

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

**LIDIANE PIGNATON AGOSTINI**

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES ATM, TP53, BCL2 E TGF $\beta$   
RELACIONADOS COM O PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO:  
RELAÇÃO COM RADIOSENSIBILIDADE TUMORAL**

VITÓRIA

2014

**LIDIANE PIGNATON AGOSTINI**

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES ATM, TP53, BCL2 E TGF $\beta$   
RELACIONADOS COM O PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO:  
RELAÇÃO COM 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-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti

VITÓRIA

2014

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

---

A275e Agostini, Lidiane Pignaton, 1988 -  
Avaliação de polimorfismos dos genes ATM, TP53, BCL2 e TGF $\beta$  relacionados com o prognóstico de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: relação com radiosensibilidade tumoral / Lidiane Pignaton Agostini. – 2014. 98 f. : il.

Orientador: Lúri Drumond Louro.

Coorientador: Adriana Madeira Álvares 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. Polimorfismo (Genética). I. Louro, Lúri Drumond. II. Conforti, Adriana Madeira Álvares da Silva. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---



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

---

“Avaliação de Polimorfismos dos Genes ATM, TP53, BCL2 e TGF $\beta$   
Relacionados com o Prognóstico de Pacientes com Carcinoma Epidermoide de  
Cabeça e Pescoço: Relação com Radiossensibilidade Tumoral”

Lidiane Pignaton Agostini

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção  
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada por:

---

Prof. Dr. Iúri Drumond Louro (UFES)

Orientador

---

Prof.ª Dr.ª Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti (UFES)

Coorientadora

---

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães (UFES)

Membro Interno

---

Prof. Dr. Magnus Régios Dias da Silva (UNIFESP)

Membro Externo

Vitória-ES, 26 de Fevereiro de 2014.

## AGRADECIMENTOS

À UFES e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela possibilidade de desenvolver esse trabalho e me formar Mestre.

Ao CNPq e à FAPES, pelo apoio financeiro.

À CAPES, pela bolsa de estudo.

Ao GENCAPO, representado pelo Dr. Brasilino de Carvalho e pela Dr<sup>a</sup> Eloíza Tajara, por permitirem o uso das amostras de DNA utilizadas nesse estudo.

Ao Lúri, pela orientação, ensinamentos e conversas. Também pela possibilidade de desenvolver um projeto sem pressão e sem cobranças, tornando o trabalho muito mais prazeroso.

À Adriana, pela co-orientação e por permitir que a ideia desse trabalho chegasse até o NGHМ. Muito obrigada pelas participações nos congressos e pelas aproximações ocorridas nessas situações.

Aos professores Dr. Magnus e Dr. Marco, por aceitarem compor a banca examinadora.

Ao Cris, meu amor, amigo e companheiro, por sempre me apoiar e me incentivar a ser verdadeiramente Mestre. Obrigada pela paciência, compreensão e ajuda, especialmente nos últimos meses. Sei que posso contar com você pelos próximos quatro anos!

Aos meus pais, Darli e Helena, por sempre colocarem a minha educação como prioridade e me apoiarem na realização do mestrado. À Maria Cecília, minha sobrinha linda, que nos momentos de estresse me ajudava a acalmar e permitia que eu voltasse recuperada, e ao João [*in memorian*], meu sobrinho, que em seus cinco meses de vida também trouxe alegrias às pessoas ao redor.

À Elaine, por ser minha amiga e companheira de trabalho. A realização desse trabalho se tornou mais fácil porque fizemos juntas, compartilhando os sucessos e também os problemas, enquanto conversávamos sobre tudo.

Ao Marcelo, pela ajuda em todas as fases de realização do trabalho e pelos conhecimentos passados sempre com paciência.

Às amigas do NGHМ Gabriela, Daniela, Clara, Raquel, Fernanda, Danielle e Jéssica, por toda amizade, convivência e ajuda no desenvolvimento do trabalho. Vocês tornaram o ambiente do laboratório mais tranquilo e alegre, mesmo nos dias mais cansativos e difíceis, quando tudo dava errado. E ao Victor, pelas conversas sobre séries, filmes e animes que também tornavam o ambiente mais descontraído.

À todos os colegas de laboratório como Vitor, Raquel Reis, Quézia, Lucas, Suzanny, que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho. Muito obrigada!

*“All scientific work is incomplete - whether it be observational or experimental. All scientific work is liable to be upset or modified by advancing knowledge. That does not confer upon us a freedom to ignore the knowledge we already have, or postpone the action that it appears to demand at a given time.”*

Sir Austin Bradford Hill, 1965

## RESUMO

Polimorfismos em genes relacionados ao reparo de DNA, controle do ciclo celular, apoptose e transcrição de citocinas são apontados como marcadores de prognóstico e de radiosensibilidade em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP), além de influenciarem na resposta ao tratamento radioterápico. Dessa forma, com o intuito de avaliar a relação entre os polimorfismos ATM IVS62+60G>A, ATM Asp1853Asn, TP53 Arg72Pro, BCL2 -938C>A, TGF $\beta$  Pro10Leu e TGF $\beta$  -509C>T e o prognóstico e a resposta ao tratamento de pacientes com CECP, foi realizada a técnica de PCR-RFLP. A genotipagem foi realizada em amostras de DNA extraído a partir do sangue periférico de 210 pacientes com CE oral e de orofaringe e de 101 pacientes com CE de laringe. Em pacientes com CE oral e de orofaringe submetidos à radioterapia, o genótipo ATM IVS62+60AA aumenta o risco de ocorrência de recidiva local (OR=4,43; CI=1,22-16,13) e os alelos BCL2 -938C e TGF $\beta$  -509T estão relacionados com a pior sobrevida doença específica (HR=0,46; CI=0,24-0,90 e HR=2,20; CI=1,12-4,29, respectivamente). Já em pacientes com CE oral e de orofaringe não submetidos à radioterapia, a homozigose TP53 Pro72 aumenta o risco de óbito (OR=2,65; CI=1,05-6,65). Em pacientes com CE de laringe irradiados, o alelo TGF $\beta$  Pro10 foi associado com o aumento do risco de ocorrência de recidiva local (OR=0,09; CI=0,02-0,53) e de óbito (OR=0,18; CI=0,04-0,86), e com a pior sobrevida livre de doença local e sobrevida doença específica (HR=0,13; CI=0,03-0,59 e HR=0,21; CI=0,07-0,60, respectivamente). O alelo BCL2 -938C também foi relacionado com a pior sobrevida doença específica nesses pacientes (HR=0,32; CI=0,12-0,83). Já o alelo TGF $\beta$  -509T foi correlacionado com o aumento do risco de óbito em pacientes com CE de laringe não irradiados (OR=9,11; CI=1,51-27,91). Assim, é possível que esses polimorfismos sejam importantes marcadores genéticos de radiosensibilidade tumoral, sendo candidatos a comporem um perfil genético preditivo de prognóstico em resposta à radioterapia.

**Palavras-chave:** Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Radiossensibilidade. Prognóstico. Polimorfismos.



## ABSTRACT

Polymorphisms in genes that control DNA repair, cell cycle, apoptosis and cytokine transcription, are pointed as putative prognosis and radiosensitivity markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) patients. We have typed polymorphisms ATM IVS62+60G>A, ATM Asp1853Asn, TP53 Arg72Pro, BCL2 -938C>A, TGF $\beta$  Pro10Leu and TGF $\beta$  -509C>T in order to establish correlations with prognosis and treatment response in HNSCC patients, using the PCR-RFLP technique. Genotyping was performed using peripheral blood DNA from 210 patients with oral and oropharyngeal tumors and 101 patients with larynx tumors. In patients with oral and oropharyngeal tumors submitted to radiotherapy treatment, genotype ATM IVS62+60AA increases local relapse risk (OR=4.43; CI=1.22-16.13) and alleles BCL2 -938C and TGF $\beta$  -509T are related with worse disease-specific survival (HR=0.46; CI=0.24-0.90 e HR=2.20; CI=1.12-4.29, respectively). In contrast, patients not submitted to radiotherapy, homozygous TP53 Pro72 increases risk of death (OR=2.65; CI=1.05-6.65). In irradiated larynx tumor patients, allele TGF $\beta$  Pro10 was associated with local relapse risk (OR=0.09; CI=0.02-0.53) and death (OR=0.18; CI=0.04-0.86), as well as with worse local disease-free survival and disease-specific survival (HR=0.13; CI=0.03-0.59 and HR=0.21; CI=0.07-0.60, respectively). Allele BCL2 -938C was associated with worse disease specific survival (HR=0.32; CI=0.12-0.83). TGF $\beta$  -509T was associated with higher risk of death in non-irradiated larynx patients (OR=9.11; CI=1.51-27.91). Therefore, we suggest these polymorphisms as markers of prognosis and radiosensitivity in these tumors.

**Keywords:** Head and neck squamous cell carcinoma. Radiosensitivity. Prognosis. Polymorphisms.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1. Via de sinalização da proteína ATM.** A ativação da proteína ATM, em virtude de danos provocados pela radiação, estimula a reparação do DNA e bloqueia a progressão do ciclo celular. Para desempenhar esse papel, ATM interage com uma ampla rede de proteínas, incluindo fatores de ponto de checagem (CHK1, CHK2), supressores de tumor (p53 e BRCA), fatores de reparo do DNA (RAD50, RAD51, GADD45), e outras moléculas sinalizadoras (c-Abl e NF- $\kappa$ B). Além de regular a reparação do DNA e do ciclo celular, ATM pode também desencadear a apoptose em células tratadas com radiação. Fonte: BioCarta, 2014. ....17

**Figura 2. Via de sinalização da p53.** A p53 é um fator de transcrição cuja atividade é regulada por fosforilação. A função da p53 é impedir o progresso do ciclo celular caso esteja presente algum dano no DNA, seja através de pontos de checagem que permitem o reparo do DNA, ou da apoptose caso os danos persistam. Fonte: BioCarta, 2014. ....20

**Figura 3. Sinalização apoptótica em resposta ao dano no DNA.** Os danos ao DNA induzidos por radiação ou químicos induzem a ativação celular da cascata de caspases, a partir de receptores de morte ou da permeabilização da membrana mitocondrial. O citocromo c é liberado da mitocôndria em resposta aos sinais apoptóticos e ativa a protease Apaf-1, que por sua vez ativa os membros da cascata de caspases proteolíticas. Fonte: BioCarta, 2014. ....22

**Figura 4. Processos chaves envolvidos na fibrogênese induzida por radiação.** A radiação ionizante ativa diretamente o TGF $\beta$ , que também pode ser liberado pelos tecidos endoteliais danificados pela radiação, junto com outras citocinas pró-fibróticas. A radiação também pode gerar ROS, que ativam o TGF $\beta$  e interferem na via de sinalização Smad. Como resposta, o TGF $\beta$  aumenta a deposição de colágeno e de matriz extracelular (ECM). Os danos vasculares e a remodelação tecidual podem levar à hipóxia, um dos mecanismos que leva à resposta fibrogênica. Fonte: Bentzen, 2006. ....25

**Figura 5. Visualização dos fragmentos gerados após a reação de PCR-RFLP.**

a) BCL2 -938C>A: M=marcador de 100 pb; 1=HS CC; 2=Ht CA; 3=HP AA; b) TP53 Arg72Pro: M=marcador de 100 pb; 1=HS Arg/Arg; 2=Ht Arg/Pro; 3=HP Pro/Pro; c) TGFβ Pro10Leu: M=marcador de 100 pb; 1=HS Pro/Pro; 2=Ht Pro/Leu; 3=HP Leu/Leu; d) TGFβ -509C>T: M=marcador de 50 pb; 1=HS CC; 2=Ht CT; 3=HP TT; e) ATM IVS62+60G>A: M=marcador de 50 pb; 1=HS GG; 2=Ht GA; 3=HP AA; f) ATM Asp1853Asn: M=marcador de 50 pb; 1=Ht Asp/Asn; 2=HS Asp/Asp; 3=HP Asn/Asn. HS: Homozigoto Selvagem; Ht: Heterozigoto; HP: Homozigoto Polimórfico.....36

**Figura 6. Sobrevida livre de doença local de pacientes com CE de laringe, submetidos à radioterapia (n=8), associada com o polimorfismo TGFβ Pro10Leu (p<0,001). .....57**

**Figura 7. Sobrevida doença específica de pacientes com CE oral e de orofaringe, submetidos à radioterapia (n=43), associada com o polimorfismo BCL2 -938C>A (p=0,048). .....59**

**Figura 8. Sobrevida doença específica de pacientes com CE oral e de orofaringe, submetidos à radioterapia (n=44), associada com o polimorfismo TGFβ -509C>T (p=0,004). .....60**

**Figura 9. Sobrevida doença específica de pacientes com CE de laringe, submetidos à radioterapia (n=19), associada com o polimorfismo BCL2 -938C>A (p=0,013). .....62**

**Figura 10. Sobrevida doença específica de pacientes com CE de laringe, submetidos à radioterapia (n=19), associada com o polimorfismo TGFβ Pro10Leu (p=0,003). .....64**

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características epidemiológicas dos pacientes diagnosticados com CE oral, de orofaringe e de laringe.....	29
Tabela 2. Condições físicas e fragmentos gerados para cada polimorfismo após a reação de RFLP.....	35
Tabela 3. Características clinicopatológicas dos pacientes diagnosticados com CE oral, de orofaringe e de laringe.....	38
Tabela 4. Características do tratamento dos pacientes diagnosticados com CE oral, de orofaringe e de laringe.....	40
Tabela 5. Dados do acompanhamento prognóstico em pacientes diagnosticados com CE oral, de orofaringe e de laringe.....	41
Tabela 6. Genótipos dos pacientes diagnosticados com CE oral, de orofaringe e de laringe.....	42
Tabela 7. Polimorfismos associados com a recidiva geral e tratamento radioterápico em pacientes diagnosticados com CE oral e de orofaringe.....	45
Tabela 8. Polimorfismos associados com a recidiva geral e tratamento radioterápico em pacientes diagnosticados com CE de laringe.....	46
Tabela 9. Polimorfismos associados com a recidiva local e tratamento radioterápico em pacientes diagnosticados com CE oral e de orofaringe.....	48
Tabela 10. Análise multivariada das margens cirúrgicas e do polimorfismo ATMIVS62+60G>A em pacientes diagnosticados com CE oral e de orofaringe, submetidos à radioterapia e relacionando com a recidiva local.....	49
Tabela 11. Polimorfismos associados com a recidiva local e tratamento radioterápico em pacientes diagnosticados com CE de laringe.....	50

<b>Tabela 12. Análise multivariada das margens cirúrgicas e do polimorfismo TGFβ Pro10Leu em pacientes diagnosticados com CE de laringe, submetidos à radioterapia e relacionando com a recidiva local.....</b>	<b>51</b>
<b>Tabela 13. Polimorfismos associados com o órbita e tratamento radioterápico em pacientes diagnosticados com CE oral e de orofaringe.....</b>	<b>52</b>
<b>Tabela 14. Análise multivariada do estágio e dos polimorfismos TP53 Arg72Pro, TGFβ -509C&gt;T e ATM IVS62+60G&gt;A em pacientes diagnosticados com CE oral e de orofaringe, submetidos ou não à radioterapia e relacionando com o órbita.....</b>	<b>53</b>
<b>Tabela 15. Polimorfismos associados com o órbita e o tratamento radioterápico em pacientes diagnosticados com CE de laringe. ....</b>	<b>54</b>
<b>Tabela 16. Análise multivariada do estágio e dos polimorfismos BCL2 -938C&gt;A, TGFβ -509C&gt;T e TGFβ Pro10Leu em pacientes diagnosticados com CE de laringe, submetidos ou não à radioterapia e relacionando com o órbita. ....</b>	<b>55</b>
<b>Tabela 17. Análise multivariada das margens cirúrgicas e dos polimorfismos TP53 Arg72Pro e TGFβ Pro10Leu em pacientes diagnosticados com CE de laringe, submetidos ou não à radioterapia e relacionando com a sobrevida livre de doença local. ....</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 18. Análise multivariada do estágio e dos polimorfismos BCL2 -938C&gt;A, TGFβ -509C&gt;T e ATM IVS62+60G&gt;A em pacientes diagnosticados com CE oral e de orofaringe, submetidos ou não à radioterapia e relacionando com a sobrevida doença específica.....</b>	<b>61</b>
<b>Tabela 19. Análise multivariada do estágio e dos polimorfismos, BCL2 - 938C&gt;A, TGFβ -509C&gt;T e TGFβ Pro10Leu em pacientes diagnosticados com CE de laringe, submetidos ou não à radioterapia e relacionando com a sobrevida doença específica.....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE SIGLAS

Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato ou ácido aspártico
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
BAK	BCL2 homologous antagonist/killer
BAX	BCL2-associated X protein
BCL2	B-cell lymphoma 2
CE	Carcinoma Epidermóide
CECP	Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço
CHK	Checkpoint Kinase
Leu	Leucina
p53	Proteína supressora tumoral 53
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
Pro	Prolina
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição)
RT	Radioterapia
SNP	Single-nucleotide polymorphism (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TNM	Tumor, Node, Metastasis
TP53	Tumor Protein 53

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>1.1 Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço (CECP)</b> .....	8
<b>1.2 Radioterapia</b> .....	11
<b>1.3 Mecanismos moleculares e radiosensibilidade tumoral</b> .....	15
1.3.1 <i>ATM</i> .....	16
1.3.2 <i>TP53</i> .....	18
1.3.3 <i>BCL2</i> .....	21
1.3.4 <i>TGFβ</i> .....	23
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	26
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	26
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	26
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	27
<b>3.1 Aspectos Éticos</b> .....	27
<b>3.2 Casuística</b> .....	27
<b>3.3 Extração de DNA</b> .....	31
<b>3.4 PCR-RFLP</b> .....	32
<b>3.5 Estatística</b> .....	36
<b>4 RESULTADOS</b> .....	38
<b>4.1 Caracterização clinicopatológica e prognóstica da casuística</b> .....	38

<b>4.2</b>	<b>Análise das frequências genótípicas .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3</b>	<b>Relação dos polimorfismos com a recidiva geral, segundo o sítio tumoral e a modalidade terapêutica.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4</b>	<b>Relação dos polimorfismos com a recidiva local, segundo o sítio tumoral e a modalidade terapêutica.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5</b>	<b>Relação dos polimorfismos com o óbito, segundo o sítio tumoral e a modalidade terapêutica.....</b>	<b>51</b>
<b>4.6</b>	<b>Relação dos polimorfismos com a sobrevida .....</b>	<b>56</b>
	<i>4.6.1 Sobrevida livre de doença local .....</i>	<i>56</i>
	<i>4.6.2 Sobrevida doença específica .....</i>	<i>58</i>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO</b>	<b>.....</b>	<b>90</b>



## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço (CECP)**

O câncer de cabeça e pescoço é uma doença mortal que tem sido evidenciada desde a origem da raça humana e continua a ser um desafio para os pacientes, oncologistas e especialistas em otorrinolaringologia (HEROUI; DANCIU; POPESCU, 2013).

O câncer de cabeça e pescoço é o quarto em incidência e o quinto em mortalidade no mundo na lista das neoplasias mais frequentes, com uma incidência mundial estimada de 780.000 novos casos por ano (COLOMBO; RAHAL, 2009; HEROUI; DANCIU; POPESCU, 2013). Sua taxa de mortalidade atinge 50% dos casos (PEREZ-ORDEÑEZ; BEAUCHEMIN; JORDAN, 2008), sendo que a sobrevida de 5 anos é de 50% para o câncer de laringe e de 30% para o câncer oral e de orofaringe (ADRIEN et al, 2013).

O principal tipo histológico é o Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço (CECP), correspondendo a cerca de 90% dos casos. Os sítios anatômicos que estão incluídos nesse grupo de neoplasias constituem a cavidade oral, que compreende mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua, soalho de língua; faringe, que inclui: orofaringe, nasofaringe, hipofaringe; cavidade nasal e seios paranasais; laringe glótica e supraglótica; e glândulas (HEROUI; DANCIU; POPESCU, 2013). A ocorrência aproximada é de 40% na cavidade oral, 15% na faringe e 25% na laringe, sendo o restante nos demais sítios remanescentes (COLOMBO; RAHAL, 2009).

Esse grupo de neoplasias é mais frequente no sexo masculino do que no feminino, sendo que o CE de cavidade oral é o quinto mais comum em homens e o câncer de laringe é o sétimo. Em mulheres, esses tipos não aparecem entre os dez mais incidentes (INCA, 2014).

No Brasil, estimam-se para o ano de 2014, 11.280 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014). Já para o câncer de laringe, estimam-se 6.870 casos novos em homens e 770 em mulheres. O risco estimado é de 7,03 casos a cada 100 mil homens e de 0,75 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

Na ausência de um único fato de risco associado com o desenvolvimento do CECP, os dois mais importantes fatores de risco, tabaco e álcool, são responsáveis por 72% de todos os casos (WORSHAM et al, 2012). Estudos indicam que o papiloma vírus humano (HPV) é responsável pelo desenvolvimento de alguns casos de CECP e é um fator de risco independente em CE de orofaringe (ANG et al, 2010).

Outros cofatores que podem contribuir para a carcinogênese de cabeça e pescoço incluem a poluição ambiental, exposição à radiação UVA (câncer de lábio), situação socioeconômica desfavorável e certas condições de trabalho associadas às indústrias como a metalúrgica e a petroquímica, assim como a nutrição, a má dentição e a predisposição e suscetibilidade genética (CHOI; MYERS, 2008; INCA, 2014).

Em geral, o tratamento do câncer, incluindo o CECP, é frequentemente baseado em uma estratégia de multimodalidade, comumente envolvendo cirurgia, quimioterapia e radioterapia. O estabelecimento do planejamento terapêutico e do prognóstico dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço baseiam-se principalmente em parâmetros clínicos, radiológicos e histopatológicos, os quais consistem no local do tumor primário e no sistema de estadiamento TNM, ou seja, no tamanho do tumor, na presença de metástase em linfonodos cervicais e de metástase a distância (DESCHLER; DAY, 2008; COLOMBO; RAHAL, 2009). As falhas no tratamento ocorrem na forma de recorrência locorregional, a qual afeta aproximadamente 60% dos pacientes, metástase a distância desenvolvida em 15% a 25% dos pacientes, bem como o aparecimento de um segundo tumor primário (COLOMBO; RAHAL, 2009).

É bastante aceito que a presença de metástase em linfonodos cervicais seja o principal fator prognóstico adverso independente. O câncer de laringe,

especialmente o supraglótico, frequentemente apresenta infiltração local e metástase em linfonodos cervicais. No entanto, tumores apresentando o mesmo estágio clínico podem demonstrar padrões de crescimento e evolução diferentes, sugerindo a necessidade da análise de outros fatores complementares capazes de nortear com maior precisão o prognóstico da doença (COLOMBO; RAHAL, 2009; WORSHAM et al, 2012).

Mundialmente, o estágio inicial (estádio I e II) do CECP é diagnosticado na faixa de 30 a 40% dos casos novos, com expectativa de sobrevivência livre da doença variando entre 60 a 90% após o tratamento local, seja por radioterapia ou cirurgia (WORSHAM et al, 2012; HEROUI; DANCIU; POPESCU, 2013). Quando diagnosticado em estágios iniciais, o câncer de laringe possui um bom prognóstico com alto percentual de cura, variando de 80% a 100% (INCA, 2014).

Nos casos de pacientes que são diagnosticados com a doença localmente avançada (estágios III e IV), o prognóstico é pior, com o risco de recidiva ou de desenvolvimento de metástase à distância maior do que 50% (BROCKSTEIN et al, 2004; HEROUI; DANCIU; POPESCU, 2013). Para esses pacientes, a taxa de sobrevida em 5 anos é menor do que 50%, com redução drástica da qualidade de vida (WORSHAM et al, 2012). Em pacientes com estágio avançado da doença, as terapias locais e à distância apresentam falhas em taxas inaceitavelmente altas quando tratados com uma única modalidade (VOKES et al, 1993; ADELSTEIN; TAN; LAVERTU, 1996; SOO et al, 2005).

Devido às implicações da falha no tratamento local, muitos estudos tem focado em melhorar o controle loco-regional do CECP. O tratamento terapêutico para o CECP tem como principais metas secundárias a preservação da função do órgão, minimizando a toxicidade do tratamento e os impactos da terapia na qualidade de vida (KO; CITRIN, 2009).

Em virtude das diferentes respostas aos tratamentos apresentados pelos pacientes, diversos estudos buscam identificar quais são as características que influenciam no resultado final do tratamento e, conseqüentemente, a sobrevida do paciente. A radioterapia desempenha um papel-chave no tratamento do câncer, sendo que mais

da metade dos pacientes serão submetidos a ela, com eficácia variável (DELANEY et al, 2005), e por isso, também é objeto de estudo de vários grupos de pesquisa.

