gln/Gln respondem negativamente a

quimiorradioterapia quando comparado com os portadores dos demais genótipos, o que consequentemente associa o paciente a um pior prognóstico.

Comparando os resultados obtidos com o estudo de Yang et al (2013), observa-se resultados compatíveis com os obtidos neste estudo. Aqui, o alelo Lys939 foi associado com a ausência de recidiva nos casos com CE oral e de orofaringe, sugerindo que sua atuação seja de proteção, em oposição ao alelo 939Gln. Segundo Yang, o alelo Gln aumenta a possibilidade do paciente recidivar, semelhante aos resultados aqui obtidos. Além disso, a análise multivariada revelou que o alelo 939Gln aumenta o risco precocidade de recidiva em pacientes tratados com radioterapia, sugerindo que este genótipo leve a uma pior resposta ao tratamento radioterápico.

Pouco se sabe sobre a função do polimorfismo XPC Lys939Gln. Alguns ensaios computacionais sugerem que a alteração de A>C possivelmente danifique a proteína. Sabe-se que neste polimorfismo ocorre a substituição de um aminoácido básico e hidrofílico (lisina) por um aminoácido neutro (glutamina), porém as consequências funcionais desta troca permanecem desconhecidas (ROUISSI et al., 2011; JI et al., 2012).

O alelo 939Gln deste polimorfismo tem sido associado a níveis reduzidos de reparação por NER *in vitro* (VODICKA et al., 2004; WANG et al., 2010), o que se assemelha ao observado no polimorfismo XRCC1 Arg399Gln, onde o alelo que reduz a atividade de reparo também está relacionado com a pior resposta ao tratamento. O mecanismo pode ser semelhante ao proposto anteriormente, com a diferença de que o gene XPC atua na via de NER, que assim como a via de BER, são responsáveis por corrigir lesões de intensidade média, permitindo sua sobrevivência e até mesmo uma piora no prognóstico do paciente.

Na análise do polimorfismo XRCC3 Thr241Met, os resultados demonstraram significância para os pacientes com CE de laringe irradiados nos casos que recidivaram regionalmente, onde observou-se mais frequentemente a presença do alelo Thr241. Foi possível observar também, que o alelo Thr241 foi encontrado mais frequentemente em casos que não recidivaram localmente, assim como foi observada uma maior sobrevida livre de doença local. A análise multivariada revelou

que a homozigose do alelo 241Met aumenta em mais de 12 vezes a precocidade para o desenvolvimento de recidiva e em mais de 33 vezes a recidiva local, quando comparado com o alelo Thr241.

A literatura atual não é muito extensa quando se refere aos polimorfismos dos genes XRCC3 em relação a radioterapia. Dos estudos que foram encontrados, pode-se citar o de Li et al (2006), porém o grupo não encontrou nenhuma relação do polimorfismo XRCC3 com a sobrevida global, o que permitiu o que o mesmo inferisse um papel menos influente deste polimorfismo na resposta a radiosensibilidade. Caso semelhante foi observado no estudo de Vodicka et al (2007), onde o autor também não encontrou qualquer significância em nenhum dos genótipos.

Apesar desta ausência de significância encontrada nos estudos, este polimorfismo tem sido amplamente estudado, já que o mesmo participa a via de recombinação homóloga, que corrige quebras causadas nas duas fitas do DNA e são potencialmente letais e comumente causadas pela radioterapia.

No presente estudo, foi possível observar que este polimorfismo pode ser utilizado como um bom marcador para a radiosensibilidade e que a presença do alelo Met está relacionado ao pior prognóstico, visto que está associado com a precocidade de recidiva local e doença específica.

Porém, foi possível observar resultado contrário na análise de recidiva geral. Para esta característica, o alelo Thr241 foi encontrado mais frequentemente nos casos que recidivaram regionalmente e mais frequentemente nos casos que não recidivaram localmente, sendo ambos os casos pacientes tratados com radioterapia.

Não foi encontrada na literatura nenhum relato deste gênero. Supõe-se que tal resultado se deva ao tipo de tratamento aplicado e ação do alelo 241Met (alelo relacionado ao pior prognóstico de recidiva local e sobrevida de doença específica) sobre o sistema de reparo.

A literatura traz que o alelo 241Met tem sido associado ao reparo defeituoso dos danos induzidos por raios-X (AU et al., 2003). Além disso, diversos estudos como o

de Kiethubthew et al (2006) e de Bastos et al (2009) identificaram que o alelo variante aumenta o risco do desenvolvimento dos cânceres orais e de tireóide.

Assim, como a radioterapia é um tratamento aplicado localmente, atingindo minimamente tecidos adjacentes, não há danos extras causados pela radioterapia que necessitem de reparo nas demais regiões do corpo. Conseqüentemente, mesmo que o indivíduo seja portador de um alelo que diminua sua capacidade de reparo, como no caso do alelo 241Met do gene XRCC3, os danos são corrigidos a um nível suficiente para não piorar o prognóstico do paciente. Porém quando os danos no DNA são aumentados pela ação da radioterapia, a presença do alelo 241Met, leva a uma insuficiência local do reparo, piorando a sobrevida do paciente.

Molecularmente, a proteína gerada por XRCC3 desempenha um papel de estabilização dos multímeros da proteína RAD51 no sítio de reparo de quebras de duplas de DNA e sua deficiência pode levar a insuficiência da recombinação homóloga após a radiação. O segmento do gene XRCC3 que inclui os aminoácidos 63 a 346 são uma região de ligação com a RAD51, sendo os aminoácidos Tyr139 e Phe249 essenciais para essa interação. Quando ocorre a substituição de uma treonina por uma metionina na posição 241, esta passa a interagir com a Phe249, o que pode interferir na ligação com a RAD51. Desse modo, acredita-se que tal modificação interfira na formação do complexo com a proteína RAD51 prejudicando o sistema de reparo (BASTOS et al., 2009).

Na análise do polimorfismo RAD51 de casos de CE oral e de orofaringe não irradiados, foi encontrada diferença estatisticamente significativa para a recidiva local, onde a presença do alelo G é mais frequente em casos que não recidivaram localmente, conseqüentemente, a análise multivariada demonstrou que a presença do alelo C aumenta em mais de 3 vezes a chance de recidiva local, comparada a ausência do mesmo alelo.

A análise de sobrevida livre de doença local no mesmo grupo de pacientes, também apresentou resultados significativos. A análise multivariada mostra que a presença do alelo C aumenta em mais de 2 vezes o risco de precocidade de recidiva local.

O estudo de Li et al (2006), que analisou pacientes com câncer de pâncreas tratados com radioterapia, não encontrou nenhuma relação deste polimorfismo com a sobrevida; O estudo de Gordon et al (2006), analisou pacientes com câncer retal e não relatou relação deste polimorfismo com recorrência, status linfonodal ou quimioradioterapia, corroborando nossos resultados. Nosso estudo observou que o alelo C é responsável pelo pior prognóstico do paciente, porém tal resultado não está relacionado a resposta radioterápica, visto que essa observação foi em pacientes não irradiados.

O estudo de Werbrouck et al (2008) relata que o genótipo GC tem um efeito protetor sobre o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. O estudo de Wang et al (2013) destaca que o genótipo CC está associado ao aumento no risco de desenvolvimento de câncer de mama, o que acredita estar relacionado ao fato da RAD51 estar estritamente relacionada a família gênica BRCA, principal gene causador do câncer de mama, sendo este o resultado mais conclusivo que se tem a respeito dos efeitos dos genótipos do polimorfismo em questão.

É consenso na literatura, que o alelo C aumenta a atividade do promotor, o que deveria aumentar a atividade de reparo, porém neste caso o que ocorre é o contrário, o aumento da atividade do promotor resulta em uma diminuição da atividade da RAD51, que conseqüentemente irá levar a uma atividade de reparo diminuída, aumentando também o risco de tumorigênese, o que explica o pior prognóstico dos pacientes na presença do alelo C (BORCHIELLINI et al., 2008; SHIN et al., 2008; WANG et al., 2013).

Quanto aos demais polimorfismos (ERCC1 Asn118Asn e XRCC1 Arg194Trp) este trabalho não obteve resultados significativos em nenhum dos casos estudados. O polimorfismo ERCC1 Asn118Asn tem sido mais amplamente estudado, por atuar em duas vias distintas de reparo, corrigindo tanto quebra em fita simples quanto quebra em fita dupla (VAEZI et al., 2011).