## 1.2 Radioterapia

A radioterapia (RT) é amplamente usada no tratamento de neoplasias de cabeça e pescoço. Para diferentes sítios, a RT produz melhores resultados funcionais quando comparado à cirurgia e, portanto, é frequentemente usada em abordagens conservadoras. Mesmo para doenças avançadas, a RT pode ser usada como tratamento para a preservação de órgãos, quer combinados com a quimioterapia ou como terapia adjuvante após a cirurgia (MARTA et al, 2013).

O objetivo da radioterapia é entregar uma dose de radiação precisa em um tumor com volume definido com o mínimo de danos quanto possível às células saudáveis ao redor, resultando na erradicação do tumor, no aumento na qualidade de vida e da sobrevivência (DE RUICK, 2007). No tratamento dos pacientes com doenças malignas, a radioterapia utiliza a radiação ionizante dos raios X de alta energia e de elétrons gerados por aceleração linear (MARTA et al, 2013).

A radiação ionizante resulta da ionização e excitações randômicas dentro do material de interação. Dependendo da localização dessas interações no meio celular, os efeitos podem ser classificados como diretos ou indiretos. O efeito direto ocorre quando a radiação deposita a energia diretamente no DNA, o alvo da ionização. No efeito indireto, o dano ao DNA é provocado por espécies reativas produzidas em outro local da célula, normalmente a partir da água e gerando as espécies reativas de oxigênio (ROS), responsáveis pela maior parte dos danos celulares (WEST; BARNETT, 2011).

As lesões produzidas no DNA podem ser na base, no açúcar, na dupla-fita, na fita simples, nas proteínas de ligação ao DNA e nas ligações DNA-DNA. A indução de

quebras na dupla fita de DNA é o principal mecanismo de morte celular pela radioterapia. A resposta de um tumor à radiação é visto pela regressão do mesmo e é determinada pela hipóxia do tumor, proporção de células clonogênicas, radiosensibilidade inerente das células tumorais, e a reparação de danos da radiação (DE RUICK, 2007).

Os danos ao DNA induzidos por radiação iniciam uma série complexa de respostas celulares. Após a detecção de dano por várias proteínas sensores que detectam esses danos ao DNA, elas ativam proteínas transdutoras de sinais que amplificam e diversificam o sinal através de alvos específicos. O resultado dessa cascata inclui o controle do ciclo celular, reparo ao dano de DNA, apoptose e transdução de sinais (BEGG; STERWART; VENS, 2011).

O processo patológico de resposta tecidual à radiação começa imediatamente após a exposição, mas as características clínicas ou histológicas podem não ser visíveis por semanas, meses ou anos após o tratamento. De acordo com o tempo de manifestação dos sintomas, a toxicidade induzida por radiação pode ser classificada como efeitos agudos/iniciais ou tardios (FACHAL et al, 2012; DE RUICK, 2007).

Os efeitos agudos são manifestados durante o tratamento ou nas semanas subsequentes. Embora os efeitos agudos sejam geralmente temporais, a toxicidade severa pode levar, em casos de pacientes com câncer de cabeça e pescoço ou de pulmão, a abandonarem o tratamento ou a ter que diminuir a dose de radiação devido à baixa tolerância dos tecidos normais (FACHAL et al, 2012). Os efeitos agudos aparecem mais em tecidos de rápida proliferação, como tecidos epiteliais e medula óssea, sendo que a radiação induz respostas inflamatórias, problemas vasculares, edemas e eritemas de pele (TERRAZZINO et al, 2012).

Os efeitos tardios aparecem após períodos de latência de meses ou anos e são sentidos em tecidos de proliferação lenta como músculo, rim, fígado e intestino (DE RUICK, 2007). Pode ocorrer o aparecimento de resposta inflamatória aguda, seguida de cicatrização, infiltração celular, deposição de colágeno e interações celulares desreguladas. A associação dessas respostas com a expressão acima do normal de citocinas e fatores de crescimento resulta em fibrose, necrose, atrofia ou dano vascular, dependendo do órgão afetado. Estes efeitos tardios podem trazer

graves consequências aos pacientes, visto que muitas vezes deixam sequelas incuráveis, e tem sido observado que com tratamentos multimodais, o índice de efeitos tardios tem aumentado (TERRAZZINO et al, 2012).

Radiossensibilidade é um termo amplo aplicado a células, tecidos e indivíduos. Diferentes tipos celulares variam em radiossensibilidade, assim como as células de diferentes indivíduos. Alguns tecidos são mais tolerantes a radiação devido à sua organização. Alguns tecidos são sensíveis porque têm um maior nível de proliferação ou apoptose. Os indivíduos também variam em radiossensibilidade e isto pode ser associado à radiossensibilidade celular e/ou instabilidade do genoma (WEST; BARNETT, 2011). A radiossensibilidade tumoral refere-se à resposta prognóstica de um paciente ao tratamento radioterápico.

A variação da resposta tecidual normal à radioterapia pode ser influenciada por muitos fatores, não somente relacionados ao tratamento radioterápico, mas também aqueles relacionados com outros tratamentos ou até mesmo com as características do paciente (BARNETT et al, 2009). Tem sido estimado que até 80% da variação da resposta tecidual pode ser atribuída a fatores genéticos (TURESSON et al, 1996).

Além de algumas mutações raras que muitas vezes acarretam efeitos deletérios, o genoma humano normal apresenta numerosas variações germinais na sequência de DNA, os chamados polimorfismos (BORCHIELLINI et al, 2012). Estas variações podem ser repetições curtas em tandem, variações no número de cópias de um determinado gene ou variação de um único nucleotídeo, muito conhecido como polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) (MANOLIO, 2010).

SNPs podem ser definidos como uma variante de sequência de DNA em que a frequência do alelo menor ocorre em pelo menos 1% da população, sendo responsáveis por aproximadamente 90% da variação das sequências de DNA entre os indivíduos (PETERS et al, 2008). Ao contrário das mutações genéticas, os SNPs são muito frequentes e raramente levam à grandes consequências clínicas (BROOKES, 1999; STONEKING, 2001).

No entanto, tais variações genéticas podem predispor os sujeitos à doença ou influenciar na resposta a um dado tratamento (KOMAR, 2007). Muitos SNPs já foram associados à suscetibilidade ao câncer (DONG et al, 2008). Dados recentes sugerem que estas variações genéticas podem também contribuir com a variabilidade individual da resposta radioterápica em pacientes com câncer (PARLIAMENT; MURRAY, 2010; HORGAN et al, 2011).

Os mecanismos pelos quais os SNPs afetam o fenótipo e influenciam doenças complexas variam de acordo com a sua localização genômica. Substituições nas regiões de codificação podem afetar a sequência de aminoácidos das proteínas, reduzindo ou abolindo funções como ligação ao DNA, atividade catalítica e de contato ligante-receptor. SNPs podem interromper o códon de iniciação ou de terminação, ou introduzir erros no quadro de leitura, gerando peptídeos truncados ou insuficientes. SNPs localizados em regiões reguladoras podem influenciar a expressão do gene, enquanto os SNPs em sequências não codificadoras podem afetar o splicing ou a clivagem, a estabilidade e a exportação do RNA (WJST, 2004).

A radioterapia será o tratamento realizado em aproximadamente metade dos novos casos de câncer, em algum momento do tratamento contra a doença (DE RUICK, 2007). Prevenir ou reduzir os efeitos colaterais é uma prioridade. O desenvolvimento de técnicas capazes de prever a radiosensibilidade individual à radioterapia poderia tornar os tratamentos individualizados. Como consequência, os efeitos adversos seriam diminuídos.

Uma das formas encontradas para prever a radiosensibilidade é através da determinação de um perfil genético individual composto por polimorfismos que afetam a resposta prognóstica ao tratamento radioterápico. Como citado anteriormente, a radiação induz uma resposta que afeta diversos mecanismos moleculares, como o controle do ciclo celular, reparo ao dano de DNA, apoptose e transdução de sinais. Então, analisando genes atuantes nesses processos, poderemos ser capazes de elaborar o perfil genético individual.

### 1.3 Mecanismos moleculares e radiosensibilidade tumoral

Os mecanismos envolvidos na homeostase celular são altamente complexos e integrados. Os genes envolvidos nesses processos exercem suas funções através de uma intrincada rede de interações proteicas, cujo resultado final depende do sucesso em cada fase. Quando ocorrem alterações no nível ou na atividade das proteínas envolvidas, um dos possíveis resultados é o aparecimento de tumores, benignos ou malignos. O câncer pode surgir a partir de mutações em genes supressores tumorais, como o TP53 (Tumor Protein 53), em oncogenes, como o BCL2 (B-Cell Lymphoma 2), e em genes com função supressora e promotora tumoral, como o TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ). Além disso, o seu progresso pode ser influenciado por variações nos genes de reparo do DNA, como o ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), podendo levar ao acúmulo de mutações (FOSTER, 2008).

Quando um tratamento contra o câncer é realizado, como por exemplo, a radioterapia, alterações nesses genes podem influenciar o prognóstico da doença, em função do nível de radiosensibilidade que o tumor apresenta (radiossensibilidade tumoral). Essas variações genéticas podem influenciar no nível de expressão, transporte e eficiência da ação das proteínas (THOMPSON, 2012).

Alterações nos genes de reparo do DNA e de controle do ciclo celular podem levar à variações nos resultados do tratamento radioterápico, seja por favorecer a sobrevivência da célula tumoral com mecanismos super eficientes de reparo e multiplicação celular ou, por outro lado, por acelerar a evolução molecular das células oncológicas ao acumular danos genéticos causados pela radiação (BORCHIELLINI et al, 2012).

Desse modo, é importante entender a atuação dos genes envolvidos nestes mecanismos e que são candidatos a marcadores genéticos da radiosensibilidade tumoral, refletindo em variações no prognóstico desses pacientes.



### 1.3.1 ATM

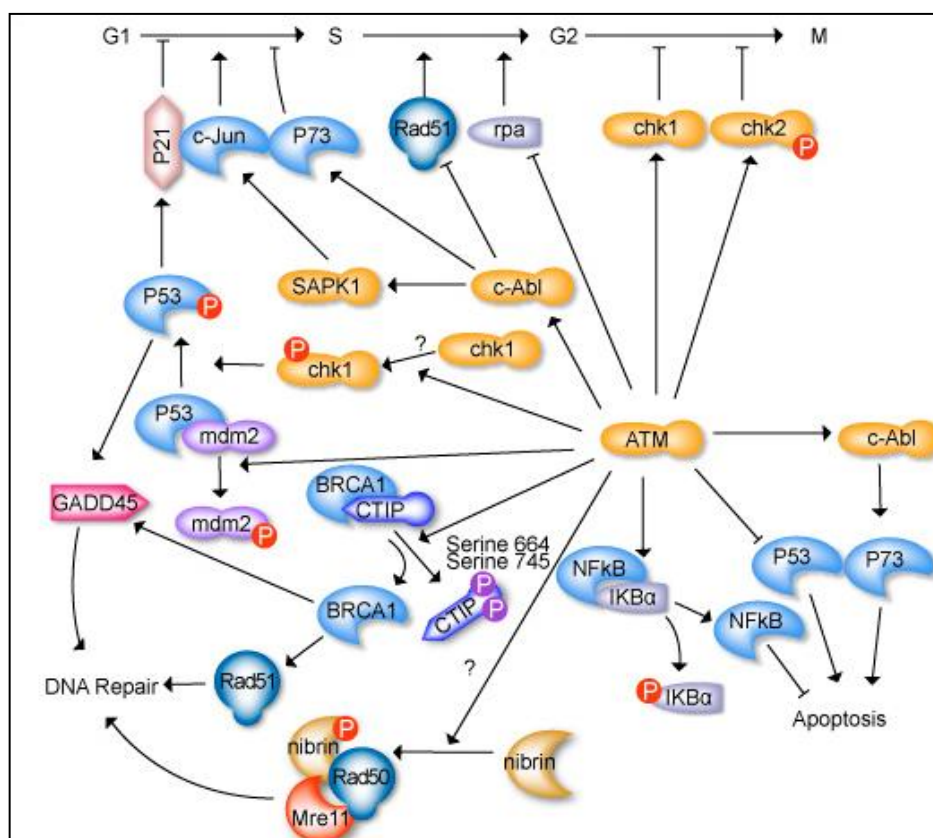
Quando ocorre o dano ao DNA, as células respondem ativando a resposta ao dano de DNA (DDR), o que inclui a ativação dos pontos de controle do ciclo celular, o início de programas de transcrição, e a execução de reparo do DNA ou iniciação da apoptose para manter a integridade do genoma (LEE et al, 2014). Defeitos na DDR ou nas vias de controle mitóticas podem permitir a sobrevivência ou o crescimento contínuo das células com danos genômicos, aumentando assim a probabilidade de transformação maligna (HARTWELL; WEINERT, 1989). Os reguladores chave do ponto de verificação em vias de DDR são as proteínas Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) e proteínas relacionadas com Rad3 (LEE et al, 2014).

O gene ATM está localizado no cromossomo 11Q22-2. O mRNA de 13 kb é montado a partir de 66 éxons distribuídos por um região genômica de 150 kb. A proteína produzida possui 350 kD (PLATZER et al, 1997). A proteína ATM é uma serina-treonina quinase que atua em vários mecanismos importantes envolvidos no reparo de danos induzidos por radiação na dupla fita de DNA, controle dos pontos de checagem do ciclo celular, respostas ao estresse oxidativo e radiosensibilidade (BAKKENIST; KASTAN, 2003; KIM et al, 2013).

ATM exerce os seus efeitos biológicos através da regulação por fosforilação de alvos controladores do ciclo celular como CHK2 e CHK1, supressores tumorais como p53 e BRCA1, fatores de reparo de DNA como RAD50, RAD51, GADD45 e outras moléculas sinalizadoras como c-Abl e NF-KappaB. É ativada pelo complexo Nbs1-MRE11-RAD50 ou pelo 53BP1, que são sensores de dano ao DNA induzidos pela radiação (CREMONA; BEHRENS, 2013). As interações entre a proteína ATM e os seus diferentes substratos, com as respostas biológicas produzidas, estão apresentadas na figura 1.

A perda de função e/ou a expressão aberrante da proteína ATM pode ser a chave para os efeitos colaterais induzidos pela radiação, incluindo pneumonia, fibrose subcutânea e radiosensibilidade (ZHANG et al, 2010). Também é conhecido que alguns polimorfismos podem induzir a baixa expressão do gene ATM ou levar à

desestabilização da proteína ATM e, conseqüentemente, aumentar a radiosensibilidade, estando localizados nas regiões promotoras, codificadoras ou intrônicas (KIM et al, 2006).



**Figura 1. Via de sinalização da proteína ATM.** A ativação da proteína ATM, em virtude de danos provocados pela radiação, estimula a reparação do DNA e bloqueia a progressão do ciclo celular. Para desempenhar esse papel, ATM interage com uma ampla rede de proteínas, incluindo fatores de ponto de checagem (CHK1, CHK2), supressores de tumor (p53 e BRCA), fatores de reparo do DNA (RAD50, RAD51, GADD45), e outras moléculas sinalizadoras (c-Abl e NF- $\kappa$ B). Além de regular a reparação do DNA e do ciclo celular, ATM pode também desencadear a apoptose em células tratadas com radiação. Fonte: BioCarta, 2014.

O polimorfismo IVS62+60G>A (rs664143) está localizado no íntron 62 do gene ATM, em um sítio de ligação de proteínas (KIM et al, 2006). A alteração de bases glicina (G) para adenina (A) pode modificar o sítio de ligação das proteínas responsáveis pelo splicing e conseqüentemente, podem levar a um splicing impreciso (KIM et al, 2006). Dessa forma, o padrão de splicing dos éxons 61 e 62 adjacentes a esse polimorfismo pode estar modificado, alterando os níveis dos seus transcritos e, conseqüentemente, da proteína ATM.

O polimorfismo ATM Asp1853Asn (rs1801516), localizado no éxon 39 leva a uma substituição de uma asparagina (Asp) para um aspartato (Asn) no códon 1853. Estudos indicam que a presença do alelo Asn1853 pode aumentar a radiosensibilidade nos portadores, e significativamente aumentar a incidência de respostas adversas à radioterapia. Um possível modo de ação seria através da influência desse alelo sobre a região responsável pelo splicing do éxon 39, alterando o correto processo de splicing (BERÁNEK et al, 2011).

### 1.3.2 TP53

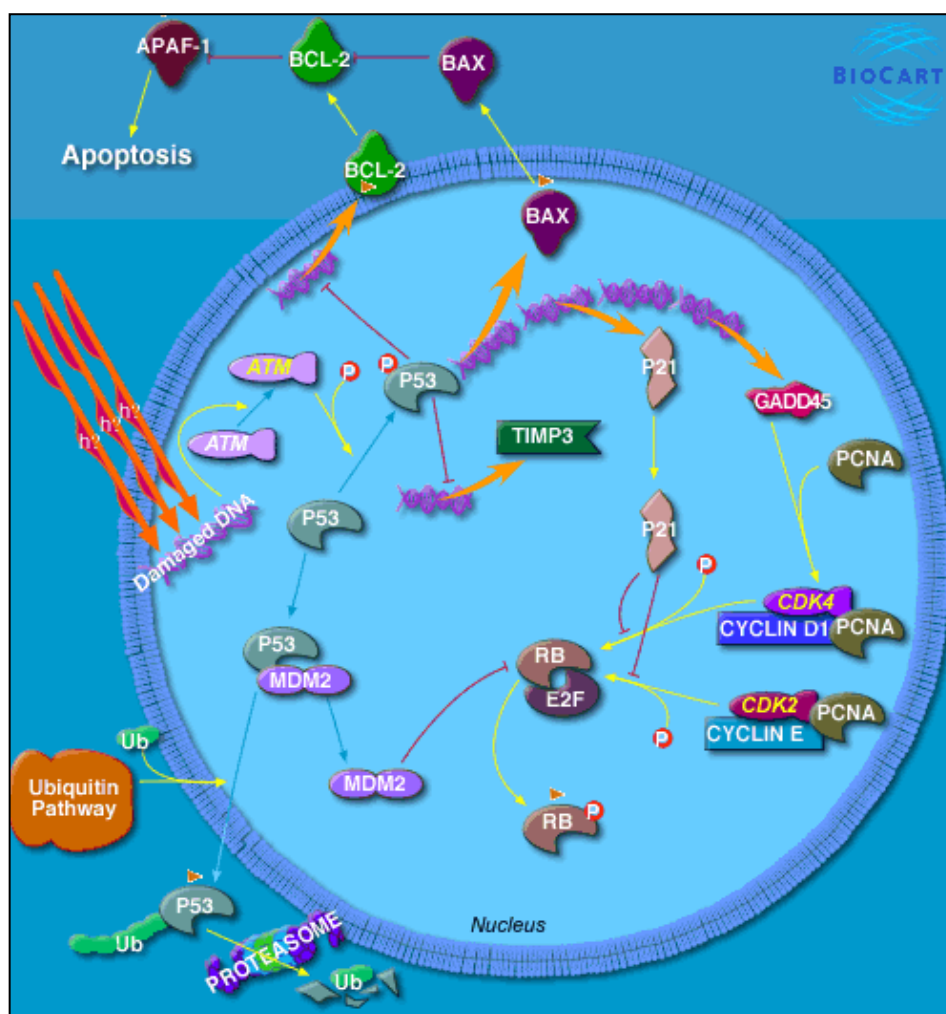
A progressão do ciclo celular é acompanhada por pontos de checagem, que representam vias de sinalização intracelular que conduzem à parada do ciclo. A parada permite que as células iniciem um evento apenas quando estiverem reunidas todas as condições para a conclusão bem sucedida deste evento. Danos ao DNA podem levar à ativação de pontos de checagem do ciclo celular em G1, S e G2, permitindo que as células reparem os danos no DNA antes de iniciar ou continuar a replicação de seu genoma, ou antes de segregarem os genomas replicados para as células-filhas (SUZUKI; MATSUBARA, 2011). Dependendo da complexidade do dano do DNA e da eficácia dos mecanismos de reparação do DNA, as células podem retomar o ciclo celular ou são encaminhadas para a apoptose. Os genes que desempenham papel fundamental na resposta dos pontos de checagem do dano no DNA são o ATM e o TP53 (BORCHIELLINI et al, 2012).

O gene supressor de tumor *TP53*, localizado no cromossomo 17p13.1, está envolvido em muitas funções relacionadas à manutenção da integridade celular após danos ao DNA e controle do ciclo celular. Disfunções desse gene estão envolvidas em muitos tipos de tumores, incluindo câncer de cabeça e pescoço (VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000).

A proteína p53 é fosforilada e ativada pela proteína ATM e tem sua produção aumentada, levando à ativação transcricional, repressão de múltiplos genes, parada do ciclo celular para permitir o reparo do DNA e apoptose (VOUSDEN; LANE, 2007). A regulação desses processos pela p53 controla a resposta celular aos danos induzidos por radiação (YANG et al, 2011). Em adição, a p53 também regula diretamente a expressão e ativação de algumas citocinas, como a interleucina-6 e o TGF $\beta$ , que estão envolvidas em processos inflamatórios induzidos pela radiação (YANG et al, 2011). Portanto, a função aberrante da p53 é esperada como sendo um dos eventos essenciais nas patologias induzidas por radiação. A via de sinalização da proteína p53 é apresentada na figura 2.

Em células normais, a concentração de p53 é baixa e sua meia vida é curta, por volta de 20 minutos (MICHAEL; OREN, 2003). De modo contrário, se o gene *TP53* estiver mutado, o seu produto proteico está frequentemente presente em altas concentrações (GASCO; CROOK, 2003).

Mutações no gene *TP53*, principalmente nos éxons 5-8 ou 5-9, têm sido registradas em cerca de 60% dos casos de câncer de cabeça e pescoço, e podem ser mutações de ponto, deleções ou inserções. Alguns estudos têm mostrado que mutações desse gene estão associadas com o aumento do risco de recorrência locorregional e pior prognóstico. Outros estudos sugerem também que a superexpressão da forma mutada da proteína p53 está associada com índices reduzidos de sobrevivência global e sobrevivência livre de doença em pacientes com CECP, principalmente câncer de laringe (EDSTROM et al, 2001). No entanto, a correlação entre a expressão da proteína p53 e a evolução clínica em pacientes com CECP permanece sem um consenso. Embora muitos estudos tenham correlacionado mutações e/ou superexpressão de p53 com pior prognóstico, outros têm mostrado que esses eventos são independentes do prognóstico e da evolução clínica da doença (GLEICH; SALAMONE, 2002).



**Figura 2. Via de sinalização da p53.** A p53 é um fator de transcrição cuja atividade é regulada por fosforilação. A função da p53 é impedir o progresso do ciclo celular caso esteja presente algum dano no DNA, seja através de pontos de checagem que permitem o reparo do DNA, ou da apoptose caso os danos persistam. Fonte: BioCarta, 2014.

O polimorfismo TP53 Arg72Pro (rs1042522), presente no éxon 4 do gene TP53, é caracterizado pela mudança de glicina (G) para citosina © no códon 72, que resulta na substituição de aminoácidos Arginina (Arg) para Prolina (Pro). Esse códon 72 está localizado dentro de uma região rica em prolina, essencial para a apoptose dependente de p53 (SCHNEIDER-STOCK et al, 2004). O genótipo Arg72 induz a apoptose com mais rapidez e suprime a transformação mais eficientemente que o genótipo Pro72 (BERGAMASCHI et al, 2006). Entretanto, o genótipo Pro72 possui uma capacidade significativamente alta de parada do ciclo celular e de reparo de

DNA do que o genótipo Arg72 (PIM; BANKS, 2004; SIDDIQUE; SABAPATHY, 2006).