Quanto as regiões anatômicas, pode-se concluir que o polimorfismo XRCC1 Arg399Gln em paciente irradiados, apresenta uma piora de prognóstico em pacientes com CE oral e de orofaringe, quando na presença do alelo 399Gln. Já o polimorfismo XPC Lys939Gln, apresentou piora de prognóstico na presença do alelo

939Gln para pacientes com CE oral e orofaringe irradiados. O polimorfismo XRCC3 Thr241Met, apresentou piora de prognóstico nos pacientes com CE de laringe irradiados quando na presença do alelo 241Met.

Essa diferença observada entre as regiões anatômicas, pode ser explicada pelas diferenças existentes entre as características de diferenciação genética, fisiológica e morfológica da região anatômica em questão, que conseqüentemente irão influenciar no prognóstico devido ao tratamento utilizado e a resposta individual de cada paciente.

Genes de reparo são essenciais para manter a estabilidade genética, o que conseqüentemente evita o processo carcinogênico, independente da região anatômica. Espera-se que após a aplicação da radioterapia, que eleva os danos ao DNA, os sistemas de reparo passem a agir com maior intensidade, assim células com sistema de reparo deficiente tenderiam a morrer mais, aumentando a radiosensibilidade tumoral. Porém, diante dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se notar que o previsto nem sempre ocorre.

A radiosensibilidade não se dá apenas pelo número de células que são afetadas e mortas pelo tratamento radioterápico, mas também por um conjunto de interações moleculares e cascatas que são ativadas após o tratamento. Além disso, os efeitos da radioterapia estão ligados a características individuais de cada paciente, pré-determinadas principalmente por fatores genéticos.

Em alguns casos de polimorfismos aqui tratados, foi possível notar que mesmo com a atividade de reparo diminuída, a radiosensibilidade não aumentou, geralmente piorando o prognóstico do paciente. É consenso, que a presença destes alelos pioraria o prognóstico do paciente, já que leva a maior instabilidade genética e a carcinogênese. Porém, aqui o diferencial é que foi incluído nas análises a influência do tratamento radioterápico e pode-se prever diante dos resultados obtidos que a falha no reparo influencia mais fortemente no prognóstico do paciente do que no próprio tratamento radioterápico.

Pode-se supor que um sistema de reparo eficiente, em perfeito funcionamento, tem a capacidade não de apenas corrigir danos perigosos, mas também de encaminhar

células sem capacidade de reparo para as vias apoptóticas, evitando assim o acúmulo de mutações e mantendo um fenótipo menos agressivo, aumentando a radiosensibilidade tumoral.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados, conclui-se que o alelo XRCC1 399Gln em pacientes com CE oral e de orofaringe, XPC 939Gln em pacientes com CE oral e de orofaringe e XRCC3 241Met em pacientes com CE de laringe, todos tratados com radioterapia podem ser utilizados como marcadores de pior prognóstico.

Já a presença do alelo C no polimorfismo RAD51 -98G>C em pacientes com CE oral e de orofaringe é também marcador de pior prognóstico, porém sem relação com o tratamento radioterápico.

Observou-se que diferentes regiões anatômicas da cabeça e pescoço (oral, orofaringe e laringe) respondem de modo diferente à presença de um determinado polimorfismo, possivelmente modificando o prognóstico e a resposta radioterápica do paciente.

Adicionalmente, pacientes portadores de variações genéticas que diminuem a eficiência da maquinaria de reparo do DNA não respondem melhor a radioterapia, apresentando pior prognóstico, diferentemente do que se esperava, levando a crer que a diminuição na atividade de reparo leve a um acúmulo de mutações.

Em resumo, houve associações biologicamente plausíveis entre determinados polimorfismos e a resposta radioterápica do paciente, sugerindo que o uso de marcadores genéticos que auxiliem a decisão do protocolo terapêutico é viável.

Referências

Bibliográficas

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, R. et al. Laryngeal cancer risk associated with smoking and alcohol consumption is modified by genetic polymorphisms in ERCC5, ERCC6 and RAD23B but not by polymorphisms in five other nucleotide excision repair genes. **Int J Cancer**, v. 125, n. 6, p. 1431-9, 2009.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da célula**. (5ª ed.) Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALMEIDA, V. L. L., A. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALVARENGA, L. et al. Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, p. 68-73, 2008.

AQUILINA, G.; BIGNAMI, M. Mismatch repair in correction of replication errors and processing of DNA damage. **J Cell Physiol**, v. 187, n. 2, p. 145-54, 2001.

AU, W. W.; NAVASUMRIT, P.; RUCHIRAWAT, M. Use of biomarkers to characterize functions of polymorphic DNA repair genotypes. **Int J Hyg Environ Health**, v. 207, n. 4, p. 301-13, 2004.

BARRIOS, R. et al. Levels of scientific evidence of the quality of life in patients treated for oral cancer. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 18, n. 4, p. e578-84, 2013.

BASTOS, H. N. et al. Association of polymorphisms in genes of the homologous recombination DNA repair pathway and thyroid cancer risk. **Thyroid**, v. 19, n. 10, p. 1067-75, 2009.

BEGG, A. C.; STEWART, F. A.; VENS, C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 4, p. 239-53, 2011.

BERRA, C. M. Menck, C.F.M; MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, p. 1340-1344, 2006.

BOHRER, P. L. **Avaliação dos mecanismos de reparo de DNA por recombinação em células de carcinoma epidermóide de boca**. 2009. 94 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica). Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RioGrande do Sul, 2009.

BORCHIPELLINI, D. et al. The impact of pharmacogenetics on radiation therapy outcome in cancer patients. A focus on DNA damage response genes. **Cancer Treat Rev**, v. 38, n. 6, p. 737-59, 2012.

BOYLE, P. LEVIN., B. **World cancer report 2008**. Lyon: Who press 2008.

BRAKENHOFF, R. H. Cancer. Another NOTCH for cancer. **Science**, v. 333, n. 6046, p. 1102-3, 2011.

CAHALI, B. et al. Malignant Nasosinusal Tumors: Presentation Spectrum in the Latest 15 Years. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 65, p. 296-300, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **A global concern**. Disponível em: http://www.cdc.gov/cancer/dcpc/resources/world_cancer_day.htm. Acesso em 20. dez. 2013.

CHAWAPUN, N. Update on clinical radiobiology. **Biomed Imaging Interv J**, v. 2, n. 1, p. e22, 2006.

CHU, Y. H. et al. Impacts of microRNA gene polymorphisms on the susceptibility of environmental factors leading to carcinogenesis in oral cancer. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e39777, 2012.

COLOMBO, J. Rahal., P. Genética de cancer de cabeça e pescoço. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, v. 55, p. 165-174, 2009.

DEDIVITIS, R. A. et al. Clinic and epidemiologic characteristics in the with squamous cell carcinoma of themouth and oropharynx. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, p. 35–40, 2004.

DELANEY, G. et al. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. **Cancer**, v. 104, n. 6, p. 1129-37, 2005.

DING, Y. et al. Protection of dietary polyphenols against oral cancer. **Nutrients**, v. 5, n. 6, p. 2173-91, 2013.

DUARTE, M. C. et al. Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 in a Brazilian population. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 397-401, 2005.

DUFLOTH, R. M. **Carcinoma de mama hereditário em mulheres brasileiras: Mutações dos genes BRCA1 E BRCA2, polimorfismos dos genes de reparo do DNA e caracterização imunoistoquímica pela técnica de tissue microarray**. 2004. 132 f. Tese (Doutorado em Tocoginecologia)-Programa de Pós Graduação em Tocoginecologia, . Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

FERREIRA, C. G; ROCHA, J.C.C. **Oncologia Molecular**. (2ª ed.). Rio de Janeiro: Atheneu, 2010.

FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia Geral**. (3ª ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GALBIATTI, A. L. S. et al. Head and neck cancer: genetic polymorphisms and folate metabolism. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 78, n. 1, p. 132-139, 2012.

GAO, R. et al. Genetic polymorphisms in XRCC1 associated with radiation therapy in prostate cancer. **Cancer Biol Ther**, v. 10, n. 1, p. 13-8, 2010.