### 1.3.3 *BCL2*

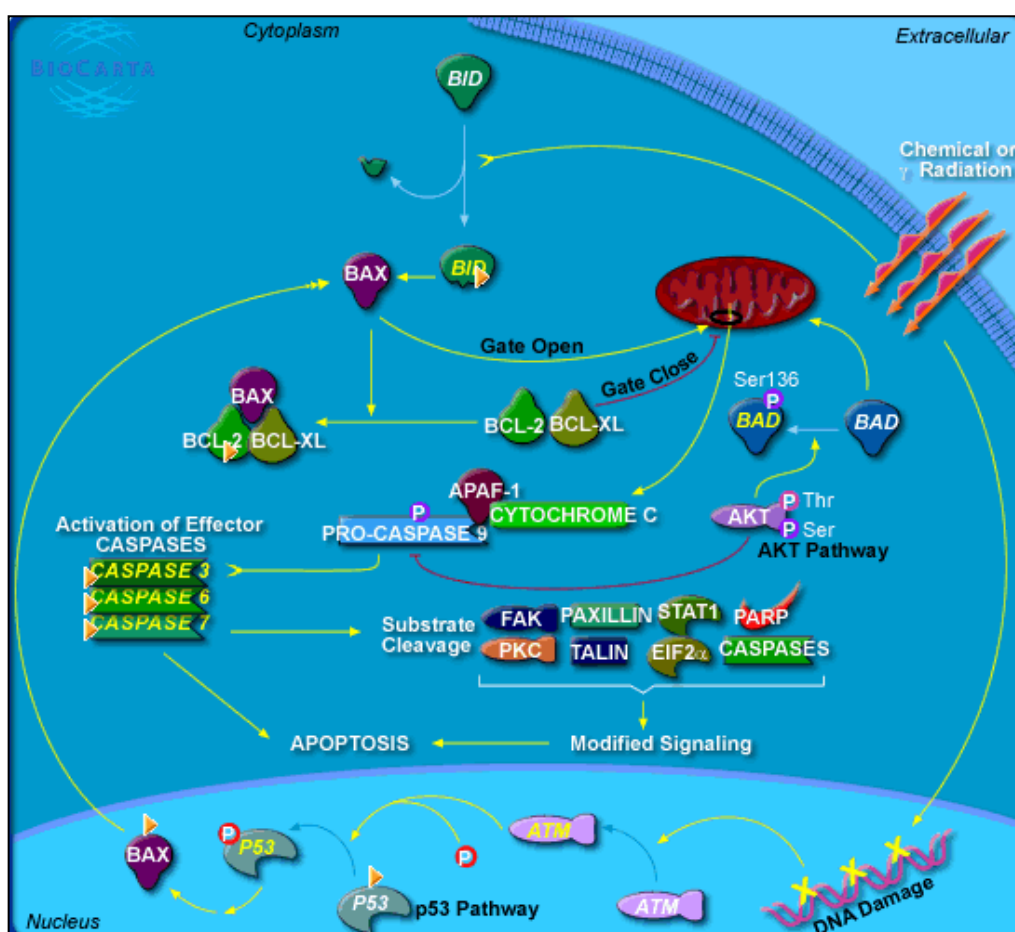
A apoptose (ou morte celular programada) é regulada por uma complexa cascata de eventos moleculares que elimina as células individualmente. O processo pode ser considerado como um mecanismo de proteção, já que remove as células altamente danificadas. Por isso, é um processo evolutivamente conservado que desempenha um papel fundamental na homeostase do tecido (KELLY; STRASSER, 2011). A ocorrência de apoptose induzida por radiação depende do tipo celular, fase do ciclo celular e pela dose de radiação. A apoptose é regulada por diversas proteínas, incluindo p53, ATM e BCL2, e pode ser mediada pela via dependente de p53 (figura 2) ou pela via independente de p53 (DE RUYCK, 2007).

A família de proteínas de membrana mitocondrial BCL2 desempenha um papel central no controle das vias apoptóticas, na regulação dos processos de morte celular e nos mecanismos de sobrevivência celular através da alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial e do controle da liberação do citocromo c (BEVERLY, 2012). Essa família contém proteínas antiapoptóticas, como BCL-XL e BCL2 (o primeiro proto-oncogene com função anti-apoptótica descrito), e proteínas pró-apoptóticas, como BAX ou BAK, que atuam em tecidos normais e nas células cancerosas (HIRATA et al, 2009; REED, 2008).

A proteína BCL2 está localizada na membrana mitocondrial externa de diferentes tipos celulares, como epitélios capazes de proliferação e morfogênese. Dentre suas atuações está o bloqueio da liberação de citocromo c pela mitocôndria após estímulo apoptogênico, impedindo, portanto, a ativação de caspases (SCARFÒ; GHIA, 2013). A proteína BAX pode produzir heterodímeros com a BCL2 (BAX/BCL2), suprimindo a morte celular, ou homodímeros (BAX/BAX), promovendo a apoptose. O

mecanismo de controle da apoptose pelos genes da família BCL2 envolve a formação de poros na membrana mitocondrial, permitindo a interação de várias proteínas envolvidas na regulação da morte celular (VOGLER, 2012; REED, 2008).

Diferentes estímulos de estresse desencadeiam a iniciação da apoptose por meio da chamada "via intrínseca", que culmina com a liberação de proteínas, especialmente citocromo c, a partir do espaço mitocondrial entre membranas. A "via extrínseca" é ativada por receptores de morte da superfície celular e ambos os caminhos convergem para ativar a cascata de caspase para alterações celulares estruturais e bioquímicas associadas com a apoptose (KELLY; STRASSER, 2011). Esse mecanismo é mostrado na figura abaixo (Figura 3).



**Figura 3. Sinalização apoptótica em resposta ao dano no DNA.** Os danos ao DNA induzidos por radiação ou químicos induzem a ativação celular da cascata de caspases, a partir de receptores de morte ou da permeabilização da membrana mitocondrial. O citocromo c é liberado da mitocôndria em resposta aos sinais apoptóticos e ativa a protease Apaf-1, que por sua vez ativa os membros da cascata de caspases proteolíticas. Fonte: BioCarta, 2014.

A apoptose tem sido demonstrada como um marco em cânceres humanos e é intensamente estudada para obter novos conhecimentos sobre a patogênese do tumor e para desenvolver novas abordagens terapêuticas (SCARFÒ; GHIA, 2013). O processo de carcinogênese pode ocorrer a partir de mutações e alterações polimórficas no gene BCL2. Da mesma forma, polimorfismos podem alterar a atuação do BCL2 e influenciar no tratamento contra a doença através de alterações na expressão desse gene.

O polimorfismo BCL2 -938C>A (rs2279115) está localizado no promotor P2 do gene BCL2, cuja ação inibe o promotor P1 desse mesmo gene (PARK et al, 2004). O alelo -938C, em comparação com o alelo -938A, aumenta significativamente a atividade de P2, inibindo o promotor P1 e, conseqüentemente, diminuindo a expressão de BCL2 (NÜCKEL et al, 2007).

#### 1.3.4 TGF $\beta$

A expressão de genes induzida por radiação pode resultar na indução e liberação de citocinas e fatores de crescimento por muitos tipos celulares, incluindo macrófagos, células epiteliais e fibroblastos. Essas proteínas influenciam a comunicação entre as células e permitem a sinalização celular entre células expostas ou não à radiação, para transferir e amplificar a resposta aos danos da radiação. Exemplo de fator de crescimento ativado pela radiação é o Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ).

O gene TGF $\beta$  é um fator de crescimento multifuncional que regula a proliferação celular, diferenciação tecidual, desenvolvimento embrionário, angiogênese, inflamação, cicatrização e fibrose (ZOU et al, 2014; BLOBE; SCHIEMANN; LODISH, 2000). A proteína TGF $\beta$ , codificada pelo gene citado acima, é uma citocina pró-fibrótica produzida primariamente pelas células endoteliais, hematopoiéticas e de tecidos conectivos, mas virtualmente, todas as células humanas possuem receptores para essa proteína (PETERS et al, 2008; BLOBE; SCHIEMANN;

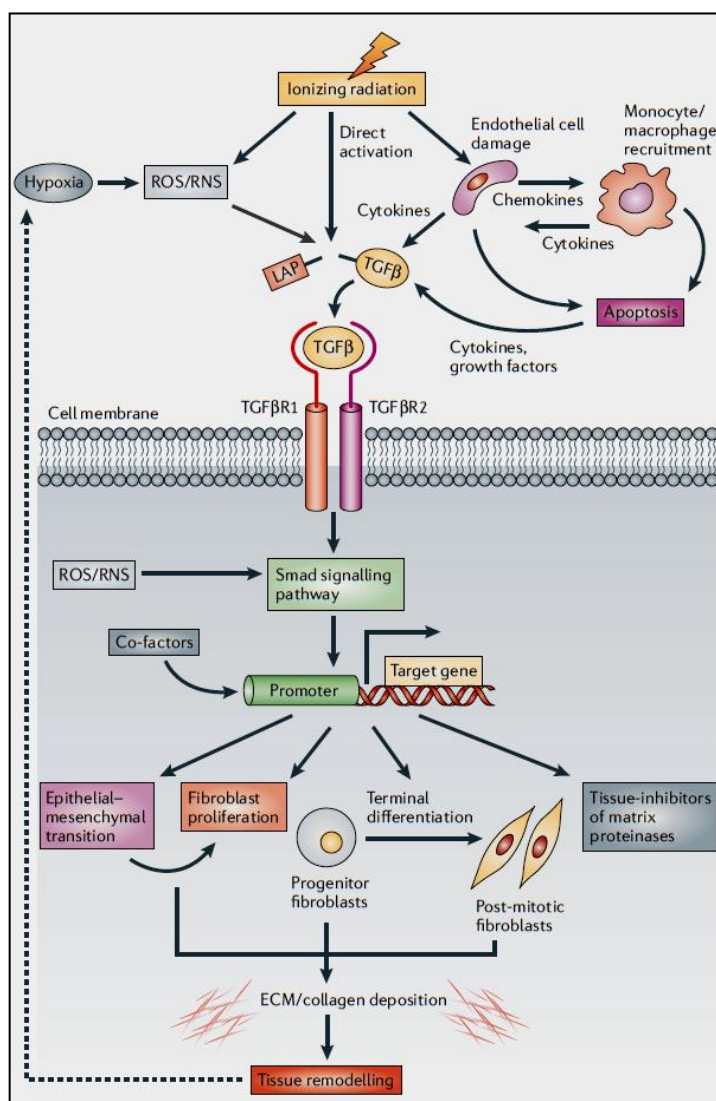


LODISH, 2000). Além disso, ela tem sido apresentada como um mediador chave de fibrogênese em várias condições patológicas, incluindo reações teciduais após o tratamento radioterápico (BLOBE; SCHIEMANN; LODISH, 2000; FINKELSTEIN et al, 1994), como mostrado na figura 4.

A radiação ionizante ativa indiretamente a proteína TGF $\beta$  pelas células endoteliais danificadas e pela alteração da homeostase das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (BENTZEN, 2006). Nos casos de radiação, os tecidos entram em um ciclo envolvendo hipóxia, angiogênese, morte celular, proliferação e infiltração de macrófagos (DE RUYCK et al, 2006). Em última análise, esta espiral leva à substituição total do tecido por colágeno, deixando alguns elementos celulares (ANSCHER et al, 2005). Em células irradiadas, TGF $\beta$  é uma proteína chave associada com proliferação e diferenciação, além de recrutar células inflamatórias, ativar fibroblastos para produção e deposição de proteínas na matriz extracelular e inibir o reparo epitelial (FINKELSTEIN et al, 1994; PETERS et al, 2008; BARNETT et al, 2012).

Disfunções dessa proteína têm sido observadas em fibrose de rim, fígado e pulmão, além de hipertensão (BLOBE; SCHIEMANN; LODISH, 2000). De fato, enquanto a perda de função de TGF $\beta$  tem sido implicada em distúrbios hiperproliferativos, formação tumoral, inflamação e doenças autoimunes, ganho de função leva a imunossupressão e metástase tumoral (DERYNCK; AKHURST; BALMAIN, 2001; ELLIOTT; BLOBE, 2005).

Os efeitos supressores de tumor do TGF $\beta$ , que incluem a inibição da proliferação celular, indução de apoptose e inibição da imortalização celular, são observados em células normais e carcinomas precoces. Por outro lado, os efeitos promotores tumorais desse fator de crescimento, que incluem a indução de transição epitélio-mesenquimal (EMT), adesão celular, migração, invasão metastática e quimiotaxia, são mais especificamente observados em tumores agressivos e invasivos (KUBICZKOVA et al, 2012; CUFÍ et al, 2010). Assim, TGF $\beta$  desempenha um duplo papel em cânceres humanos; atuando como supressor tumoral e como promotor de metástase tumoral e dessa forma, torna-se um alvo em pesquisas sobre câncer.



**Figura 4. Processos chaves envolvidos na fibrogênese induzida por radiação.** A radiação ionizante ativa diretamente o TGFβ, que também pode ser liberado pelos tecidos endoteliais danificados pela radiação, junto com outras citocinas pró-fibróticas. A radiação também pode gerar ROS, que ativam o TGFβ e interferem na via de sinalização Smad. Como resposta, o TGFβ aumenta a deposição de colágeno e de matriz extracelular (ECM). Os danos vasculares e a remodelação tecidual podem levar à hipóxia, um dos mecanismos que leva à resposta fibrogênica. Fonte: Bentzen, 2006.

Os polimorfismos TGFβ Pro10Leu (rs1800470) e TGFβ -509C>T (rs1800469) estão associados com um aumento dos níveis séricos da proteína TGFβ (GRAINGER et al, 1999). O efeito na radiosensibilidade e nos níveis séricos da proteína TGFβ relatados na literatura podem ser causados pelo polimorfismo Leu10Pro através da influência sobre o tráfico intracelular ou eficiência na exportação do pró-peptídeo através do retículo endoplasmático e pelo polimorfismo -509C>T através de seu efeito sobre a produção dessa pró-proteína (DE RUYCK et al, 2006).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a relação entre os polimorfismos ATM IVS62+60G>A (rs664143), ATM Asp1853Asn (rs1801516), TP53 Arg72Pro (rs1042522), BCL2 -938C>A (rs2279115), TGF $\beta$  Pro10Leu (rs1800470) e TGF $\beta$  -509C>T (rs1800469) e o prognóstico de pacientes com Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço (CECP), 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 geral, local, óbito e sobrevidas livre de doença local e doença específica nos casos de carcinoma epidermóide oral, de orofaringe e de laringe, segundo a modalidade terapêutica;
- Avaliar os diferentes resultados relacionados à radiosensibilidade tumoral entre os tumores de cavidade oral, orofaringe e laringe.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Aspectos Éticos**

O material utilizado para a realização do estudo consistiu de DNA extraído de sangue, coletado após entrevista e assinatura de consentimento livre e esclarecido. A matriz do DNA está armazenada em freezer dentro do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis/SP, sob-responsabilidade do Dr. Marcos Brasilino de Carvalho (Coordenador de Grupo no Projeto Genoma dentro do Hospital Heliópolis) e da Dra. Eloíza Helena Tajara da Silva (Coordenadora do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço). Esse projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sob o nº 135 (anexo 1). Os dados clínicos e as informações contidas nos prontuários são mantidos em sigilo, garantindo assim a confidencialidade das informações.

#### **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 e orofaringe (n=210) e laringe (n=101). 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, já

que essa poderia ser uma característica que influenciaria negativamente no prognóstico da doença. A presença de metástase, considerada como um tumor de segunda geração, leva à grande redução da expectativa de vida quando comparada a casos sem metástase à distância.

As amostras de tumores localizados na cavidade oral e na orofaringe foram agrupadas na análise estatística. Esses dois sítios possuem características clínicas e histopatológicas e protocolos de tratamento semelhantes, além de prognósticos parecidos, como a alta incidência de recidivas. A laringe foi analisada à parte por possuir características diferentes dos sítios anatômicos citados acima.

O seguimento dos pacientes foi feito por uma equipe multidisciplinar de acordo com a rotina estabelecida no serviço, garantindo um seguimento mínimo de 60 meses (5 anos) após o tratamento inicial. Os registros incluem informações epidemiológicas abrangentes quanto aos fatores de risco relacionados à doença. Essas características estão agrupadas e resumidas na tabela 1.

Entre os 311 indivíduos participantes desse estudo, 271 são homens (87,1%). Essa proporção mantém-se nos dois sítios analisados, sendo 179 homens na cavidade oral+ orofaringe (85,2%) e 92 homens na laringe (91,1%).

Quando analisada a faixa etária, constata-se que 123 casos (39,5%) de câncer foram diagnosticados em pessoas com idades entre 51 e 60 anos, sendo que 275 dos casos (88,4%) ocorreram em pessoas com idades entre 41 a 70 anos.

Em relação ao tabagismo, pessoas que nunca fumaram ou que pararam a mais de um ano foram enquadradas na subclasse “Não Tabagista”, considerando o status tabagista do último ano completo. Nesse caso, 224 pacientes avaliados aqui são tabagistas (72%), proporção mantida também nos dois sítios anatômicos analisados.

O consumo de álcool foi registrado em 107 indivíduos (51%) com tumores de cavidade oral e orofaringe, enquanto na laringe 47 (46,5%) pacientes foram considerados etilistas.

**Tabela 1. Características epidemiológicas dos pacientes diagnosticados com CE oral, de orofaringe e de laringe.**

Características epidemiológicas	Total		Sítio			
			Oral, orofaringe		Laringe	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
<b>Gênero</b>						
Feminino	40	12,9	31	14,8	9	8,9
Masculino	271	87,1	179	85,2	92	91,1
<b>Faixa etária, anos</b>						
≤ 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
<b>Tabagismo</b>						
Não	87	28,0	58	27,6	29	28,7
Sim	224	72,0	152	72,4	72	71,3
<b>Etilismo</b>						
Não	157	50,5	103	49,0	54	53,5
Sim	154	49,5	107	51,0	47	46,5
<b>Total</b>	<b>311</b>	<b>100,0</b>	<b>210</b>	<b>67,5</b>	<b>101</b>	<b>32,5</b>

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 por agulha fina (PAAF) para coleta de material e análise citológica.

As características clinicopatológicas analisadas foram: estágio do tumor (Sistema TNM), tamanho do tumor, presença de linfonodos acometidos e margem cirúrgica.

O Sistema TNM para classificação de tumores malignos foi desenvolvido com o objetivo de facilitar a análise de prognóstico e o protocolo de tratamento a ser seguido, classificando os tumores em grupos (estádios), conforme as características da extensão do tumor primário (T), a ausência ou presença e a extensão de

metástase em linfonodos regionais (N) e a ausência ou presença de metástase à distância (M). A adição de números a estes três componentes indica a extensão da doença maligna, de forma crescente (DESCHLER; DAY, 2008).

Dessa forma, o estágio I agrupa tumores classificados como T1 N0; o estágio II, tumores T2 N0; o estágio III congrega tumores T3 N0 ou T1,T2,T3 N1; o estágio IV é composto por tumores T4, independente do N ou tumores com  $N \geq 2$ , independente do T. Casos em que os tumores encontram-se em estádios iniciais apresentam taxas de sobrevida maiores do que os casos com estadiamento mais avançado (DESCHLER; DAY, 2008). Essa classificação auxilia também no protocolo de tratamento. Normalmente, pacientes com tumores com estágio I e II não precisam do tratamento radioterápico para eliminação do tumor. Ao contrário, pacientes com tumores III e IV precisam realizar a radioterapia porque somente a cirurgia é insuficiente para controlar o tumor primário, visto que os tumores são grandes, e/ou os pacientes apresentam linfonodos acometidos. Esses pacientes apresentam pior prognóstico e sobrevida.

Foram agrupadas como características prognósticas a ocorrência de recidiva geral, recidiva local e óbito. O termo recidiva agrupa os casos de recidiva local, recidiva regional (metástase nos linfonodos cervicais) e metástase à distância. Na recidiva não são incluídos os casos de aparecimento do segundo tumor primário.

A recidiva local refere-se a casos em que houve a retirada cirúrgica do tumor primário, e após um tempo, ele volta a ressurgir no mesmo local. Essa variável é a melhor forma de avaliar os polimorfismos relacionados à radioterapia, já que este tratamento é local.

Nas categorias “Recidiva” e “Recidiva local”, os casos não avaliados referem-se a pacientes que, mesmo sendo operados, apresentaram tumor residual (agrupamento de células). Esses casos foram excluídos, pois não é possível considerar que o tratamento foi curativo, permitindo iniciar a contagem de tempo até a ocorrência da recidiva, uma vez que o tumor não foi extinto em seu sítio primário. Na categoria “Óbito”, os casos não avaliados referem-se aos pacientes que morreram em decorrência de outras causas sem relação com o câncer.

Nas tabelas em que se relacionam os genótipos ao prognóstico, com o objetivo de facilitar os cálculos estatísticos, o heterozigoto foi agrupado ao homozigoto (selvagem ou polimórfico) do mesmo gene que apresentava as frequências mais semelhantes a ele. Esses testes foram realizados utilizando a análise multivariada. Os casos não avaliados foram excluídos dos cálculos estatísticos. Os casos também foram separados em irradiados (realizaram a radioterapia) e não irradiados (não realizaram o tratamento radioterápico).

### 3.3 Extração de DNA

Para a extração do DNA de sangue, foi empregada a metodologia de extração por sal, na qual o sangue periférico coletado de pacientes foi misturado a 25 mL de tampão 1 (82,91g de Cloreto de Amônio 1550 mM; 10,01g de Carbonato ácido de Potássio 100 mM; 50 mL de EDTA 10 mM com pH 7,4; q.s.p. 1000 mL de Água Milli-Q), e em seguida o material foi homogeneizado por inversão e colocado no gelo por 30 minutos. Após esse período, foi centrifugado por 15 minutos a 1800 rpm a 4°C e o sobrenadante descartado. Foi adicionado ao pellet 5 mL do tampão 1 e centrifugado por 5 minutos a 1800 rpm a 4°C.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi resuspendido através de agitação (Vórtex) em 3 mL de tampão 2, composto por 10 mL de Tris-HCl 100 mM com pH 8,0, 23,38 g de NaCl 4 M, 10 mL de EDTA 0,2 M com pH 8,2 e Água Milli-Q q.s.p. 1000 mL. À solução, foram adicionados 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), sendo centrifugado em seguida por 20 minutos a 3000 rpm. Após esse período, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde o DNA foi precipitado quando adicionado 2



volumes de etanol absoluto em temperatura ambiente. O DNA precipitado foi içado e embebido em etanol 70% em temperatura ambiente. Posteriormente, o DNA foi dissolvido em um tubo contendo 800 µL de TE (composto por 1 mL de Tris 10 mM com pH 7,5, 0,5 mL de EDTA 1mM com pH 7,4 e Água Milli-Q q.s.p. 1000 mL), e incubado a 65°C por 30 minutos.

Após a finalização da extração do DNA, as amostras foram armazenadas em congelador a - 20°C.

### **3.4 PCR-RFLP**

Os seis polimorfismos analisados nesse estudo foram selecionados através de revisão bibliográfica em artigos científicos no PubMed, utilizando as palavras chaves radioterapia, polimorfismo e câncer.

O polimorfismo do gene BCL2 foi o rs2279115, localizado em uma região promotora e caracterizado por uma mudança de nucleotídeos na posição -938, de uma citosina (C) para uma adenina (A). No gene TP53, o polimorfismo foi o rs1042522, localizado em uma região codificante e onde ocorre uma mudança de uma guanina (G) para uma C, acarretando uma troca do aminoácido Arginina (Arg) por uma Prolina (Pro) no códon 72. Foram escolhidos dois polimorfismos do gene TGFβ. O primeiro, rs1800470, localizado no éxon 1 do gene, é caracterizado por uma troca de uma C por uma timina (T) na posição 869, ocasionando uma alteração de aminoácidos no códon 10, uma Prolina por uma Leucina (Leu). O segundo, rs1800469, é reconhecido como uma alteração de uma C por uma T na posição -509, localizada em uma região promotora. Também foram selecionados dois polimorfismos no gene ATM: o rs664143, caracterizado como uma alteração de uma guanina (G) por uma A na posição 60 do íntron 62; e o rs1801516, localizado em uma região codificadora, cuja alteração ocorre no códon 1853 de um Aspartato (Asp) para uma Asparagina (Asn) devido à uma troca entre os aminoácidos A e G na posição 5557.

Após a extração do DNA, as amostras foram amplificadas utilizando a técnica de PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*). Para cada polimorfismo estudado, um par de primers específico foi utilizado, sendo que as sequências de primers Forward (F) e Reverse (R) foram obtidas através da revisão bibliográfica nos artigos da área e confirmadas pelo nosso grupo de pesquisa.

As sequências dos primers, tamanho do fragmento de PCR gerado e a referência utilizada são: BCL2 -938C>A, F:5'TTATCCAGCAGCTTTTCGG3' e R:5'GGCGGCAGATGAATTACAA3', 252 pb (ZHANG et al, 2012); TP53 Arg72Pro (G>C), F:5'ATCTACAGTCCCCCTTGCCG3' e R:5'GCAACTGACCGTGCAAGTCA3', 296pb (LI et al, 2010); TGFβ Pro10Leu (C>T), F:5'CTCCGGGCTGCGGCTGCGGC3' e R: 5'CGGCACCTCCCCCTGGCTCG3', 199 pb (COTTON et al, 2002); TGFβ -509C>T, F:5'CAGTAAATGTATGGGGTCGCAG3' e R:5'GGTGTTCAGTGGGAGGAGGG3', 153 pb (COTTON et al, 2002); ATM IVS62+60G>A, F:5'CTCTTCACATCAGTGACTTCCGGA3' e R:5'GCTGTGAGAAAACCATGGAAGTGA3', 146 pb (HU et al, 2008); ATM Asp1853Asn (A>G), F:5'TAATATGTCAACGGGGCATG3' e R:5'ATTTCTCCATGATTCATTTGGAT3', 179 pb (GONZÁLEZ-HORMAZÁBAL et al, 2008).