GOODE, E. L.; ULRICH, C. M.; POTTER, J. D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 11, n. 12, p. 1513-30, 2002.

GORDON, M. A. et al. Genomic profiling associated with recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. **Pharmacogenomics**, v. 7, n. 1, p. 67-88, 2006.

GREENE, F.L. et al. **AJCC (American Joint Committee on Cancer): Manual for Staging of Cancer**. V. 6. New York: Springer-Verlag; 2002.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução a genética**. (9ª ed.). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008.

HAN, S. et al. Epidemiology and cost analysis for patients with oral cancer in a university hospital in China. **BMC Public Health**, v. 10, p. 196, 2010.

HORGAN, A. M. et al. Pharmacogenetic and germline prognostic markers of lung cancer. **J Thorac Oncol**, v. 6, n. 2, p. 296-304, 2011.

HU, R. et al. [Association of polymorphisms of N372H in BRCA2 gene and 135G/C in RAD51 gene and breast cancers]. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 39, n. 6, p. 973-5, 2008.

HUANG, S. H.; O'SULLIVAN, B. Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 18, n. 2, p. e233-40, 2013.
INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que é câncer? Instituto Nacional do Câncer**, 2012. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 13. dez. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de atenção a saúde. Instituto nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Flama , 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de atenção a saúde. Instituto nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Flama , 2014

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que é câncer?** 2012. Disponível em < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em 17 dez. 2013.

JANION, C. Some Provocative Thoughts on Damage and Repair of DNA. **J Biomed Biotechnol**, v. 1, n. 2, p. 50-51, 2001.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2007. **CA Cancer J Clin**, v. 57, n. 1, p. 43-66, 2007.

JI, G. et al. XPC 939A>C and 499C>T polymorphisms and skin cancer risk: a meta-analysis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 10, p. 4983-8, 2012.

KIETTHUBTHEW, S. et al. Polymorphism in DNA repair genes and oral squamous cell carcinoma in Thailand. **Int J Hyg Environ Health**, v. 209, n. 1, p. 21-9, 2006.

KO, C.; CITRIN, D. Radiotherapy for the management of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Dis**, v. 15, n. 2, p. 121-32, 2009.

KOMAR, A. A. Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 8, p. 1075-80, 2007.

KRISHNA PRASAD, R. B.; SHARMA, A.; BABU, H. M. An insight into salivary markers in oral cancer. **Dent Res J (Isfahan)**, v. 10, n. 3, p. 287-295, 2013.

KUMAR, A. et al. Associated risk of XRCC1 and XPD cross talk and life style factors in progression of head and neck cancer in north Indian population. **Mutat Res**, v. 729, n. 1-2, p. 24-34, 2012.

LAMAS, M. J. et al. X-ray cross-complementing group 1 and thymidylate synthase polymorphisms might predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer patients. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 82, n. 1, p. 138-44, 2012.

LEE, J. J. et al. Global assessment of genetic variation influencing response to retinoid chemoprevention in head and neck cancer patients. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 4, n. 2, p. 185-93, 2011.

LI, D. et al. Single nucleotide polymorphisms of RecQ1, RAD54L, and ATM genes are associated with reduced survival of pancreatic cancer. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 11, p. 1720-8, 2006.

LI, R. et al. Distinct epidemiologic characteristics of oral tongue cancer patients. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 148, n. 5, p. 792-6, 2013.

LIMA, L. M. et al. DNA repair gene excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in head and neck squamous cell carcinoma: analysis of methylation and polymorphism (G19007A), protein expression and association with epidemiological and clinicopathological factors. **Histopathology**, v. 60, n. 3, p. 489-96, 2012.

LIMA, L. M. C. **Imunolocalização, metilação e polimorfismo do gene ERCC1 em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço: correlação com parâmetros clínicos, controle locorregional e sobrevida**. 2011. 143 f. Tese (Doutorado em Radiologia)- Programa de Pós Graduação em Educação, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MANGONI, M. et al. Association between genetic polymorphisms in the XRCC1, XRCC3, XPD, GSTM1, GSTT1, MSH2, MLH1, MSH3, and MGMT genes and radiosensitivity in breast cancer patients. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 81, n. 1, p. 52-8, 2011

MANOLIO, T. A. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. **N Engl J Med**, v. 363, n. 2, p. 166-76, 2010.