As condições químicas e físicas para as reações de PCR foram otimizadas no início da pesquisa. O termociclador utilizado foi o Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler, da Applied Biosystems. As condições químicas utilizadas para a amplificação dos polimorfismos dos genes BCL2, TP53 e ATM foram: 0,2 µL de Taq Platinum DNA Polimerase; 0,6 µL de primer Forward (F) 25 µM; 0,6 µL de primer Reverse (R) 25 µM; 0,3 µL de dNTP 10 mM; 0,45 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 1x de buffer 10x; 1 µL de DNA; e água ultra pura q.s.p 15 µL. As condições foram as mesmas descritas acima para os dois polimorfismos do gene TGFβ, com exceção do volume de primer, padronizado com 0,4 µL.

As condições físicas ideais de denaturação, anelamento e extensão para a amplificação dos fragmentos pela PCR são apresentadas abaixo, sendo que a denaturação inicial e a extensão final foram as mesmas (94°C por 5 min e 72°C por

10 min, respectivamente). Para o BCL2 -938C>A foram utilizados 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 57°C por 30 seg e 72°C por 30 seg; TP53 Arg72Pro, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 57°C por 30 seg e 72°C por 20 seg; TGFβ Pro10Leu, 38 ciclos de 94°C por 40 seg, 68°C por 25 seg e 72°C por 50 seg; TGFβ -509C>T, 35 ciclos de 94°C por 60 seg, 63°C por 30 seg e 72°C por 60 seg; ATM IVS62+60G>A, 35 ciclos de 94°C por 60 seg, 57°C por 30 seg e 72°C por 40 seg; ATM Asp1853Asn, 40 ciclos de 94°C por 60 seg, 57°C por 30 seg e 72°C e 40 seg.

Após a amplificação das amostras pela PCR, foi realizada a reação de RFLP, comumente chamada de digestão, pois utiliza enzimas de restrição específicas que reconhecem determinados fragmentos oligonucléicos específicos e os “digere” em fragmentos menores de tamanhos conhecidos que são utilizados para genotipar. As condições químicas e físicas da digestão foram padronizadas nesse trabalho.

Para a digestão do polimorfismo BCL2 -938C>A, por amostra, foram utilizados 0,2 µL da enzima Bccl (New England Biolabs); 1,0 µL de buffer; 3,8 µL de água ultra-pura e 5,0 µL de produto de PCR. Para o TP53 Arg72Pro, as condições foram 0,125 µL da enzima BstUI (Fermentas); 0,875 µL de buffer; 5,0 µL de água ultra-pura e 5,0 µL de produto de PCR. Para o polimorfismo TGFβ Pro10Leu, foram utilizados 0,1 µL da enzima NotI (Fermentas); 0,9 µL de buffer; 5,0 µL de água ultra-pura e 4,0 µL de produto de PCR. Para o polimorfismo -509C>T do gene TGFβ, foram utilizados 0,15 µL da enzima Eco81I (Fermentas); 1,0 µL de buffer; 3,85 µL de água ultra-pura e 5,0 µL de produto de PCR. As condições químicas da digestão do polimorfismo ATM IVS62+60G>A foram: 0,17 µL da enzima BseGI (Fermentas); 1,0 µL de buffer; 3,83 µL de água ultra-pura e 5,0 µL de produto de PCR. Para o polimorfismo ATM Asp1853Asn, foram utilizados 0,16 µL da enzima Mbol (Fermentas); 1,34 µL de buffer; 4,5 µL de água ultra-pura e 5,0 µL de produto de PCR.

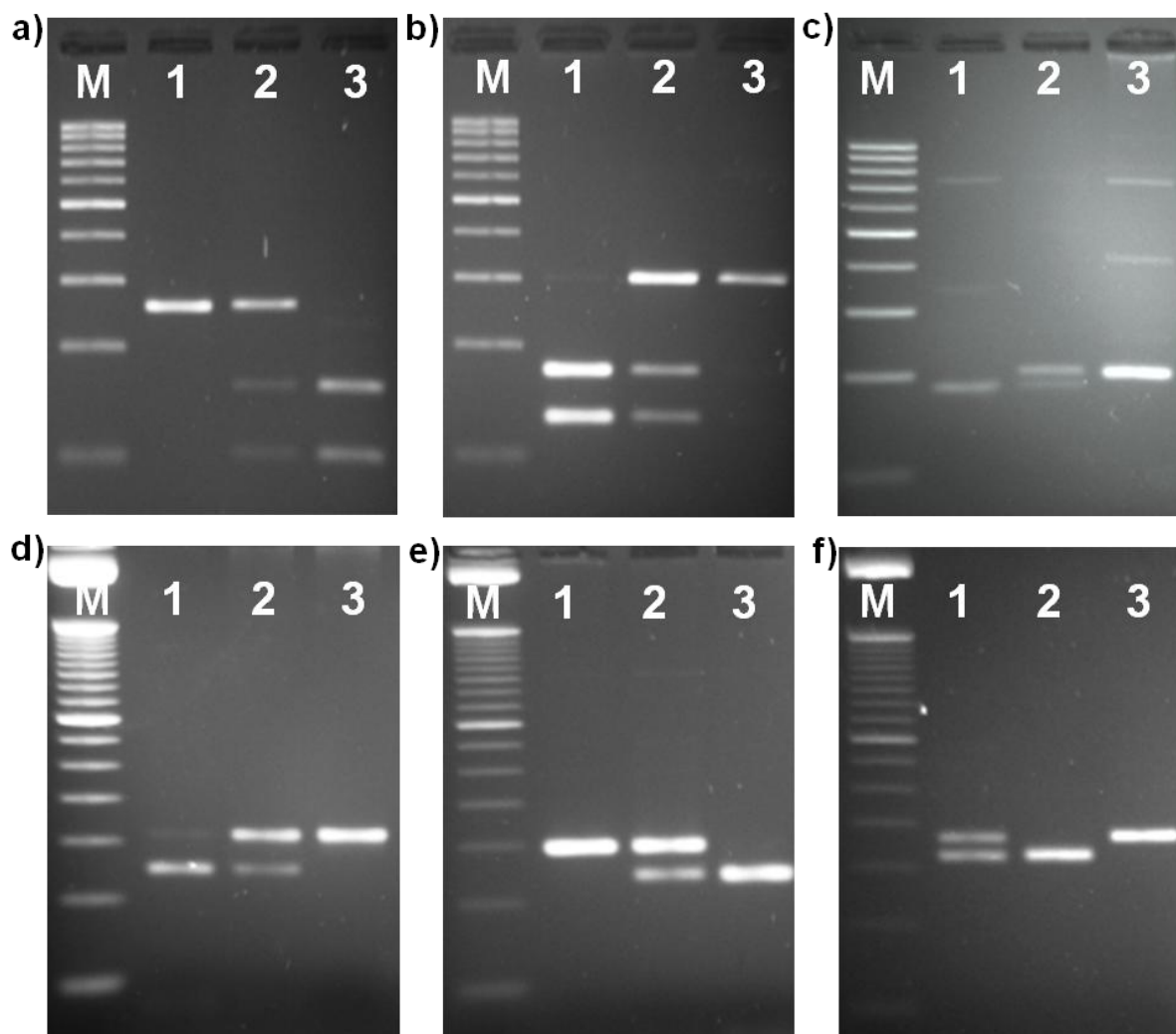
As condições físicas para cada reação de RFLP estão apresentadas na tabela 2, que também mostra os fragmentos específicos gerados após a digestão de cada polimorfismo, separados de acordo com os genótipos.

**Tabela 2. Condições físicas e fragmentos gerados para cada polimorfismo após a reação de RFLP.**

<b>Condições físicas e fragmentos gerados</b>	<b>BCL2 - 938C&gt;A</b>	<b>TP53 Arg72Pro</b>	<b>TGFβ Pro10Leu</b>	<b>TGFβ - 509C&gt;T</b>	<b>ATM IVS62+60 G&gt;A</b>	<b>ATM Asp1853Asn</b>
<i>Fragmento PCR</i>	252pb	296pb	199pb	153pb	146pb	179pb
<i>Enzima</i>	Bccl	BstUI	NotI	Eco81I	BseGI	Mbol
<i>Temperatura de clivagem</i>	37°C	37°C	37°C	37°C	55°C	37°C
<i>Tempo</i>	1h30min	16h	16h	1h20min	1h20min	16h
<i>Homozigoto selvagem</i>	252pb	169, 127pb	180, 19pb	119, 34pb	146pb	156, 23pb
<i>Heterozigoto</i>	252, 154, 98pb	296, 169, 127pb	199, 180, 19pb	153, 119, 34pb	146, 111, 35pb	179, 156, 23pb
<i>Homozigoto polimórfico</i>	154, 98pb	296pb	199pb	153pb	111, 35pb	179pb

**pb:** pares de base

Para a visualização dos fragmentos gerados após a digestão, as amostras foram corridas em eletroforese horizontal em gel de agarose com concentrações de 2% ou 3% e com o tempo de corrida de 40 a 50 minutos, de acordo com polimorfismo. O brometo de etídeo foi usado como corante intercalante. A visualização das bandas e o registro das fotos dos géis foram realizados em fotodocumentador utilizando a luz ultravioleta. Cada polimorfismo gerou um padrão de bandas diferentes, que estão mostrados na tabela 2 e na figura 5.



**Figura 5. Visualização dos fragmentos gerados após a reação de PCR-RFLP.** a) BCL2 -938C>A: M=marcador de 100 pb; 1=HS CC; 2=Ht CA; 3=HP AA; b) TP53 Arg72Pro: M=marcador de 100 pb; 1=HS Arg/Arg; 2=Ht Arg/Pro; 3=HP Pro/Pro; c) TGFβ Pro10Leu: M=marcador de 100 pb; 1=HS Pro/Pro; 2=Ht Pro/Leu; 3=HP Leu/Leu; d) TGFβ -509C>T: M=marcador de 50 pb; 1=HS CC; 2=Ht CT; 3=HP TT; e) ATM IVS62+60G>A: M=marcador de 50 pb; 1=HS GG; 2=Ht GA; 3=HP AA; f) ATM Asp1853Asn: M=marcador de 50 pb; 1=Ht Asp/Asn; 2=HS Asp/Asp; 3=HP Asn/Asn. HS: Homozigoto Selvagem; Ht: Heterozigoto; HP: Homozigoto Polimórfico.

### 3.5 Estatística

Para a análise estatística, a margem de erro estipulada foi 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 sobrevida 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* (HR) 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.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização clinicopatológica e prognóstica da casuística

As características clinicopatológicas analisadas foram: estágio, tamanho do tumor e linfonodos acometidos (dados mostrados na tabela 3).

**Tabela 3. Características clinicopatológicas dos pacientes diagnosticados com CE oral, de orofaringe e de laringe.**

Características clinicopatológicas	Total		Sítios			
			Oral, Orofaringe		Laringe	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
<b>Estádio</b>						
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
<b>Tamanho do tumor (pT)</b>						
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
<b>Linfonodos acometidos (pN)</b>						
Negativo	166	53,4	98	46,7	68	67,3
Positivo	145	46,6	112	53,3	33	32,7
<b>Total</b>	<b>311</b>	<b>100,0</b>	<b>210</b>	<b>67,5</b>	<b>101</b>	<b>32,5</b>

Em relação ao estágio, metade (50,8%) das amostras tumorais encontrava-se no estágio IV, enquanto 38% das amostras pertenciam aos estádios II e III. Essa proporção manteve-se nos casos dos sítios da cavidade oral e orofaringe (49% e 40,9%, respectivamente). Já na laringe, mais da metade (54,5%) dos casos eram estadiamento IV, enquanto 18,8% das amostras foram classificadas como estágio III.

Amostras com estágio I e II apresentaram praticamente a mesma porcentagem (13,9% e 12,9%, respectivamente).

Na cavidade oral e na orofaringe, a maior parte (45,2%) dos tumores foram classificados como T1 e T2, enquanto 28,1% foram classificados como T3 e 26,7% como T4. Essa proporção altera-se na laringe, já que aproximadamente metade dos tumores foram classificados como T4 (49,5%), 18,8% como T3 e 31,7% como T1 e T2.

Quando avaliada a presença de linfonodos metastáticos, as proporções invertem-se entre os sítios anatômicos avaliados. Enquanto na laringe, na maior parte dos pacientes (67,3%), não foram encontrados linfonodos acometidos, na cavidade oral e orofaringe, 53,3% dos pacientes apresentavam linfonodos cervicais.

Os dados analisados relativos ao tratamento realizado pelos pacientes são mostrados na tabela 4. Todos os indivíduos participantes dessa pesquisa passaram por cirurgia para retirada do tumor.

A proporção de casos de pacientes irradiados ou não irradiados é aproximadamente a mesma, sendo 51,4% irradiados no sítio oral/orofaringe e 51,5% na laringe. Em relação ao tratamento quimioterápico, somente 6,4% dos pacientes realizaram esse procedimento. A análise das margens cirúrgicas revelou que 12,9% das amostras foram positivas para a presença de células tumorais nas margens cirúrgicas.



**Tabela 4. Características do tratamento dos pacientes diagnosticados com CE oral, de orofaringe e de laringe.**

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

Os pacientes realizaram um acompanhamento em relação ao prognóstico. Foram analisados dados de recidiva, recidiva local e óbito (dados mostrados na tabela 5).

Quase metade dos pacientes (47,6%) com tumores localizados na cavidade oral, orofaringe recidivaram, enquanto 32,9% dos indivíduos não recidivaram. Na laringe, a taxa de recidiva foi menor (24,8%), enquanto 60,4% dos casos não sofreram com o ressurgimento da doença.

Quando analisada somente os casos de recidiva local, mais pacientes não recidivaram nos casos de tumores primários na laringe (67,3%) e na cavidade oral e na orofaringe (55,7%). Somente 17,8% dos indivíduos apresentaram recidiva local na laringe e 24,8% no sítio oral/orofaringe.

Na cavidade oral e na orofaringe, 53,8% dos pacientes não morreram, mas 39,5% deles foram a óbito por causa do câncer. Já na laringe, 57,4% dos indivíduos sobreviveram, enquanto 36,6% dos pacientes morreram por causa da doença.

**Tabela 5. Dados do acompanhamento prognóstico em pacientes diagnosticados com CE oral, de orofaringe e de laringe.**

Dados do acompanhamento	Total		Sítios			
			Oral, Orofaringe		Laringe	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
<b>Recidiva</b>						
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
<b>Recidiva local</b>						
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
<b>Óbito</b>						
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
<b>Total</b>	<b>311</b>	<b>100,0</b>	<b>210</b>	<b>67,5</b>	<b>101</b>	<b>32,5</b>

#### 4.2 Análise das frequências genotípicas

Após as reações de PCR-RFLP, as amostras foram genotipadas para os seis polimorfismos estudados. Os dados genotípicos estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Genótipos dos pacientes diagnosticados com CE oral, de orofaringe e de laringe.

Genótipos	Total		Sítios			
			Oral, Orofaringe		Laringe	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
<b>BCL2 -938C&gt;A</b>						
CC	108	34,7	71	33,8	37	36,6
CA	131	42,1	90	42,9	41	40,6
AA	70	22,5	47	22,4	23	22,8
Não avaliado	2	0,6	2	1,0	0	0,0
<b>TP53 Arg72Pro (G&gt;C)</b>						
Arg/Arg (G/G)	140	45,0	91	43,3	49	48,5
Arg/Pro (G/C)	130	41,8	92	43,8	38	37,6
Pro/Pro (C/C)	40	12,9	26	12,4	14	13,9
Não avaliado	1	0,3	1	0,5	0	0,0
<b>TGFb Pro10Leu (C&gt;T)</b>						
Pro/Pro (C/C)	57	18,3	36	17,1	21	20,8
Pro/Leu (C/T)	169	54,3	113	53,8	56	55,4
Leu/Leu (T/T)	79	25,4	56	26,7	23	22,8
Não avaliado	6	1,9	5	2,4	1	1,0
<b>TGFb -509C&gt;T</b>						
CC	127	40,8	85	40,5	42	41,6
CT	138	44,4	94	44,8	44	43,6
TT	43	13,8	29	13,8	14	13,9
Não avaliado	3	1,0	2	1,0	1	1,0
<b>ATM IVS62+60G&gt;A</b>						
GG	117	37,6	82	39,0	35	34,7
GA	145	46,6	100	47,6	45	44,6
AA	47	15,1	26	12,4	21	20,8
Não avaliado	2	0,6	2	1,0	0	0,0
<b>ATM Asp1853Asn (A&gt;G)</b>						
Asp/Asp (A/A)	2	0,6	1	0,5	1	1,0
Asp/Asn (A/G)	52	16,7	39	18,6	13	12,9
Asn/Asn (G/G)	251	80,7	166	79,0	85	84,2
Não avaliado	6	1,9	4	1,9	2	2,0
<b>Total</b>	<b>311</b>	<b>100,0</b>	<b>210</b>	<b>67,5</b>	<b>101</b>	<b>32,5</b>

No gene BCL2 foi analisado o polimorfismo que ocorre na posição -938, alterando uma citosina (C) para uma adenosina (A). Os genótipos mantiveram-se praticamente na mesma proporção entre os dois sítios analisados, sendo que 22,4% dos casos de oral, orofaringe e 22,8% de laringe foram do genótipo polimórfico AA, enquanto

33,8% e 36,6% (oral/orofaringe e laringe, respectivamente) das amostras genotipadas foram de homozigotos selvagens CC.

Em relação ao polimorfismo do gene TP53, em que ocorre uma troca de um aminoácido Arginina (Arg) para uma Prolina (Pro), na cavidade oral e na orofaringe, 43,3% dos casos foram de pacientes homozigotos Arg/Arg e 43,8% de indivíduos heterozigotos Arg/Pro. Enquanto isso, 48,5% e 37,6% de casos da laringe foram de pacientes homozigotos selvagem e heterozigotos, respectivamente.

Foram analisados dois polimorfismos do gene TGF $\beta$ . O primeiro polimorfismo analisado refere-se a uma troca de aminoácidos na posição 10, uma Prolina (Pro) por uma Leucina (Leu). Nesse polimorfismo, a frequência de heterozigotos foi maior do que 50%, tanto na cavidade oral, orofaringe (53,8%) quanto na laringe (55,4%). A frequência do genótipo polimórfico foi maior do que a frequência do selvagem nos dois sítios analisados (26,7% de Leu/Leu na oral/orofaringe e 22,8% do genótipo polimórfico na laringe).

O segundo polimorfismo analisado do gene TGF $\beta$  refere-se à alteração de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição -509. O genótipo CC apresentou uma frequência de 40,5% de casos no sítio oral/orofaringe e 41,6% na laringe. Já o homozigoto polimórfico esteve presente em 13,8% dos casos do primeiro sítio citado e em 13,9% no segundo sítio.

Do gene ATM também foram analisados dois polimorfismos: uma troca de nucleotídeos na posição 60 de uma guanina (G) por uma adenina (A) e uma mudança de aminoácidos na posição 1853, de um Aspartato (Asp) por uma Asparagina (Asn). O polimorfismo ATM IVS62+60G>A apresentou o genótipo heterozigoto como mais frequente (47,6% em oral/orofaringe e 44,6% em laringe), seguido pelo genótipo GG (39,0% em oral/orofaringe e 34,7% em laringe) e como menos frequente, o homozigoto polimórfico (12,4% em oral/orofaringe e 20,8% em laringe).

Quando analisado o polimorfismo ATM Asp1853Asn, no sítio da cavidade oral e orofaringe, 79,0% dos casos foram de homozigotos Asn/Asn, 18,6% de heterozigotos, e apenas 0,5% de casos do homozigoto selvagem Asp/Asp.

Frequência semelhante foi encontrada na laringe, em que somente 1% dos casos foi genotipado como Asp/Asp, 12,9% como heterozigotos Asp/Asn e 84,2% como homozigotos polimórficos.

### **4.3 Relação dos polimorfismos com a recidiva geral, segundo o sítio tumoral e a modalidade terapêutica**

Os resultados obtidos a partir da análise dos polimorfismos em pacientes diagnosticados com CE oral e de orofaringe em relação à ocorrência de recidiva geral e da realização da radioterapia estão apresentados na tabela 7.

Na análise da recidiva geral, nos casos irradiados de tumores de cavidade oral e orofaringe (tabela 7), não foi encontrada significância estatística para os polimorfismos BCL2 -938C>A ( $p=0,923$ ), TP53 Arg72Pro ( $p=0,440$ ), TGF $\beta$  Pro10Leu ( $p=0,644$ ), TGF $\beta$  -509C>T ( $p=0,195$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p = 0,296$ ). No entanto, o polimorfismo ATM IVS62+60G>A foi significativamente relacionado com a recidiva geral em casos irradiados de oral, orofaringe ( $p=0,025$ ), sendo que a presença de pelo menos um alelo G (60G) foi mais frequente nos casos em que não ocorreu a recidiva geral (92,2%) do que nos casos que apresentaram a recidiva geral (73,3%).

Na mesma análise nos casos não irradiados de tumores de cavidade oral e orofaringe, não foi encontrada significância estatística para os polimorfismos BCL2 -938C>A ( $p=0,244$ ), TGF $\beta$  Pro10Leu ( $p=0,688$ ), TGF $\beta$  -509C>T ( $p=0,450$ ), ATM IVS62+60G>A ( $p=0,222$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p = 0,318$ ), relacionadas a ocorrência da recidiva geral. Entretanto, o polimorfismo TP53 Arg72Pro foi significativamente relacionado com a recidiva geral em casos não irradiados de oral, orofaringe ( $p=0,032$ ), sendo que a ausência do alelo Arg foi mais frequente nos casos em que ocorreu a recidiva geral (66,7%) do que nos casos que não apresentaram a recidiva geral (42,9%).

Tabela 7. Polimorfismos associados com a recidiva geral e tratamento radioterápico em pacientes diagnosticados com CE oral e de orofaringe.

Polimorfismos	ORAL, OROFARINGE									
	Casos irradiados					Casos não irradiados				
	Recidiva geral					Recidiva geral				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p
No.	(%)	No.	(%)	No.		(%)	No.	(%)		
<b>BCL2 -938C&gt;A</b>										
CC	15	29,4	9	30,0	0,923	21	42,9	12	30,8	0,244
CA+AA	35	68,6	20	66,7		28	57,1	27	69,2	
Não avaliado	1	2,0	1	3,3		0	0,0	0	0,0	
<b>TP53 Arg72Pro</b>										
Arg/Arg+Arg/Pro	21	41,2	15	50,0	0,440	27	55,1	13	33,3	0,032*
Pro/Pro	30	58,8	15	50,0		21	42,9	26	66,7	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		1	2,0	0	0,0	
<b>TGFβ Pro10Leu</b>										
Pro/Pro	12	23,5	6	20,0	0,644	8	16,3	5	12,8	0,688
Pro/Leu+Leu/Leu	37	72,5	24	80,0		40	81,6	32	82,1	
Não avaliado	2	3,9	0	0,0		1	2,0	2	5,1	
<b>TGFβ -509C&gt;T</b>										
CC	28	54,9	12	40,0	0,195	16	32,7	15	38,5	0,450
CT+TT	23	45,1	18	60,0		33	67,3	22	56,4	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	2	5,1	
<b>ATM IVS62+60G&gt;A</b>										
GG+GA	47	92,2	22	73,3	0,025*	42	85,7	36	92,3	0,222
AA	4	7,8	8	26,7		6	12,2	2	5,1	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		1	2,0	1	2,6	
<b>ATM Asp1853Asn</b>										
Asp/Asp	42	82,4	26	86,7	0,296	34	69,4	31	79,5	0,318
Asp/Asn+Asn/Asn	9	17,6	3	10,0		13	26,5	7	17,9	
Não avaliado	0	0,0	1	3,3		2	4,1	1	2,6	
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>63,0</b>	<b>30</b>	<b>37,0</b>		<b>49</b>	<b>55,7</b>	<b>39</b>	<b>44,3</b>	

p: valor de significância,  $p < 0,05$ ; \*: valores significativos.