MOORE, K.; FORD, P.; FARAH, C. Support needs and quality of life in oral cancer: a systematic review. **Int J Dent Hyg**, 2013.

NATIONAL CENTER BIOTECHNOLOGY INFORMATION. RAD51 RAD51 recombinase [Homo sapiens (human)]. **NATIONAL CENTER BIOTECHNOLOGY INFORMATION**, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5888> >. Acesso em: 2. dez. 2013.

NELKE, K. H. et al. Human papillomavirus and its influence on head and neck cancer predisposition. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 67, p. 610-6, 2013.

OLIVEIRA, M. V. M. F., C.A.C.; GUIMARÃES, A.L.S. Mismatch repair complexes: mechanisms and functions. **Unimontes científica**, v. 11, p. 31-36, 2009.

OLSHAN, A. F. et al. XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer. **Cancer Lett**, v. 178, n. 2, p. 181-6, 2002.

PAPAGERAKIS, S. et al. The circadian clock in oral health and diseases. **J Dent Res**, v. 93, n. 1, p. 27-35, 2014.

PARLIAMENT, M. B.; MURRAY, D. Single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes as predictors of radioresponse. **Semin Radiat Oncol**, v. 20, n. 4, p. 232-40, 2010.

PEREZ-ORDONEZ, B.; BEAUCHEMIN, M.; JORDAN, R. C. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Pathol**, v. 59, n. 5, p. 445-53, 2006.

PETERS, T. T. et al. Relation Between Age, Comorbidity, and Complications in Patients Undergoing Major Surgery for Head and Neck Cancer. **Ann Surg Oncol**, 2013.

PICCININ, S. et al. Microsatellite instability in squamous cell carcinomas of the head and neck related to field cancerization phenomena. **Br J Cancer**, v. 78, n. 9, p. 1147-51, 1998.

PONTES, H. A. R. A., M.C.F; MESQUITA, R.A; PONTES, F.S.C; JÚNIOR, J.B.S. Imunoexpressão da proteína de reparo hMSH2 em queilite actínica e mucosa labial normal. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, p. 23-30, 2005.

PRAMANIK, S. et al. DNA repair gene polymorphisms at XRCC1, XRCC3, XPD, and OGG1 loci in Maharashtrian population of central India. **Chemosphere**, v. 82, n. 7, p. 941-6, 2011.

PRATESI, N. et al. Association between single nucleotide polymorphisms in the XRCC1 and RAD51 genes and clinical radiosensitivity in head and neck cancer. **Radiother Oncol**, v. 99, n. 3, p. 356-61, 2011.

RAMACHANDRAN, S. et al. Single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XPD and its molecular mapping in Indian oral cancer. **Oral Oncol**, v. 42, n. 4, p. 350-62, 2006.

REIBEL, J. Tobacco and oral diseases. Update on the evidence, with recommendations. **Med Princ Pract**, v. 12 Suppl 1, p. 22-32, 2003.

REID, B. C. et al. Head and neck in situ carcinoma: incidence, trends, and survival. **Oral Oncol**, v. 36, n. 5, p. 414-20, 2000.

ROHR, P. **Influência de polimorfismos em genes de reparo no risco ocupacional de viticultores do Rio Grande do Sul**. 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular)- Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.

ROUISSI, K. et al. The effect of tobacco, XPC, ERCC2 and ERCC5 genetic variants in bladder cancer development. **BMC Cancer**, v. 11, p. 101, 2011.

RUYCK, K. **Radiogenomics in gynecological cancer patients**. 2007. 168 f. Thesis. (Doctor of Medical Sciences). Department of Human Anatomy, Embryology, Histology and Medical Physics, Faculty of Medicine and Health Sciences, 2007.

SCHUIJER, M.; BERNIS, E. M. TP53 and ovarian cancer. **Hum Mutat**, v. 21, n. 3, p. 285-91, 2003.

SHIN, A. et al. Genotype-phenotype relationship between DNA repair gene genetic polymorphisms and DNA repair capacity. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 9, n. 3, p. 501-5, 2008.

SILVA, P. et al. Clinical and biological factors affecting response to radiotherapy in patients with head and neck cancer: a review. **Clin Otolaryngol**, v. 32, n. 5, p. 337-45, 2007.

SINHA, N. et al. Relevance of cancer initiating/stem cells in carcinogenesis and therapy resistance in oral cancer. **Oral Oncol**, v. 49, n. 9, p. 854-62, 2013.

SMITH, K. C. Recombinational DNA repair. **Photo Biology**, 2008. Disponível em: <<http://www.photobiology.info/recRepair.html>>. Acesso em: 21. dez. 2013.

SOBTI, R. C. et al. XRCC1 codon 399 and ERCC2 codon 751 polymorphism, smoking, and drinking and risk of esophageal squamous cell carcinoma in a North Indian population. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 175, n. 2, p. 91-7, 2007.

STURGIS, E. M. et al. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 11, p. 2125-9, 1999.

TADDEI, M. L. et al. Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out. **Cancer Lett**, v. 341, n. 1, p. 80-96, 2013.

UNION FOR INTERNATIONAL CANCER CONTROL. **TNM Classification of malignant tumours**. (6^aed.), 2004.

UNIPROT KB. Q06609 (RAD51_HUMAN) Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot. **UniProt Kb** 2013. Disponível em: < <http://www.uniprot.org/uniprot/Q06609> >. Acesso em: 20. dez. 2013.

VAEZI, A.; FELDMAN, C. H.; NIEDERNHOFER, L. J. ERCC1 and XRCC1 as biomarkers for lung and head and neck cancer. **Pharmgenomics Pers Med**, v. 4, p. 47-63, 2011.

VODICKA, P. et al. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 5, p. 757-63, 2004.

VODICKA, P. et al. Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 657-64, 2007.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 307-10, 2000.

WANG, F. et al. Genetic variants of nucleotide excision repair genes are associated with DNA damage in coke oven workers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 19, n. 1, p. 211-8, 2010.

WANG, M. et al. Molecular epidemiology of DNA repair gene polymorphisms and head and neck cancer. **J Biomed Res**, v. 27, n. 3, p. 179-92, 2013.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral health risks of tobacco use and effects of cessation. **International Dental Journal**, v. 60, 2012.

WEINBERG, R. A. **A biologia do câncer**. (1^a ed.). Porto Alegre: Artmed: 2008.

WERBROUCK, J. et al. Single-nucleotide polymorphisms in DNA double-strand break repair genes: association with head and neck cancer and interaction with tobacco use and alcohol consumption. **Mutat Res**, v. 656, n. 1-2, p. 74-81, 2008.

WU, X. et al. Genetic variations in radiation and chemotherapy drug action pathways predict clinical outcomes in esophageal cancer. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 23, p. 3789-98, 2006.

YANG, P. W. et al. The survival impact of XPA and XPC genetic polymorphisms on patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Ann Surg Oncol**, v. 20, n. 2, p. 562-71, 2013.

YIN, Z. et al. Association between polymorphisms in DNA repair genes and survival of non-smoking female patients with lung adenocarcinoma. **BMC Cancer**, v. 9, p. 439, 2009.

Anexos

8 ANEXOS

Protocolo de aprovação de Comitê de Ética em Pesquisa.



**COMPLEXO HOSPITALAR HELIÓPOLIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

APROVAÇÃO

São Paulo, 03 de outubro de 2003.

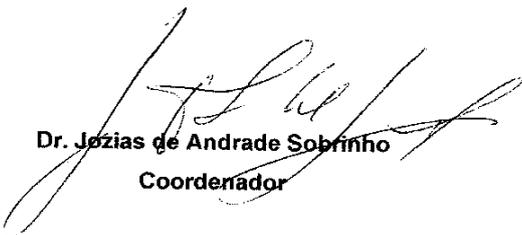
Ao

Dr. Marcos Brasilino de Carvalho.

Informamos que adendo do projeto de pesquisa "Identificação de marcadores tumorais para o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e avaliação de sua relevância clínica e estado nutricional" registrado neste CEP sob nº 135, foi aprovada por este Comitê de Ética em Pesquisa no dia 03/10/2003.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL HELIÓPOLIS
Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
Coordenador

Atenciosamente,


Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
Coordenador