Analisando os casos irradiados de tumores de laringe (tabela 8) os polimorfismos BCL2 -938C>A ( $p=0,495$ ), TP53 Arg72Pro ( $p=0,108$ ), TGFβ -509C>T ( $p=0,910$ ), ATM IVS62+60G>A ( $p=0,658$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p=0,139$ ) não apresentaram relação estatisticamente significativa com a recidiva geral. Ao contrário, o polimorfismo TGFβ Pro10Leu apresentou significância estatística ( $p=0,004$ ) em relação à recidiva geral nos casos de tumores de laringe irradiados, sendo que a

presença de pelo menos um alelo Leu foi mais frequente nos casos em que não ocorreu a recidiva geral (89,5%) do que nos casos que apresentaram a recidiva geral (45,5%).

**Tabela 8. Polimorfismos associados com a recidiva geral e tratamento radioterápico em pacientes diagnosticados com CE de laringe.**

Polimorfismos	LARINGE									
	Casos irradiados					Casos não irradiados				
	Recidiva geral					Recidiva geral				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p
No.	(%)	No.	(%)	No.		(%)	No.	(%)		
<b>BCL2 -938C&gt;A</b>										
CC	13	34,2	5	45,5	0,495	8	34,8	4	28,6	0,492
CA+AA	25	65,8	6	54,5		15	65,2	10	71,4	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
<b>TP53 Arg72Pro</b>										
Arg/Arg+Arg/Pro	24	63,2	4	36,4	0,108	11	47,8	4	28,6	0,209
Pro/Pro	14	36,8	7	63,6		12	52,2	10	71,4	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
<b>TGFb Pro10Leu</b>										
Pro/Pro	4	10,5	6	54,5	0,004*	6	26,1	3	21,4	0,586
Pro/Leu+Leu/Leu	34	89,5	5	45,5		17	73,9	10	71,4	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	1	7,1	
<b>TGFb -509C&gt;T</b>										
CC	18	47,4	5	45,5	0,910	11	47,8	4	28,6	0,261
CT+TT	20	52,6	6	54,5		12	52,2	9	64,3	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	1	7,1	
<b>ATM IVS62+60G&gt;A</b>										
GG+GA	31	81,6	9	81,8	0,658	18	78,3	12	85,7	0,458
AA	7	18,4	2	18,2		5	21,7	2	14,3	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
<b>ATM Asp1853Asn</b>										
Asp/Asp	30	78,9	11	100,0	0,139	19	82,6	11	78,6	0,631
Asp/Asn+Asn/Asn	7	18,4		0,0		4	17,4	2	14,3	
Não avaliado	1	2,6	0	0,0		0	0,0	1	7,1	
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>77,6</b>	<b>11</b>	<b>22,4</b>		<b>23</b>	<b>62,2</b>	<b>14</b>	<b>37,8</b>	

p: valor de significância,  $p < 0,05$ ; \*: valor significativo.

Na análise da recidiva geral, nos casos não irradiados de tumores de laringe (tabela 8), não foi encontrada significância estatística para os polimorfismos BCL2 -938C>A ( $p=0,492$ ), TP53 Arg72Pro ( $p=0,209$ ), TGF $\beta$  Pro10Leu ( $p=0,586$ ), TGF $\beta$  -509C>T ( $p=0,261$ ), ATM IVS62+60G>A ( $p=0,458$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p = 0,631$ ).

#### **4.4 Relação dos polimorfismos com a recidiva local, segundo o sítio tumoral e a modalidade terapêutica**

Na análise da recidiva local, somente o polimorfismo ATM IVS62+60G>A apresentou significância estatística ( $p=0,018$ ) nos casos de tumores irradiados de cavidade oral e orofaringe (tabela 9), sendo que a recidiva local não ocorreu em 91,2% dos casos na presença de pelo menos um alelo G, contra 70,8% de ocorrência dessa recidiva na presença desse mesmo alelo. A análise multivariada mostrou que a homozigose do alelo A aumenta em mais de 4 vezes a ocorrência de recidiva local nos casos de oral, orofaringe irradiados (OR=4,43; CI=1,22-16,13), quando comparada com a presença de pelo menos um alelo G (ver tabela 10). Contudo, os polimorfismos BCL2 -938C>A ( $p=0,706$ ), TP53 Arg72Pro ( $p=0,513$ ), TGF $\beta$  Pro10Leu ( $p=0,784$ ), TGF $\beta$  -509C>T ( $p=0,367$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p = 0,527$ ) não apresentaram relação estatística significativa com a recidiva local nos casos de tumores irradiados de oral, orofaringe.

Na análise da recidiva local nos casos de tumores não irradiados de cavidade oral e orofaringe (ver tabela 9), não foi encontrada significância estatística para os polimorfismos BCL2 -938C>A ( $p=0,478$ ), TP53 Arg72Pro ( $p=0,185$ ), TGF $\beta$  Pro10Leu ( $p=0,316$ ), TGF $\beta$  -509C>T ( $p=0,855$ ), ATM IVS62+60G>A ( $p=0,513$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p = 0,457$ ).



Tabela 9. Polimorfismos associados com a recidiva local e tratamento radioterápico em pacientes diagnosticados com CE oral e de orofaringe.

Polimorfismos	ORAL, OROFARINGE									
	Casos irradiados					Casos não irradiados				
	Recidiva local					Recidiva local				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p
No.	(%)	No.	(%)	No.		(%)	No.	(%)		
<b>BCL2 -938C&gt;A</b>										
CC	16	28,1	8	33,3	0,706	24	40,0	9	32,1	0,478
CA+AA	39	68,4	16	66,7		36	60,0	19	67,9	
Não avaliado	2	3,5	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
<b>TP53 Arg72Pro</b>										
Arg/Arg+Arg/Pro	24	42,1	12	50,0	0,513	30	50,0	10	35,7	0,185
Pro/Pro	33	57,9	12	50,0		29	48,3	18	64,3	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		1	1,7	0	0,0	
<b>TGFb Pro10Leu</b>										
Pro/Pro	13	22,8	5	20,8	0,784	10	16,7	3	10,7	0,316
Pro/Leu+Leu/Leu	42	73,7	19	79,2		47	78,3	25	89,3	
Não avaliado	2	3,5	0	0,0		3	5,0	0	0,0	
<b>TGFb -509C&gt;T</b>										
CC	30	52,6	10	41,7	0,367	22	36,7	9	32,1	0,855
CT+TT	27	47,4	14	58,3		38	63,3	17	60,7	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	2	7,1	
<b>ATM IVS62+60G&gt;A</b>										
GG+GA	52	91,2	17	70,8	0,018*	53	88,3	25	89,3	0,513
AA	5	8,8	7	29,2		6	10,0	2	7,1	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		1	1,7	1	3,6	
<b>ATM Asp1853Asn</b>										
Asp/Asp	48	84,2	20	83,3	0,527	43	71,7	22	78,6	0,457
Asp/Asn+Asn/Asn	9	15,8	3	12,5		15	25,0	5	17,9	
Não avaliado	0	0,0	1	4,2		2	3,3	1	3,6	
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>70,4</b>	<b>24</b>	<b>29,6</b>		<b>60</b>	<b>68,2</b>	<b>28</b>	<b>31,8</b>	

p: valor de significância,  $p < 0,05$ ; \*: valor significativo.

Similarmente à análise anterior, também não foi encontrada significância estatística para os polimorfismos BCL2 -938C>A ( $p=0,284$ ), TP53 Arg72Pro ( $p=0,119$ ), TGF $\beta$  Pro10Leu ( $p=0,398$ ), TGF $\beta$  -509C>T ( $p=0,427$ ), ATM IVS62+60G>A ( $p=0,373$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p=0,524$ ) em relação à recidiva local nos pacientes com câncer de laringe não submetidos à radioterapia (tabela 11).

Nos pacientes com câncer de laringe submetidos à radioterapia, os polimorfismos BCL2 -938C>A ( $p=0,627$ ), TP53 Arg72Pro ( $p=0,200$ ), TGF $\beta$  -509C>T ( $p=0,424$ ), ATM IVS62+60G>A ( $p=0,457$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p=0,253$ ) não apresentaram relação significativa (ver tabela 11).

**Tabela 10. Análise multivariada das margens cirúrgicas e do polimorfismo ATMIVS62+60G>A em pacientes diagnosticados com CE oral e de orofaringe, submetidos à radioterapia e relacionando com a recidiva local.**

Variáveis	RECIDIVA LOCAL	
	Oral, Orofaringe	
	Irradiados	
	OR (95% CI)	p
<b>Margens cirúrgicas</b>		
Negativa	1	
Positiva	2,51 (0,71-8,87)	0,153
<b>ATM IVS62+60G&gt;A</b>		
GG+GA	1	
<u>AA</u>	4,43 (1,22-16,13)	0,024*

p: valor de significância,  $p<0,05$ ; OR: odds ratio; CI: Intervalo de confiança; \*: valor significativo.

No entanto, o polimorfismo TGF $\beta$  Pro10Leu foi significativamente associado à recidiva local nos casos irradiados de tumores de laringe ( $p=0,005$ ), sendo que a presença de pelo menos um alelo Leu foi mais frequente nos casos em que não ocorreu recidiva local (87,8%) do que nos casos em que houve recidiva local da doença (37,5%). A análise multivariada (tabela 12) mostrou que a presença de pelo menos um alelo Leu diminui o risco de recidiva local em 10 vezes em relação à presença da homozigose Pro (OR=0,09; CI=0,02-0,53).

Tabela 11. Polimorfismos associados com a recidiva local e tratamento radioterápico em pacientes diagnosticados com CE de laringe.

Polimorfismos	LARINGE									
	Casos irradiados					Casos não irradiados				
	Recidiva local					Recidiva local				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p
No.	(%)	No.	(%)	No.		(%)	No.	(%)		
<b>BCL2 -938C&gt;A</b>										
CC	15	36,6	3	37,5	0,627	10	37,0	2	20,0	0,284
CA+AA	26	63,4	5	62,5		17	63,0	8	80,0	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
<b>TP53 Arg72Pro</b>										
Arg/Arg+Arg/Pro	25	61,0	3	37,5	0,200	13	48,1	2	20,0	0,119
Pro/Pro	16	39,0	5	62,5		14	51,9	8	80,0	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
<b>TGFb Pro10Leu</b>										
Pro/Pro	5	12,2	5	62,5	0,005*	6	22,2	3	30,0	0,398
Pro/Leu+Leu/Leu	36	87,8	3	37,5		21	77,8	6	60,0	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	1	10,0	
<b>TGFb -509C&gt;T</b>										
CC	20	48,8	3	37,5	0,424	12	44,4	3	30,0	0,427
CT+TT	21	51,2	5	62,5		15	55,6	6	60,0	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	1	10,0	
<b>ATM IVS62+60G&gt;A</b>										
GG+GA	34	82,9	6	75,0	0,457	21	77,8	9	90,0	0,373
AA	7	17,1	2	25,0		6	22,2	1	10,0	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
<b>ATM Asp1853Asn</b>										
Asp/Asp	33	80,5	8	100,0	0,253	22	81,5	8	80,0	0,524
Asp/Asn+Asn/Asn	7	17,1	0	0,0		5	18,5	1	10,0	
Não avaliado	1	2,4	0	0,0		0	0,0	1	10,0	
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>83,7</b>	<b>8</b>	<b>16,3</b>		<b>27</b>	<b>73,0</b>	<b>10</b>	<b>27,0</b>	

p: valor de significância,  $p < 0,05$ ; \*: valor significativo.

**Tabela 12. Análise multivariada das margens cirúrgicas e do polimorfismo TGF $\beta$  Pro10Leu em pacientes diagnosticados com CE de laringe, submetidos à radioterapia e relacionando com a recidiva local.**

Variáveis	RECIDIVA LOCAL	
	Laringe	
	Irradiados	
	OR (95% CI)	p
<b>Margens cirúrgicas</b>		
Negativa	1	
Positiva	1,43 (0,15-13,40)	0,752
<b>TGF<math>\beta</math> Pro10Leu</b>		
Pro/Pro	1	
Pro/Leu+Leu/Leu	0,09 (0,02-0,53)	0,008*

p: valor de significância,  $p < 0,05$ ; OR: odds ratio;  
CI: Intervalo de confiança; \*: valor significativo.

#### 4.5 Relação dos polimorfismos com o óbito, segundo o sítio tumoral e a modalidade terapêutica

Analisando a ocorrência de óbito nos casos irradiados de tumores na cavidade oral e orofaringe, não foi encontrada relação estatisticamente significativa para os polimorfismos BCL2 -938C>A ( $p=0,651$ ), TP53 Arg72Pro ( $p=0,509$ ), TGF $\beta$  Pro10Leu ( $p=0,309$ ), ATM IVS62+60G>A ( $p=0,124$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p = 0,459$ ). Dados mostrados na tabela 13. No entanto, o polimorfismo TGF $\beta$  -509C>T apresentou relação significativa nos casos de tumores irradiados de oral, orofaringe ( $p=0,023$ ), sendo que a presença de pelo menos um alelo T foi mais frequente nos casos em que ocorreu o óbito (68,2%) do que nos casos em que os pacientes não foram a óbito (45,3%).

Em relação aos casos não irradiados de cavidade oral e orofaringe, os polimorfismos BCL2 -938C>A ( $p=0,788$ ), TGF $\beta$  Pro10Leu ( $p=0,383$ ), TGF $\beta$  -509C>T ( $p=0,416$ ),

ATM IVS62+60G>A ( $p=0,235$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p = 0,725$ ) não apresentaram relação significativa com a ocorrência de óbito.

**Tabela 13. Polimorfismos associados com o óbito e tratamento radioterápico em pacientes diagnosticados com CE oral e de orofaringe.**

Polimorfismos	ORAL, OROFARINGE									
	Casos irradiados					Casos não irradiados				
	Óbito					Óbito				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p
No.	(%)	No.	(%)	No.		(%)	No.	(%)		
<b>BCL2 -938C&gt;A</b>										
CC	15	28,3	14	31,8	0,651	23	38,3	16	41,0	0,788
CA+AA	38	71,7	29	65,9		37	61,7	23	59,0	
Não avaliado	0	0,0	1	2,3		0	0,0	0	0,0	
<b>TP53 Arg72Pro</b>										
Arg/Arg+Arg/Pro	24	45,3	17	38,6	0,509	33	55,0	13	33,3	0,028*
Pro/Pro	29	54,7	27	61,4		26	43,3	26	66,7	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		1	1,7	0	0,0	
<b>TGFb Pro10Leu</b>										
Pro/Pro	14	26,4	8	18,2	0,309	9	15,0	4	10,3	0,383
Pro/Leu+Leu/Leu	38	71,7	36	81,8		50	83,3	33	84,6	
Não avaliado	1	1,9	0	0,0		1	1,7	2	5,1	
<b>TGFb -509C&gt;T</b>										
CC	29	54,7	14	31,8	0,023*	21	35,0	16	41,0	0,416
CT+TT	24	45,3	30	68,2		39	65,0	21	53,8	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	2	5,1	
<b>ATM IVS62+60G&gt;A</b>										
GG+GA	48	90,6	35	79,5	0,124	52	86,7	36	92,3	0,235
AA	5	9,4	9	20,5		7	11,7	2	5,1	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		1	1,7	1	2,6	
<b>ATM Asp1853Asn</b>										
Asp/Asp	44	83,0	38	86,4	0,459	44	73,3	30	76,9	0,725
Asp/Asn+Asn/Asn	9	17,0	5	11,4		14	23,3	8	20,5	
Não avaliado	0	0,0	1	2,3		2	3,3	1	2,6	
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>54,6</b>	<b>44</b>	<b>45,4</b>		<b>60</b>	<b>60,6</b>	<b>39</b>	<b>39,4</b>	

p: valor de significância,  $p<0,05$ ; \*: valores significativos.

Contudo, o polimorfismo TP53 Arg72Pro apresentou significância estatística nos casos de oral, orofaringe não irradiados ( $p=0,028$ ). A presença do homocigoto Pro72

foi mais frequente nos casos em que foram à óbito (66,7%) do que nos casos em que os pacientes não morreram (43,3%). A análise multivariada mostrou que a homozigose Pro72 aumenta em mais de duas vezes o risco do paciente ir à óbito, em relação aos casos não homozigotos para Pro72 (OR=2,65; CI=1,05-6,65; Tabela 14).

**Tabela 14. Análise multivariada do estágio e dos polimorfismos TP53 Arg72Pro, TGFβ -509C>T e ATM IVS62+60G>A em pacientes diagnosticados com CE oral e de orofaringe, submetidos ou não à radioterapia e relacionando com o óbito.**

Variáveis	ÓBITO			
	Oral, Orofaringe			
	Irrradiados		Não irradiados	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
<b>Estádio</b>				
I, II	1		1	
III	<i>undefined</i>		2,15 (0,69-6,69)	0,186
IV	<i>undefined</i>		5,83 (2,00-16,99)	0,001*
<b>TP53 Arg72Pro</b>				
Arg/Arg+Arg/Pro	—	—	1	
Pro/Pro	—	—	2,65 (1,05-6,65)	0,038*
<b>TGFβ -509C&gt;T</b>				
CC	1		—	—
CT+TT	2,15 (0,90-5,17)	0,086	—	—
<b>ATM IVS62+60G&gt;A</b>				
GG+GA	1		—	—
AA	1,85 (0,55-6,28)	0,322	—	—

p: valor de significância, p<0,05; OR: odds ratio; CI: Intervalo de confiança;

\*: valores significativos.

Nos casos de tumores de laringe irradiados (ver tabela 15), os polimorfismos BCL2 - 938C>A (p=0,079), TP53 Arg72Pro (p=0,315), TGFβ -509C>T (p=0,950), ATM IVS62+60G>A (p=0,213) e ATM Asp1853Asn (p=0,600) não apresentaram relação significativa para a ocorrência de óbito. Contudo, o polimorfismo TGFβ Pro10Leu foi significativamente associado com o óbito dos casos de laringe irradiados (p=0,033). A presença de pelo menos um alelo Leu10 foi mais frequente nos casos em que não

ocorreu o óbito (89,7%), do que nos casos em que os indivíduos foram a óbito (63,2%). Esse resultado foi confirmado pela análise multivariada, que apontou que a presença do alelo Leu10 diminui em aproximadamente 5 vezes o risco de morte, em relação à ausência do alelo Leu10 (OR=0,18; CI=0,04-0,86; tabela 16).

**Tabela 15. Polimorfismos associados com o óbito e o tratamento radioterápico em pacientes diagnosticados com CE de laringe.**

Polimorfismos	LARINGE									
	Casos irradiados					Casos não irradiados				
	Óbito				p	Óbito				p
	Não		Sim			Não		Sim		
No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)		
<b>BCL2 -938C&gt;A</b>										
CC	8	27,6	10	52,6	0,079	12	41,4	5	27,8	0,345
CA+AA	21	72,4	9	47,4		17	58,6	13	72,2	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
<b>TP53 Arg72Pro</b>										
Arg/Arg+Arg/Pro	18	62,1	9	47,4	0,315	12	41,4	9	50,0	0,563
Pro/Pro	11	37,9	10	52,6		17	58,6	9	50,0	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
<b>TGFb Pro10Leu</b>										
Pro/Pro	3	10,3	7	36,8	0,033*	6	20,7	5	27,8	0,622
Pro/Leu+Leu/Leu	26	89,7	12	63,2		22	75,9	13	72,2	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		1	3,4	0	0,0	
<b>TGFb -509C&gt;T</b>										
CC	14	48,3	9	47,4	0,95	13	44,8	2	11,1	0,012*
CT+TT	15	51,7	10	52,6		15	51,7	16	88,9	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		1	3,4	0	0,0	
<b>ATM IVS62+60G&gt;A</b>										
GG+GA	22	75,9	17	89,5	0,213	23	79,3	14	77,8	0,588
AA	7	24,1	2	10,5		6	20,7	4	22,2	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
<b>ATM Asp1853Asn</b>										
Asp/Asp	24	82,8	16	84,2	0,600	23	79,3	16	88,9	0,429
Asp/Asn+Asn/Asn	4	13,8	3	15,8		5	17,2	2	11,1	
Não avaliado	1	3,4	0	0,0		1	3,4	0	0,0	
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>60,4</b>	<b>19</b>	<b>39,6</b>		<b>29</b>	<b>61,7</b>	<b>18</b>	<b>38,3</b>	

p: valor de significância, p<0,05; \*: valores significativos.

Nos casos não irradiados de laringe (tabela 15), o polimorfismo do gene TGF $\beta$  - 509C>T apresentou relação significativa com o óbito ( $p=0,012$ ). Nesse caso, a presença de pelo menos um alelo T foi mais frequente nos casos em que ocorreu o óbito (88,9%) do que nos casos em que isso não aconteceu (51,7%). A análise multivariada mostra que a presença de ao menos um alelo T aumenta em 9 vezes o risco de óbito, em relação à ausência deste mesmo alelo (OR=9,11; CI=1,51-27,91; tabela 16). A mesma relação não foi significativa para os polimorfismos BCL2 - 938C>A ( $p=0,345$ ), TP53 Arg72Pro ( $p=0,563$ ), TGF $\beta$  Pro10Leu ( $p=0,622$ ), ATM IVS62+60G>A ( $p=0,588$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p = 0,429$ ).

**Tabela 16. Análise multivariada do estágio e dos polimorfismos BCL2 -938C>A, TGF $\beta$  -509C>T e TGF $\beta$  Pro10Leu em pacientes diagnosticados com CE de laringe, submetidos ou não à radioterapia e relacionando com o óbito.**

Variáveis	ÓBITO			
	Laringe			
	Irradiados		Não irradiados	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
<b>Estádio</b>				
I, II	1		1	
III	0,54 (0,03-9,41)	0,671	1,12 (0,21-5,94)	0,890
IV	0,66 (0,07-6,20)	0,717	5,27 (1,00-27,91)	0,050*
<b>BCL2 -938C&gt;A</b>				
CC	1		—	—
CA+AA	0,33 (0,08-1,26)	0,105	—	—
<b>TGF<math>\beta</math> -509C&gt;T</b>				
CC	—	—	1	
CT+TT	—	—	9,11 (1,51-54,93)	0,016*
<b>TGF<math>\beta</math> Pro10Leu</b>				
Pro/Pro	1		—	—
Pro/Leu+Leu/Leu	0,18 (0,04-0,86)	0,032*	—	—

p: valor de significância,  $p<0,05$ ; OR: odds ratio; CI: Intervalo de confiança;

\*: valores significativos.



## 4.6 Relação dos polimorfismos com a sobrevida

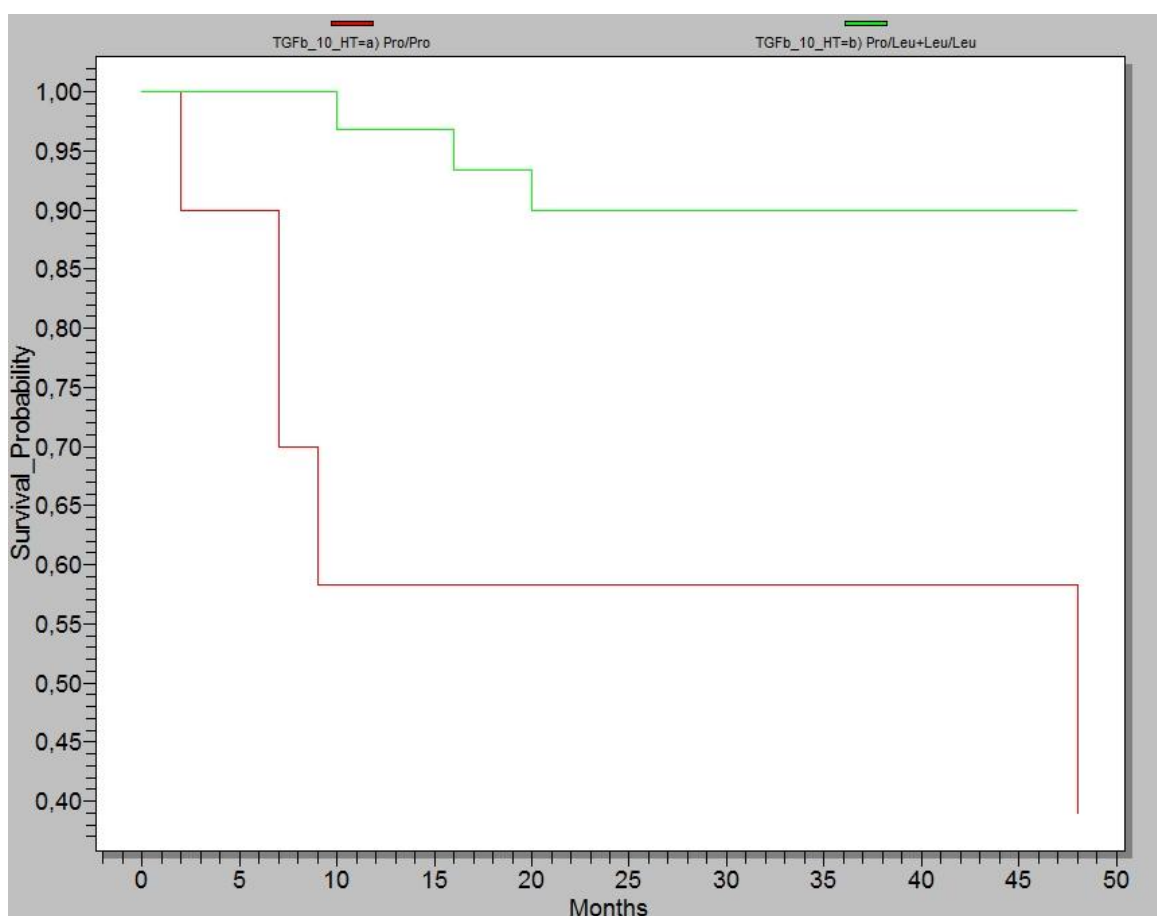
### 4.6.1 Sobrevida livre de doença local

A sobrevida livre de doença local dos pacientes com CE oral+orofaringe irradiados não foi significativamente relacionada com os polimorfismos BCL2 -938C>A ( $p=0,114$ ), TP53 Arg72Pro ( $p=0,751$ ), TGF $\beta$  Pro10Leu ( $p=0,978$ ), TGF $\beta$  -509C>T ( $p=0,221$ ), ATM IVS62+60G>A ( $p=0,140$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p=0,808$ ).

Igualmente, os casos não irradiados com tumores de cavidade oral e orofaringe não tiveram a sua sobrevida livre de doença local relacionada com os polimorfismos BCL2 -938C>A ( $p=0,582$ ), TP53 Arg72Pro ( $p=0,226$ ), TGF $\beta$  Pro10Leu ( $p=0,377$ ), TGF $\beta$  -509C>T ( $p=0,956$ ), ATM IVS62+60G>A ( $p=0,493$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p=0,567$ ).

A sobrevida livre de doença local dos casos com câncer de laringe irradiados não mostrou relação com os polimorfismos BCL2 -938C>A ( $p=0,486$ ), TP53 Arg72Pro ( $p=0,214$ ), TGF $\beta$  -509C>T ( $p=0,684$ ), ATM IVS62+60G>A ( $p=0,550$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p=0,206$ ).

No entanto, o polimorfismo TGF $\beta$  Pro10Leu apresentou significância estatística nos casos de tumores de laringe irradiados em relação à sobrevida livre de doença local ( $p<0,001$ ). Segundo a figura 6, nos primeiros 12 meses, aproximadamente 40% dos indivíduos homocigotos Pro10 apresentaram a recidiva da doença local, enquanto menos de 5% dos indivíduos sem a mesma homocigose recidivaram no mesmo período. A análise multivariada aponta que a homocigose Pro10 aumenta o risco de precocidade da recidiva local em mais de 7 vezes, quando comparada com a ausência desta homocigose (HR=0,13; CI=0,03-0,59; tabela 17).



**Figura 6. Sobrevida livre de doença local de pacientes com CE de laringe, submetidos à radioterapia (n=8), associada com o polimorfismo TGFβ Pro10Leu ( $p < 0,001$ ).**

Na análise dos gráficos de sobrevida livre de doença local em tumores não irradiados de laringe, não foi encontrada significância para os polimorfismos BCL2 - 938C>A ( $p=0,398$ ), TP53 Arg72Pro ( $p=0,086$ ), TGFβ Pro10Leu ( $p=0,592$ ), TGFβ - 509C>T ( $p=0,634$ ), ATM IVS62+60G>A ( $p=0,465$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p=0,648$ ).

Tabela 17. Análise multivariada das margens cirúrgicas e dos polimorfismos TP53 Arg72Pro e TGFβ Pro10Leu em pacientes diagnosticados com CE de laringe, submetidos ou não à radioterapia e relacionando com a sobrevida livre de doença local.

Variáveis	LIVRE DE DOENÇA LOCAL			
	Laringe			
	Irradiados		Não irradiados	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
<b>Margens cirúrgicas</b>				
Negativa	1		1	
Positiva	1,35 (0,25-7,20)	0,729		
<b>TP53 Arg72Pro</b>				
Arg/Arg+Arg/Pro	—	—		
Pro/Pro	—	—		
<b>TGFβ Pro10Leu</b>				
Pro/Pro	1		—	—
Pro/Leu+Leu/Leu	0,13 (0,03-0,59)	0,008*	—	—

p: valor de significância,  $p < 0,05$ ; HR: hazard ratio; CI: Intervalo de confiança;  
\*: valor significativo.

#### 4.6.2 Sobrevida doença específica

As curvas de sobrevida doença específica de casos irradiados de cavidade oral e orofaringe não apresentaram significância para os polimorfismos TP53 Arg72Pro ( $p=0,741$ ), TGFβ Pro10Leu ( $p=0,687$ ), ATM IVS62+60G>A ( $p=0,320$ ) e ATM Asp1853Asn ( $p=0,745$ ). Contudo, os polimorfismos BCL2 -938C>A e TGFβ -509C>T foram significativamente relacionados com a sobrevida doença específica, em casos irradiados de oral, orofaringe ( $p=0,048$  e  $p=0,004$ , respectivamente).

Segundo a figura 7, referente à curva de sobrevida doença específica do BCL2 -938C>A em pacientes irradiados com tumores de cavidade oral+orofaringe, percebe-se que em um período de 25 meses, 55% dos pacientes que não possuíam o alelo A morreram, enquanto no mesmo período, esse percentual foi de 25% em

pacientes que possuíam esse mesmo alelo. A análise multivariada mostrou que a ausência do alelo A aumenta em 2 vezes o risco de óbito precoce pelo câncer, quando comparada com a presença de pelo menos um alelo A (HR=0,46; CI=0,24-0,90; tabela 18).

Para o polimorfismo TGF $\beta$  -509C>T, 40% dos indivíduos portadores de pelo menos um alelo T morreram em decorrência da doença nos primeiros 20 meses de acompanhamento, enquanto neste mesmo período, 85% das pessoas não portadoras do alelo T sobreviveram (figura 8). A análise multivariada mostrou que a presença do alelo T aumenta em mais de 2 vezes a precocidade da morte pelo câncer, em relação à ausência desse alelo (HR=2,20; CI=1,12-4,29; tabela 18).

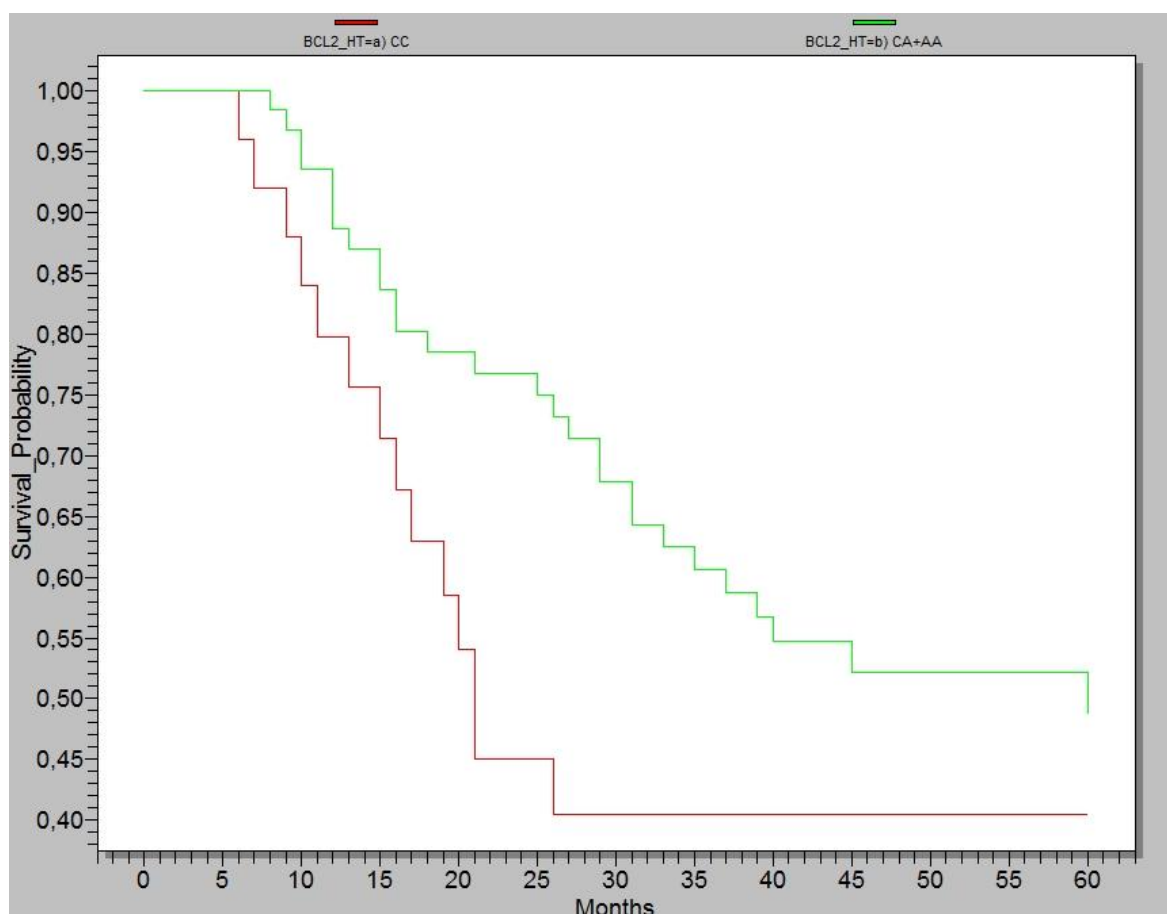
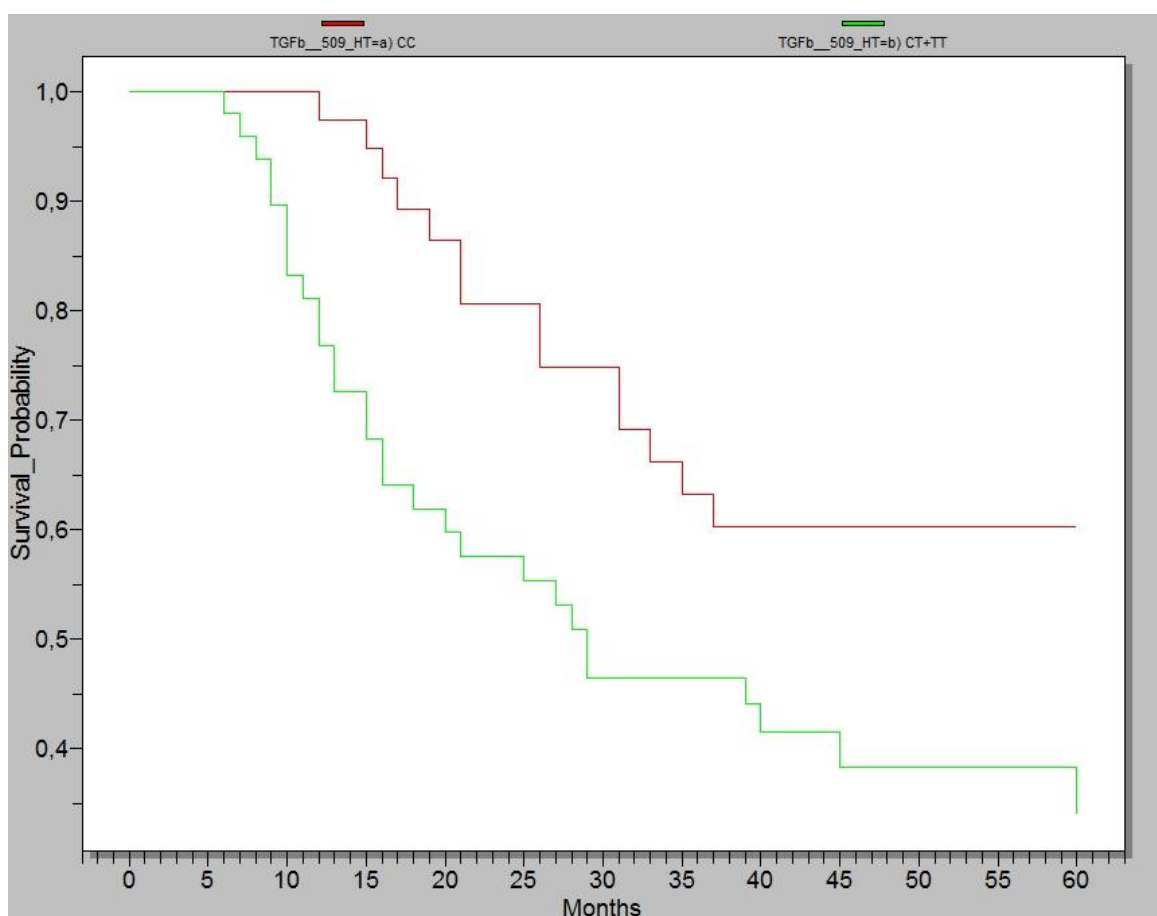


Figura 7. Sobrevida doença específica de pacientes com CE oral e de orofaringe, submetidos à radioterapia (n=43), associada com o polimorfismo BCL2 -938C>A (p=0,048).



**Figura 8. Sobrevida doença específica de pacientes com CE oral e de orofaringe, submetidos à radioterapia (n=44), associada com o polimorfismo TGFβ -509C>T (p=0,004).**

Com relação à sobrevida doença específica dos pacientes com tumores não irradiados de cavidade oral e orofaringe, não houve relação significativa para os polimorfismos BCL2 -938C>A (p=0,371), TP53 Arg72Pro (p=0,374), TGFβ Pro10Leu (p=0,262), TGFβ -509C>T (p=0,453), ATM IVS62+60G>A (p=0,112) e ATM Asp1853Asn (p=0,398).

Tabela 18. Análise multivariada do estágio e dos polimorfismos BCL2 -938C>A, TGFβ -509C>T e ATM IVS62+60G>A em pacientes diagnosticados com CE oral e de orofaringe, submetidos ou não à radioterapia e relacionando com a sobrevida doença específica.

Variáveis	DOENÇA ESPECÍFICA			
	Oral, Orofaringe			
	Irradiados		Não irradiados	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
<b>Estádio</b>				
I, II	1		1	
III	<i>undefined</i>		1,73 (0,72-4,19)	0,222
IV	<i>undefined</i>		6,04 (2,87-12,74)	< 0,001*
<b>BCL2 -938C&gt;A</b>				
CC	1	—	—	—
CA+AA	0,46 (0,24-0,90)	0,024*	—	—
<b>TGFβ -509C&gt;T</b>				
CC	1	—	—	—
CT+TT	2,20 (1,12-4,29)	0,022*	—	—
<b>ATM IVS62+60G&gt;A</b>				
GG+GA	—	—	1	—
AA	—	—	0,43 (0,10-1,78)	0,243

p: valor de significância, p<0,05; HR: hazard ratio; CI: Intervalo de confiança;

\*: valores significativos.

Nos pacientes com tumores de laringe irradiados, a sobrevida doença específica não apresentou relação significativa para os polimorfismos TP53 Arg72Pro (p=0,573), TGFβ -509C>T (p=0,695), ATM IVS62+60G>A (p=0,551) e ATM Asp1853Asn (p=0,868). No entanto, houve relação com os polimorfismos BCL2 -938C>A e TGFβ Pro10Leu (respectivamente, p=0,013 e p=0,003). Segundo a figura 9, referente à sobrevida doença específica dos casos irradiados de laringe do BCL2 -938C>A, percebe-se que 35% dos pacientes não portadores do alelo A morreram como consequência do câncer em um período de 20 meses, enquanto que somente 10% dos pacientes portadores do alelo A morreram nesse mesmo período. A análise multivariada mostrou que a presença de pelo menos um alelo A diminui em aproximadamente 3 vezes a precocidade da morte em decorrência da doença em questão, em relação à ausência desse alelo (HR=0,32; CI=0,12-0,83; tabela 19).

Segundo a figura 10, referente à sobrevida doença específica do polimorfismo TGF $\beta$  Pro10Leu nos casos com tumor de laringe irradiado, nos primeiros 12 meses de acompanhamento, 50% dos indivíduos não portadores do alelo Leu10 morreram em decorrência da doença, enquanto que nesse mesmo período, cerca de 5% dos pacientes portadores de pelo menos um alelo Leu10 morreram. A análise multivariada mostrou que a presença do alelo Leu10 diminui em 5 vezes o risco de precocidade de morte, em relação à ausência desse mesmo alelo em tumores de laringe irradiados (HR=0,21; CI=0,07-0,60; tabela 19).

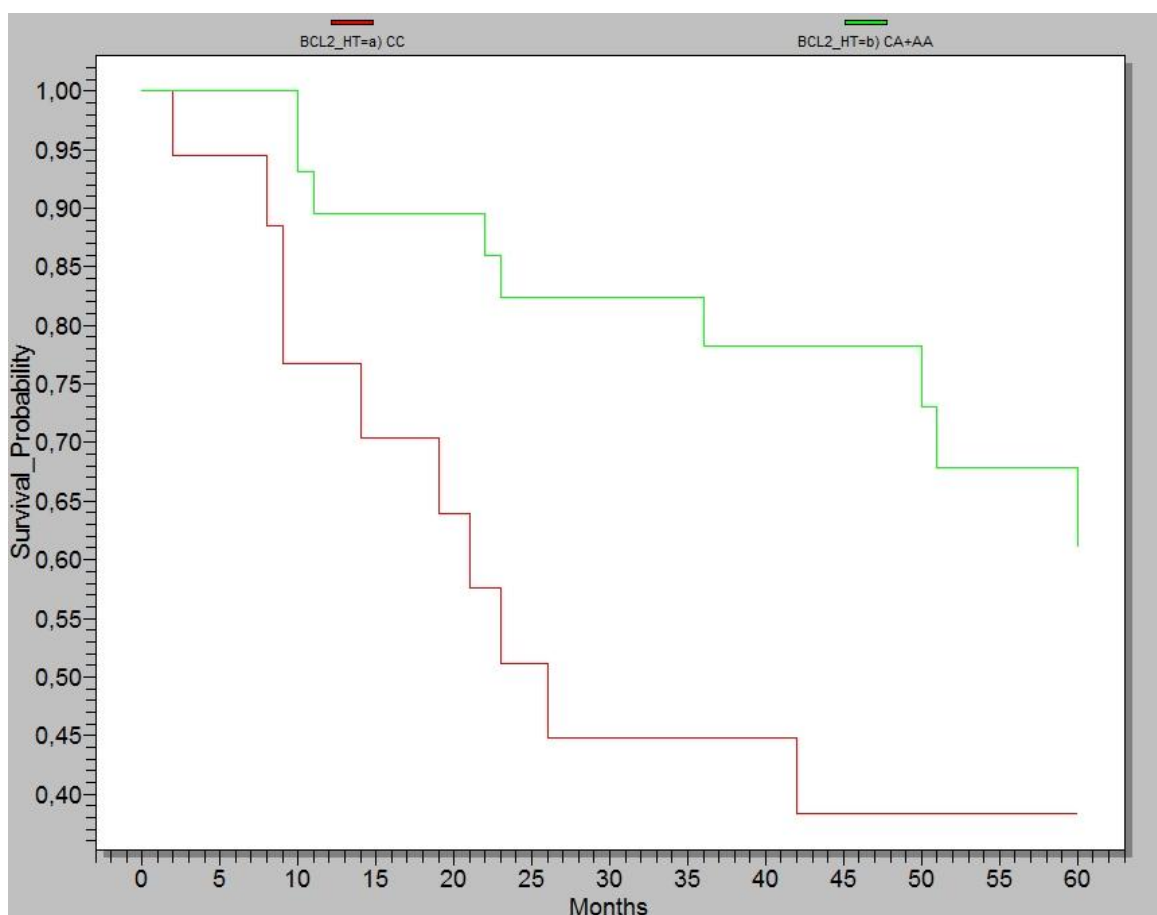


Figura 9. Sobrevida doença específica de pacientes com CE de laringe, submetidos à radioterapia (n=19), associada com o polimorfismo BCL2 -938C>A (p=0,013).

Tabela 19. Análise multivariada do estágio e dos polimorfismos, BCL2 -938C>A, TGFβ -509C>T e TGFβ Pro10Leu em pacientes diagnosticados com CE de laringe, submetidos ou não à radioterapia e relacionando com a sobrevida doença específica.

Variáveis	DOENÇA ESPECÍFICA			
	Laringe			
	Irradiados		Não irradiados	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
<b>Estádio</b>				
I, II	1		1	
III	0,51 (0,07-3,66)	0,502	1,67 (0,44-6,32)	0,449
IV	0,42 (0,09-2,04)	0,283	5,31 (1,69-16,74)	0,004*
<b>BCL2 -938C&gt;A</b>				
CC	1		—	—
CA+AA	0,32 (0,12-0,83)	0,019*	—	—
<b>TGFβ -509C&gt;T</b>				
CC	—	—	1	
CT+TT	—	—	3,89 (0,89-17,05)	0,072
<b>TGFβ Pro10Leu</b>				
Pro/Pro	1		—	—
Pro/Leu+Leu/Leu	0,21 (0,07-0,60)	0,003*	—	—

p: valor de significância, p<0,05; HR: hazard ratio; CI: Intervalo de confiança;

\*: valores significativos.

Em relação à sobrevida doença específica dos casos de tumores não irradiados de laringe, os polimorfismos BCL2 -938C>A (p=0,284), TP53 Arg72Pro (p=0,567), TGFβ Pro10Leu (p=0,816), ATM IVS62+60G>A (p=0,663) e ATM Asp1853Asn (p=0,489) não apresentaram associação significante. Contudo, apesar de não significante na margem de erro estipulada pelo estudo, o polimorfismo TGFβ -509C>T apresentou uma tendência à significância (p=0,056). Porém, a análise multivariada não confirmou a presença do alelo T como fator independente relacionado com a precocidade do óbito destes pacientes (OR=3,89; IC=0,89-17,05; tabela 19).



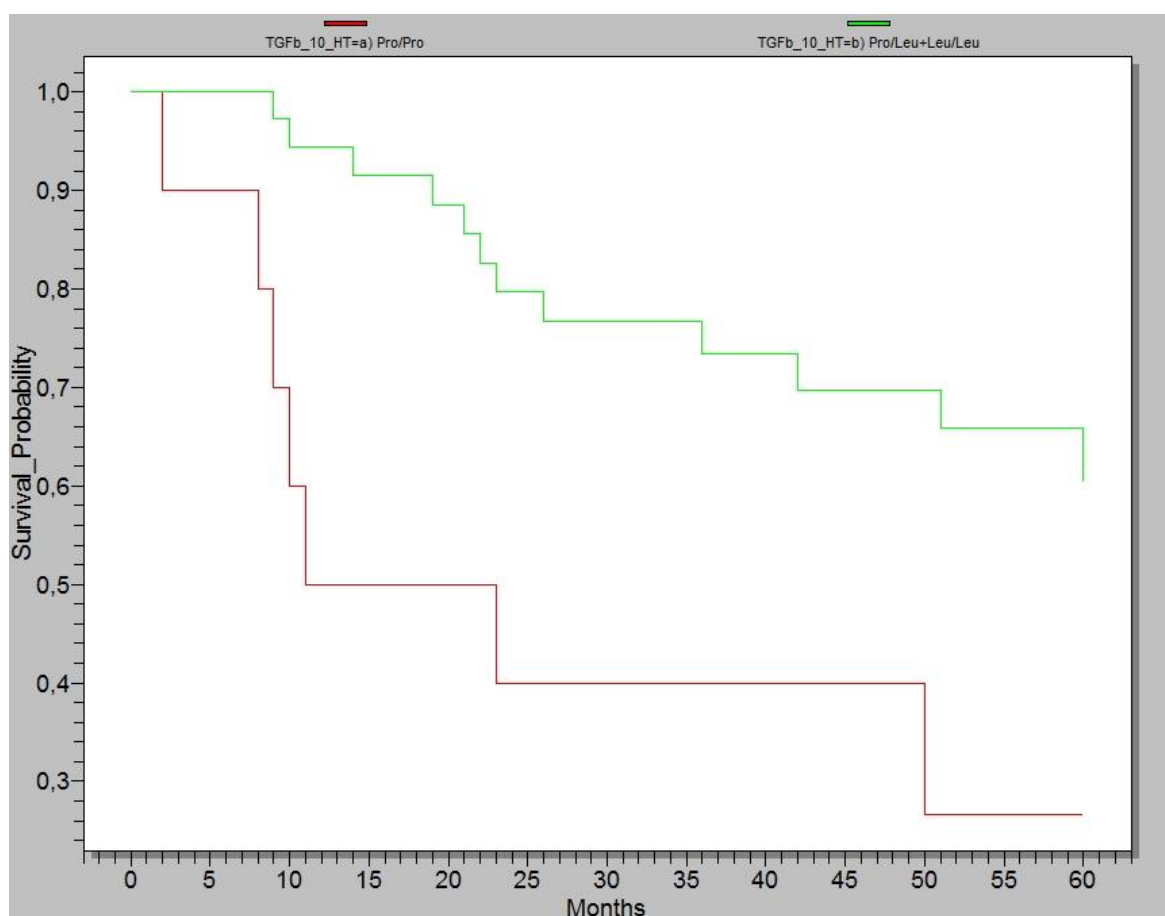


Figura 10. Sobrevida doença específica de pacientes com CE de laringe, submetidos à radioterapia (n=19), associada com o polimorfismo TGF $\beta$  Pro10Leu (p=0,003).

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho analisamos a relação entre seis polimorfismos com a resposta prognóstica dos pacientes, analisando por sítio anatômico e modalidade terapêutica. Dos seis polimorfismos analisados, somente o polimorfismo ATM Asp1853Asn (rs1801516) não apresentou relação significativa para nenhuma das variáveis analisadas.

Esse resultado pode indicar que realmente esse polimorfismo não está relacionado com o prognóstico dos pacientes em relação à radioterapia. Porém, esse resultado pode não ser conclusivo devido à frequência muito discrepante apresentada entre os três genótipos, sendo que somente dois casos do genótipo Asp/Asp foram registrados e 52 casos do heterozigoto Asp/Asn, totalizando apenas 17,3% de pacientes portadores de ao menos um alelo Asp. Essas frequências são opostas às encontradas por Zschenker et al (2010) na população alemã, em que 97% dos indivíduos analisados portavam ao menos um alelo Asp. Zou et al (2014) também não conseguiu chegar a uma conclusão definitiva sobre a atuação do polimorfismo ATM Asp1853Asn na radiosensibilidade devido à baixa frequência dos alelos variantes.

Dessa forma, a proporção genotípica apresentada pelo polimorfismo ATM Asp1853Asn talvez não permitiu que uma possível relação de significância tivesse sido registrada, como ocorrida no trabalho de Alsbeih e colaboradores (2007), onde a presença do alelo ATM 1853Asn aumenta a radiosensibilidade nos pacientes com câncer. Por outro lado, Zschenker et al (2010) registraram que a presença do alelo ATM 1853Asn reduz o risco de fibrose em pacientes com câncer de mama. Porém, similarmente aos nossos dados, o trabalho de Andreassen et al (2005) mostrou que o polimorfismo ATM Asp1853Asn não possui associação com o risco de fibrose subcutânea induzida por radiação em pacientes com câncer de mama.

A frequência genotípica apresentada pelo polimorfismo ATM IVS62+60G>A (rs664143) foi de 37,6% de homozigotos GG, 46,6% de heterozigotos e 15,1% de indivíduos AA. Frequências semelhantes foram encontradas em pacientes norte-americanos com câncer de mama, em que 35,8% dos pacientes eram GG, 44,9%

GA e 19,3% de AA (TAMIMI et al, 2004). Diferentemente, Lee et al (2005) encontrou uma frequência genotípica diferente em pacientes coreanos com câncer de mama (18,6% GG, 52,2% GA e 29,1% AA).

O polimorfismo rs664143 apresentou significância em relação à recidiva local nos casos de tumores irradiados de cavidade oral e orofaringe, sendo que a presença da homozigose do alelo A aumenta em mais de 4 vezes a ocorrência de recidiva, quando comparada com a presença de pelo menos um alelo G.

Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Lee et al (2005), que encontrou um aumento no risco de câncer de mama em pacientes portadores dos genótipos IVS62+60 GA ou AA. Shen et al (2012), em sua meta-análise sobre a associação entre polimorfismos no gene ATM e o risco de câncer, encontrou que o polimorfismo rs664143 está associado com a suscetibilidade ao câncer, e especialmente ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer de pulmão.

Ao contrário dos nossos resultados, no trabalho de Browning IV et al (2006) não foi encontrada associação entre o polimorfismo ATM IVS62+60G>A e o prognóstico, sobrevida livre de doença e agressividade da doença em pacientes com câncer de próstata.

O polimorfismo IVS62+60G>A está localizado no íntron 62 do gene ATM, em um sítio de ligação de proteínas (KIM et al, 2006). A alteração de bases G para A pode modificar o sítio de ligação das proteínas responsáveis pelo splicing e consequentemente, podem levar a um splicing impreciso (KIM et al, 2006). Dessa forma, o padrão de splicing dos éxons 61 e 62 adjacentes a esse polimorfismo pode estar modificado, alterando os níveis dos seus transcritos e, consequentemente, da proteína ATM.

Estudos indicam que a perda de função e/ou a expressão aberrante da proteína ATM pode ser a chave para os efeitos colaterais induzidos pela radiação, incluindo pneumonia, fibrose subcutânea e radiosensibilidade (ZHANG et al, 2010). Também é conhecido que alguns polimorfismos podem induzir a baixa expressão do gene ATM ou levar à desestabilização da proteína ATM e, consequentemente, aumentar a radiosensibilidade, estando localizados nas regiões promotoras, codificadoras ou intrônicas (KIM et al, 2006).

A proteína ATM é uma serina-treonina quinase que fosforila muitos substratos importantes envolvidos no reparo de danos induzidos por radiação na dupla fita de DNA, controle dos pontos de checagem do ciclo celular, respostas ao estresse oxidativo e radiosensibilidade (BAKKENIST; KASTAN, 2003). Logo, associações entre as variantes do gene ATM e o risco de desenvolvimento de efeitos de radiosensibilidade são biologicamente plausíveis, já que esse gene atua pontualmente respondendo a este tipo de agressão celular (ZHANG et al, 2010).

Em 2010, Fang et al propuseram, a partir dos resultados obtidos, um limiar de 55% de expressão da proteína ATM como alto risco de radiosensibilidade clínica em pacientes com câncer de mama. Podemos supor, então, que pacientes com menor expressão da proteína ATM apresentam os maiores efeitos adversos da radioterapia. Isso ocorre pois esse gene é responsável por detectar os danos provocados no DNA pela radiação. Logo, pacientes com menor expressão de ATM apresentarão um sistema de reparo de DNA menos eficiente, que não sinaliza as células danificadas para a apoptose e, conseqüentemente, permite que elas continuem a se multiplicar.

Podemos supor, de acordo com os nossos resultados e com as informações obtidas a partir da literatura, que a presença do alelo A altera o padrão de splicing, e conseqüentemente modifica a expressão da proteína ATM, reduzindo seus níveis. Dessa forma, os baixos níveis da proteína ATM podem levar à um acúmulo de células danificadas, aumentando o risco de ocorrência da recidiva local.

As frequências genótípicas do polimorfismo TP53 Arg72Pro (rs1042522) encontradas nesse estudo (45% Arg/Arg, 41,8% Arg/Pro e 12,9% Pro/Pro) são semelhantes às encontradas no estudo de Li et al (2010) realizado nos EUA, em que 51,7% dos indivíduos eram Arg/Arg, 38,5% Arg/Pro e 9,8% Pro/Pro. Diferentemente, Yang et al (2011) em um estudo na China, encontrou uma frequência de 30,4% de indivíduos Arg/Arg, 49,6% Arg/Pro e 21% de indivíduos homocigotos Pro/Pro.

Em relação às análises prognósticas, o polimorfismo rs1042522 apresentou relação estatisticamente significativa com a ocorrência de óbito em pacientes com tumores não irradiados de cavidade oral e orofaringe. A análise multivariada mostrou que a

homozigose Pro72 aumenta em mais de duas vezes o risco de morte, em relação aos casos não homozigotos para Pro72.

Na mesma linha dos nossos resultados, Li et al (2010) mostrou que o alelo Pro72 está significativamente associado com a redução da sobrevivência livre de doença relacionado com um segundo tumor primário em CECP, em relação a pacientes que possuíam o alelo Arg72. Da mesma forma, Kuroda et al (2007) descobriu que pacientes homozigotos para o alelo Pro72 tem uma pior sobrevida pós-tratamento do que pacientes que possuem ao menos um alelo Arg72. O alelo Pro72 também aumenta o risco de câncer oral e piora o prognóstico. A homozigose Pro72 também foi associada como um fator de risco para o desenvolvimento de câncer mais agressivo e invasivo em câncer colorretal, bexiga e pulmão (LUNG et al, 2004; CHEN et al, 2000; DAHABREH et al, 2013; LIN et al, 2013). Em relação ao tratamento radioterápico, Alsbeih et al, 2007 também não encontrou relação significativa entre esse polimorfismo e a radiosensibilidade em fibroblastos cultivados *in vitro*.

Contrariamente aos nossos resultados, Bonafé et al (2003) encontrou que o alelo Arg72 reduz a sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com câncer de mama, em relação ao alelo Pro72. Em relação à associação com a radioterapia, Tan et al (2006) registrou uma diminuição do risco de toxicidade aguda de pele depois da radioterapia em pacientes com câncer de mama que portavam o alelo 72Pro. Em câncer de pulmão, Yang et al (2011) também mostrou que o genótipo Arg/Arg está relacionado a um aumento no risco de desenvolvimento de pneumonia induzida por radiação quando comparado com o genótipo Pro/Pro. Essa tendência também foi observada em câncer de bexiga e em CECP (SOULITZIS et al, 2002; BERGAMASCHI et al, 2003).

A proteína p53 é fosforilada e ativada pela proteína ATM, levando à ativação transcricional, repressão de múltiplos genes, parada do ciclo celular para permitir o reparo do DNA e apoptose (BANIN et al, 1998; EL-DEIRY, 2003; VOGELSTEIN; LANE; LEVINE et al, 2000). A regulação desses processos pela p53 controla a resposta celular aos danos induzidos por radiação (YANG et al, 2011). Em adição, a p53 também regula diretamente a expressão e ativação de algumas citocinas, como a interleucina-6 e o TGF $\beta$ , que estão envolvidas em processos inflamatórios

induzidos pela radiação (YANG et al, 2011). Portanto, a função aberrante da p53 é esperada como sendo um dos eventos essenciais nas patologias induzidas por radiação.

O polimorfismo rs1042522, presente no éxon 4 do gene TP53, é caracterizado pela mudança de G>C no códon 72, que resulta na substituição de aminoácidos Arg>Pro. Esse códon 72 está localizado dentro de uma região rica em prolina, essencial para a apoptose dependente de p53 (SCHNEIDER-STOCK et al, 2004), e uma substituição variante de aminoácidos pode afetar a estrutura do domínio de ligação SH3 (ALSBEIH et al, 2007).

Com relação a função da p53 modificada pelo presente polimorfismo, demonstrou-se que o genótipo Arg/Arg induz a apoptose com mais rapidez e suprime a transformação mais eficientemente que o genótipo Pro/Pro (BERGAMASCHI et al, 2006). Entretanto, o genótipo Pro/Pro possui uma capacidade significativamente alta de parada do ciclo celular e de reparo de DNA do que o genótipo Arg/Arg (PIM; BANKS, 2004; SIDDIQUE; SABAPATHY, 2006).

Dessa forma, supomos que os resultados obtidos no presente estudo ocorreram pois a variante Pro72 leve à produção de uma proteína menos eficiente no encaminhamento das células para a apoptose, levando a um acúmulo de células cancerígenas e conseqüentemente diminuindo a sobrevida desses pacientes e tendo com resultado final a ocorrência mais frequente de óbito.

A família de proteínas de membrana mitocondrial BCL2 desempenha um papel central no controle das vias apoptóticas, na regulação dos processos de morte celular e nos mecanismos de sobrevivência celular através da alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial e do controle da liberação do citocromo c (BEVERLY, 2012). Essa família contém proteínas antiapoptóticas, como BCL2 e BCL-XL, e proteínas pró-apoptóticas, como BAX ou BAK, que atuam em tecidos normais e nas células cancerosas (HIRATA et al, 2009).

O gene BCL2, localizado no cromossomo 18q21.3, consiste de três éxons e dois promotores (P1 e P2). O polimorfismo BCL2 -938C>A (rs2279115) está localizado no promotor P2, cuja ação inibe o promotor P1 do gene BCL2 (PARK et al, 2004). O alelo C, em comparação com o alelo A, aumenta significativamente a atividade de

P2, inibindo o promotor P1 e, conseqüentemente, diminuindo a expressão de BCL2 e a ligação de proteínas nucleares (NÜCKEL et al, 2007).

O polimorfismo BCL2 -938C>A (rs2279115) no presente estudo apresentou uma frequência de 34,7% de indivíduos homozigotos CC, 42,1% de indivíduos CA e 22,5% de indivíduos AA. No estudo de pacientes alemães com CE de orofaringe, Lehnerdt et al (2009) também encontrou os heterozigotos CA como mais frequentes (44,3%), mas os homozigotos apresentaram frequências próximas (28,6% CC e 27,1% AA). As proporções entre os homozigotos alteram-se em um estudo com indivíduos alemães com câncer de mama, em que o homozigoto AA foi mais frequente do que o CC (27,7% AA e 21,2% CC), enquanto o heterozigoto CA continua sendo mais frequente com 51,1% (BACHMANN et al, 2007).

O polimorfismo rs2279115 apresentou significância estatística nas análises das sobrevidas doença específica em pacientes com tumores irradiados de cavidade oral+orofaringe e também de laringe. Na análise de sobrevida dos casos irradiados de cavidade oral e orofaringe, a ausência do alelo A aumenta em 2 vezes o risco de óbito precoce pelo câncer, quando comparada com a presença de pelo menos um alelo A. Já na análise de sobrevida em tumores irradiados de laringe, a presença do alelo A diminui em aproximadamente 3 vezes a precocidade da morte em decorrência da doença, em relação à ausência desse alelo.

Dessa forma, independentemente do sítio anatômico analisado, pacientes portadores da homozigose -938CC morreram mais rapidamente do que os indivíduos que não portavam essa homozigose quando tratados com radioterapia.

Trabalhos que associem o prognóstico com a modalidade terapêutica e determinado polimorfismo são escassos na literatura. Assim, aqui tentamos comparar resultados da literatura que possuam alguma semelhança em relação ao prognóstico ou à resposta radioterápica.

Resultados semelhantes aos nossos, associando o polimorfismo rs2279115 ao prognóstico, foram encontrados no estudo de Lehnerdt et al (2009), que analisou pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe. Nesse trabalho, o alelo -938CC foi associado com um aumento de risco de ocorrência de recidiva e de óbito em relação aos pacientes portadores do alelo -938A. Esses resultados também

foram encontrados em um estudo anterior (BACHMANN et al, 2007), em que a análise de sobrevida mostrou uma associação significativa do genótipo AA com o aumento da sobrevida em pacientes com câncer de mama, além de mostrar que o alelo A aumenta a expressão da proteína BCL2. Essa tendência também foi demonstrada em câncer de rim (HIRATA et al, 2009).

No trabalho de Searle et al (2012) não foi encontrada associação entre o polimorfismo BCL2 -938C>A e a sobrevida dos pacientes com câncer de mama, no entanto, foi encontrada uma associação entre a alta expressão de BCL2 com o aumento da sobrevida. Também não foi encontrada associação entre a sobrevida em pacientes com câncer de pulmão e o polimorfismo rs2279115 (XU et al, 2013).

Ao contrário dos nossos resultados, Nückel et al (2007) mostrou que a presença do homozigoto -938AA está relacionado a uma maior agressividade da doença e a uma pior sobrevida em pacientes com leucemia linfocítica crônica. Da mesma forma, Bachmann et al (2011), analisando pacientes com câncer de próstata, mostrou que o genótipo -938AA está relacionado a uma pior sobrevida livre de doença e a uma pior sobrevida global. Essa tendência também foi observada em câncer de pulmão (LEE et al, 2013).

Era esperado que, por ser uma proteína antiapoptótica, a alta expressão de BCL2 estivesse relacionada com uma pior sobrevida dos pacientes submetidos à radioterapia, já que teoricamente as células danificadas não seriam facilmente encaminhadas para a apoptose (LEE et al, 2013). Porém, no presente estudo foi encontrado que pacientes portadores de ao menos um alelo -938A, cuja atuação aumenta os níveis da proteína BCL2, apresentaram uma melhor sobrevida doença específica. Esse resultado também é encontrado em tumores de mama, orofaringe e rim. Porém, em câncer de próstata e na leucemia linfocítica crônica, os resultados são inversos.

Essa aparente contradição pode ser explicada pela atuação ambígua do gene BCL2 na tumorigênese, já que seu efeito primário é oncogênico, enquanto o efeito tardio é supressor tumoral (BACHMANN et al, 2011). Isso pode explicar porque o prognóstico dos pacientes em relação à expressão da proteína BCL2, que pode reduzir a apoptose e a proliferação, varia de acordo com o tipo tumoral.



Também podemos supor que, por esse gene pertencer a uma família com atuações em diversas vias de homeostase celular, a proteína BCL2 pode atuar em interação com várias outras proteínas, tendo como resultado final o aumento ou diminuição da apoptose. Dessa forma, podemos também supor com base nos nossos resultados e com a bibliografia pesquisada, que para o carcinoma epidermóide de cavidade oral, orofaringe e laringe, a alta expressão do gene BCL2 está relacionada com uma melhor eliminação das células tumorais danificadas pelo tratamento radioterápico, e conseqüentemente, com uma melhor sobrevida para esses pacientes.

O gene TGF $\beta$  é um fator de crescimento multifuncional que regula a proliferação celular, diferenciação tecidual, desenvolvimento embrionário, angiogênese, inflamação, cicatrização e fibrose (ZOU et al, 2014; BLOBE; SCHIEMANN; LODISH, 2000). A proteína TGF $\beta$ , codificada pelo gene citado acima, é uma citocina produzida primariamente pelas células endoteliais, hematopoiéticas e de tecidos conectivos, mas virtualmente, todas as células humanas possuem receptores para essa proteína (PETERS et al, 2008; BLOBE; SCHIEMANN; LODISH, 2000).

Além disso, ela tem sido apresentada como um mediador chave da fibrogênese em várias condições patológicas, incluindo reações teciduais após o tratamento radioterápico (BLOBE; SCHIEMANN; LODISH, 2000; FINKELSTEIN et al, 1994). A radiação ionizante ativa indiretamente a proteína TGF $\beta$  pelas células endoteliais danificadas e pela alteração da homeostase das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (BENTZEN et al, 2006).

Em uma situação de exposição à radiação, os tecidos entram em um ciclo envolvendo hipóxia, angiogênese, morte celular, proliferação e infiltração de macrófagos (DE RUYCK et al, 2006). Em última análise, esta espiral leva à substituição total do tecido por colágeno, deixando alguns elementos celulares (ANSCHER et al, 2005).

Em células irradiadas, TGF $\beta$  é uma proteína chave associada com proliferação e diferenciação, além de recrutar células inflamatórias e ativar fibroblastos para produção da matriz extracelular e deposição de proteínas na matriz extracelular (FINKELSTEIN et al, 1994; PETERS et al, 2008). Disfunções dessa proteína tem

sido observadas em fibrose de rim, fígado e pulmão, além de hipertensão (BLOBE; SCHIEMANN; LODISH, 2000).

As frequências genótípicas apresentadas neste estudo pelo polimorfismo TGF $\beta$  Pro10Leu (rs1800470) foram de 18,3% de homozigotos Pro/Pro, 54,3% de heterozigotos e 25,4% de homozigotos Leu/Leu. Frequência semelhante foi encontrada no estudo de Peters et al (2008), em que 16% dos indivíduos eram Pro/Pro, 50% eram heterozigotos e 34% eram homozigotos Leu/Leu. No estudo de Alsbeih et al (2007), entretanto, as frequências encontradas foram diferentes, já que 54% dos indivíduos eram Leu/Leu e os homozigotos Pro/Pro e heterozigotos apresentaram a mesma frequência (23%).

Já as frequências genótípicas apresentadas pelo polimorfismo TGF $\beta$  -509C>T (rs1800469) foram de 40,8% de homozigotos CC, 44,4% de heterozigotos e 13,8% de homozigotos TT. Em um estudo realizado na Itália, em pacientes com câncer de mama (TERRAZZINO et al, 2012), as frequências encontradas foram semelhantes às apresentadas aqui (43,3% de homozigotos CC, 46,2% de heterozigotos e 10,1% de homozigotos TT). Frequências diferentes foram encontradas no estudo de Zou et al (2014), em pacientes chineses com câncer de nasofaringe, em que 17,4% dos indivíduos eram homozigotos CC, 49,5% eram heterozigotos e 33% eram pacientes homozigotos TT.

O polimorfismo rs1800470 foi associado significativamente com a recidiva local, óbito e as sobrevidas, livre de doença local e doença específica, nos casos de CE de laringe submetidos ao tratamento radioterápico.

A análise multivariada mostrou que a presença de pelo menos um alelo Leu10 diminui o risco de recidiva local em 10 vezes em relação à presença da homozigose Pro10 nos tumores de laringe irradiados. Para a análise de óbito, a presença do alelo Leu10 foi associado com uma diminuição em aproximadamente 5 vezes o risco de morte, em relação à ausência do alelo Leu10. Nas análises de sobrevida, foi encontrado que o alelo Leu10 diminui em mais de 7 vezes o risco de precocidade da recidiva local e diminui em 5 vezes o risco de precocidade de morte em relação à ausência desse alelo. Dessa forma, podemos dizer que o alelo Leu10 foi associado como um fator protetor em todas as análises e, conseqüentemente, o alelo Pro10

pode ser considerado um fator independente de pior prognóstico em laringe irradiada.

Provavelmente, a presença do alelo Pro10 torna a proteína TGF $\beta$  menos eficiente no controle da proliferação, não ocorrendo o adequado controle local da doença, e conseqüentemente ocorre a recidiva local. Com a recidiva, os pacientes ficam mais sensibilizados e podem ir a óbito, mais frequente e rapidamente. Todos os resultados significativos ocorreram em tumores de laringe. Isso talvez possa ser explicado pela constituição anatômica da laringe, formada principalmente por cartilagem, ligamentos e músculos. Esses tecidos possivelmente são mais suscetíveis à atuação da proteína TGF $\beta$  do que a cavidade oral e orofaringe, que possuem constituições anatômicas e características fisiobiológicas diferentes.

Já o polimorfismo rs1800469 apresentou significância estatística nas análises de óbito em tumores não irradiados de laringe e na sobrevida doença específica em tumores irradiados de oral+orofaringe.

Na análise de óbito em tumores não irradiados de laringe, a presença de ao menos um alelo T foi associado com um aumento do risco de óbito em 9 vezes, em relação à ausência deste mesmo alelo. Como não houve significância nas análises de recidiva geral e local, podemos supor que esses óbitos ocorreram por outros motivos que não estejam associados diretamente com a doença. Como explicado na introdução, o gene TGF $\beta$  atua em várias vias moleculares, como as de proliferação, inflamação e fibrogênese, e provavelmente o alelo -509T está influenciando nessa atuação através de alterações na expressão proteica.

Na análise da sobrevida doença específica nos casos de tumores irradiados de cavidade oral e orofaringe, o alelo T também foi associado como um fator de pior prognóstico radioterápico, sendo que a presença desse alelo aumenta em mais de 2 vezes a precocidade da morte pelo câncer, em relação à ausência dele. Nesse caso, possivelmente a presença do alelo -509T induz efeitos colaterais tardios induzidos pela radiação nos pacientes, que fazem com que eles morram mais rapidamente, mesmo que não apresentem recidiva.

Dessa forma, no presente estudo, os alelos TGF $\beta$  Pro10 e TGF $\beta$  -509T foram considerados como fatores de pior prognóstico radioterápico em CE de cavidade oral, orofaringe e laringe, relacionados com a radiosensibilidade tumoral.

São poucos os trabalhos que investigaram a relação destes polimorfismos com a resposta prognóstica do tratamento radioterápico no CECP. Porém, nos trabalhos em que foram analisados esses polimorfismos, a relação dos alelos citados acima como marcadores de risco foi constante.

Diversos estudos encontraram associações entre os polimorfismos do gene TGF $\beta$  e efeitos adversos relacionados à radioterapia. Raabe et al (2012) e Giotopoulos et al (2007) descobriram que o genótipo -509TT aumenta o risco de eritema e de fibrose em pacientes com câncer de mama tratados com radioterapia. De Ruyck et al (2006) mostrou que os homozigotos 10Pro e -509TT estão associados com um aumento do risco de desenvolvimento de reações severas ou moderadas em pacientes com tumores ginecológicos submetidos à radioterapia. Reações adversas relacionadas com os genótipos -509T/T e Pro10 também foram encontrados em câncer de mama e de próstata em pacientes submetidos à radioterapia (ANDREASSEN et al, 2005; PETERS et al, 2008).

Em alguns estudos, não foram observadas associações entre os polimorfismos e a radiosensibilidade (DAMARAJU et al, 2006; BARNETT et al, 2012). Zou et al (2014) não encontrou associação entre o polimorfismo TGF $\beta$  -509C>T e a xerostomia tardia induzida por radiação em pacientes com câncer de nasofaringe. E em câncer de mama também não foi encontrada associação com a radiosensibilidade (REUTHER et al, 2012).

Já no estudo de Alsbeih et al (2007), contrariamente aos nossos resultados, foi encontrado que o alelo Leu10 é um fator de risco que aumenta a radiosensibilidade. Porém, esse estudo analisou fibroblastos de doadores normais cultivados em placa e submetidos à radioterapia.

Muitos estudos mostram uma associação entre o alto nível plasmático da proteína TGF $\beta$ , antes e depois da radioterapia em pacientes com câncer, e o desenvolvimento de fibrose severa induzida pela radiação, da mesma forma que

polimorfismos funcionais do gene TGF $\beta$  na radiosensibilidade clínica (LEBRUN, 2012; KUBICZKOVA et al, 2012; KELSEY et al, 2012).

Níveis plasmáticos elevados de TGF $\beta$  têm sido relacionados à fibrose pulmonar induzida por radiação em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (DE JAEGER et al, 2004). Da mesma forma, Feltl et al (2005), analisando pacientes com câncer de cabeça e pescoço em estágio avançado submetidos à radioterapia, descobriu que altos níveis plasmáticos de TGF $\beta$  estavam relacionados com morbidade.

Os genótipos variantes homozigotos dos dois polimorfismos do TGF $\beta$  estudados aqui também foram associados com um aumento dos níveis séricos da proteína TGF $\beta$  (GRAINGER et al, 1999). O efeito na radiosensibilidade e nos níveis séricos da proteína TGF $\beta$  relatados na literatura podem ser causados pelo polimorfismo Leu10Pro através da influência sobre o tráfico intracelular ou eficiência na exportação (retículo endoplasmático) do pró-peptídeo e pelo polimorfismo -509C>T através de seu efeito sobre a produção dessa pró-proteína (DE RUYCK et al, 2006).

Até o momento, são poucos os estudos que avaliaram a relação entre a genética e a resposta radioterápica no prognóstico de pacientes com CECP. Portanto, estudos como esta temática são importantes, visto que podem auxiliar no direcionamento de um protocolo terapêutico individualizado, em que sejam respeitadas as características genéticas de cada paciente, minimizando os efeitos adversos da radioterapia.

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, as análises genóticas dos polimorfismos estudados foram realizadas utilizando a técnica de PCR-RFLP com o intuito de determinar possíveis correlações dos mesmos com o prognóstico de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral, orofaringe e laringe, bem como analisar essas respostas segundo o tratamento radioterápico. Diante dos resultados encontrados, pode-se concluir que:

- Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o polimorfismo ATM Asp1853Asn (rs1801516) e o prognóstico de pacientes com CECP;
- Em pacientes com CE oral e de orofaringe submetidos à radioterapia, o genótipo ATM IVS62+60AA aumenta o risco de ocorrência de recidiva local e os alelos BCL2 -938C e TGF $\beta$  -509T aumentam a precocidade do óbito;
- A homozigose TP53 Pro72 aumenta o risco de óbito em pacientes com CE oral e de orofaringe não submetidos à radioterapia;
- Em pacientes com CE de laringe que realizaram o tratamento radioterápico, o alelo TGF $\beta$  Pro10 foi significativamente associado com o risco de ocorrência de recidiva local e de óbito, além de influenciarem na precocidade desses eventos. O alelo BCL2 -938C também foi relacionado com a precocidade de ocorrência de óbito;
- O alelo TGF $\beta$  -509T foi correlacionado com o aumento do risco de óbito em pacientes com CE de laringe que não foram tratados com a radioterapia;

- Os polimorfismos ATM IVS62+60G>A, BCL2 -938C>A, TGF $\beta$  Pro10Leu e TGF $\beta$  -509C>T foram significativamente associados com a radiosensibilidade tumoral nos pacientes com CECP, piorando o prognóstico;
- Os polimorfismos influenciam respostas prognósticas induzidas pela radioterapia de diferentes formas entre os sítios da cavidade oral, orofaringe e laringe. Os polimorfismos ATM IVS62+60G>A e TP53 Arg72Pro foram relacionados à resposta prognóstica somente em CE oral e de orofaringe, enquanto o polimorfismo TGF $\beta$  Pro10Leu somente em CE de laringe.

Assim, é possível que esses polimorfismos sejam importantes marcadores genéticos de radiosensibilidade tumoral, sendo candidatos a comporem um perfil genético preditivo de prognóstico em resposta à radioterapia.

## 7 REFERÊNCIAS

ADRIEN, J. et al. Why are head and neck squamous cell carcinoma diagnosed so late? Influence of health care disparities and socio-economic factors. **Oral Oncol**, 2013.

ADELSTEIN, D. J.; TAN, E. H.; LAVERTU, P. Treatment of head and neck cancer: The role of chemotherapy. **Crit Rev Oncol Hematol.**, v. 24, p. 97-116, 1996.

ANG, K. K. et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. **N Engl J Med**, v. 363, n. 1, p. 24-35, 2010.

ANSCHER, M. S. et al. Recent progress in defining mechanisms and potential targets for prevention of normal tissue injury after radiation therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 62, p. 255-259, 2005.

ALSBEIH, G. et al. Radiosensitivity Of Human Fibroblasts Is Associated With Amino Acid Substitution Variants In Susceptible Genes And Correlates With The Number Of Risk Alleles. **Int. J. Radia Oncol Biol. Phys**, v. 68, n. 1, p. 229–235, 2007.

ANDREASSEN, C. N. et al. TGFB1 polymorphisms are associated with risk of late normal tissue complications in the breast after radiotherapy for early breast cancer. **Radio Oncol**, n. 75, p. 18–21, 2005.

BACHMANN, H. S. et al TheAA Genotype of the Regulatory BCL2 Promoter Polymorphism (-938C>A) Is Associated with a Favorable Outcome in Lymph Node - Negative Invasive Breast Cancer Patients. **Clin Cancer Res**, v. 13, p. 5790-97, 2007.

BACHMANN, H. S. et al. Regulatory BCL2 promoter polymorphism (2938C>A) is associated with adverse outcome in patients with prostate carcinoma. **Int. J. Cancer**, v. 129, p. 2390–99, 2011.

BAKKENIST, C. J.; KASTAN, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. **Nature**, v. 421, p. 409-506, 2003.



BANIN, S. et al. Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA. **Science**, v. 281, p. 1674, 1998.

BARNETT, G. C. et al. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. **Nat Rev Cancer**, v. 9, p. 134-142, 2009.

BARNETT, G. C. et al. Individual patient data meta-analysis shows no association between the SNP rs1800469 in TGFB and late radiotherapy toxicity. **Radiother Oncol**, v. 105, p. 289–295, 2012.

BEGG, A.C.; STERWART, F. A.; VENS, C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. **Nat Rev Cancer**, v. 11, p. 239-253, 2011.

BENTZEN, S. M. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. **Nat Rev Cancer**, v. 6, p. 702-713, 2006.

BERÁNEK, M. et al. Analysis of D1853N ATM polymorphism in radiosensitivity patients with cervical carcinoma. **Acta Medica** (Hradec Králové), v. 54, n. 3, p. 111-116, 2011.

BERGAMASCHI, D. et al. iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72–polymorphic p53. **Nat Genetics**, v. 38, n. 10, p. 1133-41, 2006.

BEVERLY, L. J. Regulation of Anti-Apoptotic BCL2-Proteins by Non-Canonical Interactions: The Next Step Forward or Two Steps Back? **J Cell Bio**, v. 113, p. 3–12, 2012.

BLOBE, G. C.; SCHIEMANN, W. P.; LODISH, H. F. Role of Transforming Growth Factor B in Humam Disease. **N Engl J Med**, p. 1350-1358, 2000.

BONAFÉ, M. et al. Retention of the p53 Codon 72 Arginine Allele Is Associated with a Reduction of Disease-Free and Overall Survival in Arginine/Proline Heterozygous Breast Cancer Patients. **Clin Cancer Res**, v. 9, p. 4860-64, 2003.

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**, 2012.

BROCKSTEIN, B. et al. Patterns of failure, prognostic factors and survival in locoregionally advanced head and neck cancer treated with concomitant chemoradiotherapy: a 9-year, 337-patient, multi-institutional experience. **Ann Oncol**, v. 15, p. 1179–1186, 2004.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, p. 177-186, 1999.

BROWNING IV, R. E. L. et al. ATM Polymorphism Ivs62+60G>A Is Not Associated With Disease Aggressiveness In Prostate Cancer. **Urology**, v. 67, p. 1320–1323, 2006.

CHEN, W. C. et al. Distributions of p53 codon 73 polymorphism in bladder cancer – proline form is prominent in invasive tumor. **Urol Res**, v. 28, p. 293-296, 2000.

CHOI, S.; MYERS, J. N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. **J Dent Res**, v. 87, n. 2, p. 191, 2008.

COLOMBO, J.; RAHAL, P. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. **Rev Bras Cancerologia**, v. 55, n. 2, p. 165-174, 2009.

COTTON, S. A. et al. Role of TGF-B1 in renal parenchymal scarring following childhood urinary tract infection. **Kidney Internat**, v. 61, p. 61–67, 2002.

CREMONA, C. A.; BEHRENS, A. ATM signalling and câncer. **Oncogene**, p. 1-10, 2013.

CUFÍ, S. et al. Metformin against TGFb-induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT): From cancer stem cells to aging-associated fibrosis. **Cell Cycle**, v. 9, n. 22, p. 4461-4468, 2010.

DAHABREH, I. J. et al. Genotype Misclassification in Genetic Association Studies of the rs1042522 TP53 (Arg72Pro) Polymorphism: A Systematic Review of Studies of Breast, Lung, Colorectal, Ovarian, and Endometrial Cancer. **Am J Epidemiol**, v. 177, n. 12, p. 1317-25, 2013.

DAMARAJU, S. et al. Association of DNA Repair and Steroid Metabolism Gene Polymorphisms with Clinical Late Toxicity in Patients Treated with Conformal Radiotherapy for Prostate Cancer. **Clin Cancer Res**, v. 12, p. 2545-54, 2006.

DE JAEGER, K. et al. Significance Of Plasma Transforming Growth Factor-Levels In Radiotherapy For Non–Small-Cell Lung Cancer. **Int. J. Rad Oncol Biol. Phys**, v. 58, n. 5, p. 1378–87, 2004.

DELANEY, G. et al. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidencebased clinical guidelines. **Cancer**, v. 104, p. 1129-1137, 2005.

DE RUYCK, K. et al. TgfB1 polymorphisms and late clinical radiosensitivity In patients treated for gynecologic tumors. **Int. J. Rad Onc Bio Phys**, v. 65, n. 4, p. 1240–1248, 2006.

DE RUYCK, Kim. **Radiogenomics in gynecological cancer patients**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina e Ciências da Saúde, Universidade de Gante, Gante, 2007.

DERYNCK, R.; AKHURST, R. J.; BALMAIN, A. TGF- $\beta$  signaling in tumor suppression and cancer progression, **Nat Genetics**, v. 29, n. 2, p. 117–129, 2001.

DESCHLER, D.G.; DAY, T. Pocket Guide to Neck Dissection and Classification and TNM Staging of Head and Neck Cancer. **Am Ac Otolaryngol-Head and Neck Surgery Foundation**, 2008.

DONG, L. M. et al. Genetic susceptibility to cancer: the role of polymorphisms in candidate genes. **JAMA**, v. 299, p. 2423-2436, 2008.

EDSTROM, S. et al. Overexpression of p53-related proteins predicts rapid growth rate of head and neck cancer. **Laryngoscope**, v. 111, n. 1, p. 124-30, 2001.

EL-DEIRY, W. S. The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. **Oncogene**, v. 22, p. 7486–7495, 2003.

ELLIOTT, R. L.; BLOBE, G. C. Role of Transforming Growth Factor Beta in Human Cancer. **J Clin Oncol**, v. 23, p. 2078-2093, 2005.

FACHAL, L. et al. Association of a XRCC3 polymorphism and rectum mean dose with the risk of acute radio-induced gastrointestinal toxicity in prostate cancer patients. **Radiother Oncol**, v. 105, p. 321–328, 2012.

FANG, Z. et al. Low levels of ATM in breast cancer patients with clinical radiosensitivity. **Gen Integrity**, v. 1, n. 9, p. 1-12, 2010.

FELTL, D. Post-treatment plasma transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1) level predicts for late morbidity in patients with advanced head and neck cancer. **Neoplasma**, v. 52, n. 5, p. 393-397, 2005.

FINDELSTEIN, J. N. et al. Early alterations in extracellular matrix and transforming Growth factor  $\beta$ ? Gene expression in mouse lung indicative of Late radiation fibrosis. **Int. J. Rad Oncol Bio Phys**, v. 28, n. 3, p. 621-631, 1994.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144-149, 2008.

GASCO, M.; CROOK, T. The p53 network in head and neck cancer. **Oral Oncol**, v. 39, n. 3, p. 222-31, 2003.

GIOTOPOULOS, G. et al. The late radiotherapy normal tissue injury phenotypes of telangiectasia, fibrosis and atrophy in breast cancer patients have distinct genotype-dependent causes. **Brit J Cancer**, v. 96, p. 1001-1007, 2007.

GLEICH, L. L.; SALAMONE, F. N. Molecular genetics of head and neck cancer. **Cancer control**, v. 9, n. 5, p. 369-78, 2002.

GONZÁLEZ-HORMAZÁBAL, P. et al. Association of common ATM variants with familial breast cancer in a South American population. **BMC Cancer**, v. 8, p. 117, 2008.

GRAINGER, D. J. et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type b1. **Hum Mol Gen**, v. 8, n. 1, p. 93-97, 1999.

HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, p. 629-634, 1989.

HEROUI, A. D.; DANCIU, C. E.; POPESCU, C. R. Multiple Cancers of the Head and Neck. **Maedica – J Clin Med**, v. 8, n. 1, p. 80-85, 2013.

HIRATA, H. et al. Bcl2-938C/A Polymorphism Carries Increased Risk of

Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy. **J Urol**, v. 181, p. 1907-1912, 2009.

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

HU, Z. et al. Tagging Single Nucleotide Polymorphisms in Phosphoinositide-3-Kinase-Related Protein Kinase Genes Involved in DNA Damage "Checkpoints" and Lung Cancer Susceptibility. **Clin Cancer Res**, v. 14, p. 2887-2891, 2008.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2014.

KELLY, P. N.; STRASSER, A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. **Cell Death Dif**, n. 18, p. 1414–1424, 2011.

KELSEY, C. R. et al. A Polymorphism Within The Promoter Of The Tgfb1 Gene Is Associated With Radiation Sensitivity Using An Objective Radiologic Endpoint. **Int. J. Radia Oncol Biol. Phys**, v. 82, n. 2, p. e247–e255, 2012.

KIM, J. H. et al. Genetic polymorphisms of ataxia telangiectasia mutated affect lung cancer risk. **Hum Mol Genetics**, v. 15, n. 7, p. 1181-1186, 2006.

KIM, H. S. et al. Concordance of ATM (ataxia telangiectasia mutated) immunohistochemistry between biopsy or metastatic tumor samples and primary tumors in gastric cancer patients. **Pathobiology**, v. 80, p. 127–137, 2013.

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. 121-132, 2009.

KOMAR, A. A. Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. **Pharmacogenomics**, v. 8, p.1075-1080, 2007.

KUBICZKOVA, L. et al. TGF- $\beta$  – an excellent servant but a bad master. **J Transl Med**, v. 10, p. 24, 2012.

KURODA, Y. et al. Association between the TP53 codon72 polymorphism and oral cancer risk and prognosis. **Oral Oncol**, v. 43, n. 10, p.1043-1048, 2007.

LEBRUN, J. J. The Dual Role of TGF $\beta$  in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. **ISRN Mol Bio**, p. 8, 2012.

LEE, H. L. et al. DNA Damage Response-Related Proteins in Gastric Cancer: ATM, Chk2 and p53 Expression and Their Prognostic Value. **Pathobiology** v. 81, p. 25–35, 2014.

LEE, K. M. et al. Genetic Polymorphisms of Ataxia Telangiectasia Mutated and Breast Cancer Risk. **Cancer Epid Biomar Prev**, v. 14, n. 4, p. 821-825, 2005.

LEE, S. Y. et al. Polymorphisms in DNA repair and apoptosis-related genes and clinical outcomes of patients with non-small cell lung cancer treated with first-line paclitaxel-cisplatin chemotherapy. **Lung Cancer**, v. 82, p. 330–339, 2013.

LEHNERDT, G. F. et al. The regulatory BCL2 promoter polymorphism (2938C>A) is associated with relapse and survival of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Annals of Oncol**, v. 20, p. 1094–1099, 2009.

LI, F. et al. Association of p53 Codon 72 Polymorphism With Risk of Second Primary Malignancy in Patients With Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. **Cancer**, p. 2350-2359, 2010.

LIN, H. Y. et al Polymorphisms of TP53 are markers of bladder cancer vulnerability and prognosis. **Urol Oncol**, v. 31, p. 1231–1241, 2013.

LUNG, F. W. et al. p53 codon 72 polymorphism and susceptibility malignancy of colorectal cancer in Taiwan. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 130, p. 728-732, 2004.

MANOLIO, T. A. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. **N Engl J Med**, v. 363, p. 166-176, 2010.

MARTA, G. N. et al. Intensity-modulated radiation therapy for head and neck cancer: Systematic review and meta-analysis. **Radiother Oncol**, 2013.

MICHAEL, D.; OREN, M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. **Semin. Cancer Biol**, v. 13, p. 49–58, 2003.

NÜCKEL, H. et al. Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the *BCL2* gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v, 109, p. 290-297, 2007.

PARK, B. L. et al. Identification of variants in cyclin D1 (*CCND1*) and B-Cell CLL/lymphoma 2 (*BCL2*). **J Hum Genet**, v.49, p. 449–454, 2004.

PARLIAMENT, M. B.; MURRAY, D. Single Nucleotide Polymorphisms of DNA Repair Genes as Predictors of Radioresponse. **Semin Rad Oncol**, v. 20, p. 232-240, 2010.

PEREZ-ORDEÑEZ, B.; BEAUCHEMIN, M.; JORDAN, R. C. K. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Pathol**, v. 59, p. 445-453, 2008.

PETERS, C. A. et al. *TGFB1* Single Nucleotide Polymorphisms are Associated With Adverse Quality of Life In Prostate Cancer Patients Treated With Radiotherapy. **Int. J. Rad Oncol Bio Phys**, v. 70, n. 3, p. 752–759, 2008.

PIM, D.; BANKS, L. *P53* Polymorphic Variants at Codon 72 Exert Different Effects On Cell Cycle Progression. **Int. J. Cancer**, v. 108, p. 196-199, 2004.

PLATZER, M. et al. Ataxia telangiectasia locus: sequence analysis of 184 kb of human genomic DNA containing the entire *ATM* gene. **Genome**, v. 7, p. 592–605, 1997.

RAABE, A. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the genes *ATM*, *GSTP1*, *SOD2*, *TGFB1*, *XPD* and *XRCC1* with risk of severe erythema after breast conserving radiotherapy. **Rad Oncol**, v. 7, n. 65, p. 1-9, 2012.

REED, J. C. *Bcl-2*-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. **Blood**, v. 111, p. 3322–3330, 2008.

REUTHER, S. et al. No Effect of the Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Promoter Polymorphism C-509T on *TGFB1* Gene Expression, Protein Secretion, or Cellular Radiosensitivity. **Int J Radia Oncol Biol Phys**, p. 1-6, 2012.

SCARFÒ, L.; GHIA, P. Reprogramming cell death: *BCL2* family inhibition in hematological malignancies. **Immun Lett**, v. 155, p. 36–39, 2013.

SCHNEIDER-STOCK, R. et al. Retention of the Arginine Allele in Codon 72 of the p53 Gene Correlates with Poor Apoptosis in Head and Neck Cancer. **Am J Pathol**, v. 164, n. 4, p. 1233-41, 2004.

SEARLE, C. J. et al. A BCL2 promoter polymorphism rs2279115 is not associated with BCL2 protein expression or patient survival in breast cancer patients. **SpringerPlus**, v. 1, n. 38, 2012.

SHEN, L. et al. Association between ATM polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. **Mol Biol Rep**, v. 39, p. 5719–5725, 2012.

SIDDIQUE, M.; SABAPATHY, K. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. **Oncogene**, v. 25, p. 3489–3500, 2006.

SOO, K. C. et al. Surgery and adjuvant radiotherapy vs cOncolurent Chemoradiotherapy in stage III/IV nonmetastatic squamous cell head and neck cancer: a randomised comparison. **Br J Cancer**, v. 93, n. 3, p. 279-286, 2005.

SOULITZIS, N. et al. p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. **Cancer Letters**, v. 179, p. 175–183, 2002.

STONEKING M. Single nucleotide polymorphisms. From the evolutionary past. **Nature**, v. 409, p. 821-822, 2001.

SUZUKI, K.; MATSUBARA, H. Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment. **J Biomed Biotech**, p. 7, 2011.

TAMIMI, R. M. et al. Common ataxia telangiectasia mutated haplotypes and risk of breast cancer: a nested case–control study. **Breast Cancer Res**, v. 6, p. 416-422, 2004.

TAN, X. L. et al. Association between TP53 and p21 genetic polymorphisms and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat**, v. 97, p. 255–262, 2006.

TERRAZZINO, S. et al. Common Variants of GSTP1, GSTA1, and TGFb1 are Associated With the Risk of Radiation-Induced Fibrosis in Breast Cancer Patients. **Int J Rad Oncol Bio Phys**, v. 83, n. 2, p. 504-511, 2012.



THOMPSON, L. H. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography. **Mut Research**, v. 751, p. 158-246, 2012.

TURESSON, I. et al. Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. **Int J Rad Oncol Bio Phys**. v. 36, p. 1065–1075, 1996.

VOGLER, M. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. **Cell Death Differ**, v.19, p. 67–74, 2012.

VOKES, E. E. et al. Head and neck cancer. **N Engl J Med**, v. 328, p. 184-194, 1993.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, p. 307-310, 2000.

VOUSDEN, K. H.; LANE, D.P. P53 in health and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, p. 275-83, 2007.

WEST, C. M.; BARNETT, G. C. Genetics and genomics of radiotherapy toxicity: towards prediction. **Gen Med**, v. 3, p. 52, 2011.

WJST, M. Target SNP selection in complex disease association studies. **BMC Bioinformatics**, v. 5, p. 92, 2004.

WORSHAM, M. J. et al. Molecular Characterization of Head and Neck Cancer: How Close to Personalized Targeted Therapy? **Mol Diagn Ther**, v. 16, n. 4, p. 209-222, 2012.

XU, P. et al. Genetic Variation in BCL2 39-UTR Was Associated with Lung Cancer Risk and Prognosis in Male Chinese Population. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1-8, 2013.

YANG, M. et al. Association of p53 and atm polymorphisms with risk of Radiation-induced pneumonitis in lung cancer patients treated With radiotherapy. **Int. J. Rad Oncol Bio Phys**, v. 79, n. 5, p. 1402–1407, 2011.

ZHANG, L. et al. ATM Polymorphisms are Associated With Risk of Radiation-Induced Pneumonitis. **Int. J. Rad Oncol Bio Phys**, v. 77, n. 5, p. 1360–1368, 2010.

ZHANG, B. et al. The expression and significance of MRP1, LRP, TOPOIIb, and BCL2 in tongue squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 41, p. 141-148, 2012.

ZOU, Y. et al. XRCC3 Polymorphisms are Associated with the Risk of Developing Radiation-Induced Late Xerostomia in Nasopharyngeal Carcinoma Patients Treated with Intensity Modulation Radiated Therapy. **Jpn J Clin Oncol**, 2014.

ZSCHENKER, O. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in ATM, GSTP1, SOD2, TGFB1, XPD and XRCC1 with clinical and cellular radiosensitivity. **Radio Oncol**, v. 97, p. 26-32, 2010.

**ANEXO**

Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis referente ao projeto “Identificação de marcadores tumorais para o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e avaliação de sua relevância clínica e estado nutricional”.



**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 na Pesquisa no dia 03/10/2003.

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

Atenciosamente,

  
**Dr. Jozias de Andrade Sobrinho**  
Coordenador