



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIANA BISARRO DOS REIS

**“Análise de variantes alélicas de genes de reparo e expressão
de genes relacionados com resistência à cisplatina em
carcinoma bucal”**

Londrina
2010

MARIANA BISARRO DOS REIS

**“Análise de variantes alélicas de genes de reparo e expressão
de genes relacionados com resistência à cisplatina em
carcinoma bucal”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ilce Mara de Syllos Cólus

Londrina
2010

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R375a Reis, Mariana Bisarro dos.

Análise de variantes alélicas de genes de reparo e expressão de genes relacionados com resistência à cisplatina em carcinoma bucal / Mariana Bisarro dos Reis. – Londrina, 2010.
93 f. : il.

Orientador: Ilce Mara de Syllos Cólus.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2010.

1. Boca – Câncer – Teses. 2. DNA – Reparo – Teses. 3. Genética – Expressão – Teses. 4. Polimorfismo (Genética) – Teses. I. Cólus, Ilce Mara de Syllos. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 616.31-006

MARIANA BISARRO DOS REIS

“Análise de variantes alélicas de genes de reparo e expressão de genes relacionados com resistência à cisplatina em carcinoma bucal”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ilce Mara de Syllos Cólus

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Silvia Helena Sofia
UEL – Londrina - PR

Prof^ª Dr^ª. Regina Célia Poli-Frederico
UNOPAR – Londrina - PR

Prof^ª Dr^ª Ilce Mara de Syllos Cólus
UEL – Londrina - PR

Londrina, 24 de fevereiro de 2010

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio e Silvana e a todos que de algum modo estiveram presente na minha vida durante esse período

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Ilce Mara de Syllos Cólus, minha orientadora e amiga, pela paciência, dedicação e exemplo de profissionalismo. Agradeço, pela confiança, mais uma vez depositada no meu trabalho, mas principalmete pelo apoio e disponibilidade fora do laboratório. Obrigada por tudo.

À Dr.^a Roberta, pela coorientação, pela amizade e conselhos, pela disposição e interesse, principalmente pela ajuda na última etapa da realização deste trabalho.

Aos membros da comissão examinadora Profa. Dra. Berenice Quinzani Jordão e Profa. Dra. Regina Célia Poli-Frederico, pela contribuição na finalização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório, Hellen, Maressa, Pri Matos, Pri Cardoso, Manu, Vick, Heloísa, André, Milene, Lara e Lucas, que se tornaram mais uma família, que sempre estiveram presente, pela ajuda no dia a dia, nas horas de sufoco e por escutarem minhas reclamações quando os experimentos davam errado. Obrigada pelas horas de apoio, pela companhia dentro e fora do laboratório, pelas risadas e pelos conselhos durante todos esses anos de convivência. Todos foram essenciais de alguma forma para que eu terminasse esse trabalho

Aos meus amigos, de perto ou longe, que me apoiaram de algum modo, me deram forças pra agüentar a saudade, que fizeram com que eu ganhasse várias famílias. Obrigada Flavinha, Marina, por sempre me ouvirem e muitas vezes serem meu conforto. Vocês são para a vida toda. À Juliana, que durante meu primeiro ano de mestrado foi minha companhia inseparável, por me “emprestar“ a sua família (Paulino, Edna e Jamile) que fez com que eu sentisse menos saudades de casa. Pessoas especiais que eu vou levar sempre comigo.

À Profª Drª Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro; Prof Dr, Iglénir João Cavalli e Profª Drª Silvia Regina Rogatto, por cederem parte das amostras utilizadas no trabalho

Aos técnicos Carlinhos, Dário e Melissa, pelo apoio nas tarefas diárias.

Ao Prof. Dr. Mario Sérgio Mantovani, por me permitir utilizar a estufa de CO₂ e o espectrofotômetro durante a realização dos experimentos e à Dani, pela força nesse último mês de correria.

À Sueli, secretária do Programa, pela paciência e ajuda durante esses anos.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Edgard Graner, por gentilmente nos ceder a linhagem celular usada neste trabalho.

A Profª Drª Eiko Nakagawa Itano por ceder o equipamento espectrofotômetro para utilização durante os experimentos.

Aos pacientes participantes, que mesmo em um momento difícil se dispuseram a ajudar, permitindo que este trabalho fosse realizado.

Aos professores do Curso de Pós Graduação e todos aqueles que de alguma forma me ensinaram alguma coisa dentro e fora da sala de aula.

Em especial.....aos meus pais, Antonio e Silvana, razão de eu sempre querer ser melhor, por me apoiarem incondicionalmente em qualquer situação, pela força para que pudesse continuar buscando os meus sonhos. Obrigada por serem meu

porto seguro em qualquer situação, sem vocês nada na minha vida seria possível. À minha irmã Gabriela e ao meu irmão Victor, que apesar da distância, estão sempre comigo. Aos meus avós, por sempre me acolherem tão bem quando eu volto pra casa, em especial meu avô Victório, meu exemplo de vida, que sempre me incentivou e que apesar da ausência eu sei que ele ficaria feliz com mais uma conquista minha...saudades.

À Deus, por me dar forças e colocar pessoas tão especiais no meu caminho.

“Os que se encantam com a prática sem a
ciência são como os timoneiros que
entram no navio sem timão nem bússola,
nunca tendo certeza do seu destino.”

[Leonardo da Vinci]

REIS, MARIANA BISARRO. **Análise de variantes alélicas de genes de reparo e expressão de genes relacionados com resistência à cisplatina em carcinoma bucal.** 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

Este trabalho objetivou investigar a associação entre a presença de variantes alélicas nos genes *XRCC1* e *XRCC3* e a suscetibilidade ao câncer de boca e correlacionar os resultados dos testes genéticos com parâmetros histopatológicos. Adicionalmente, implementar técnicas de análise de expressão gênica no laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL pela realização de experimentos com uma linhagem celular de carcinoma bucal tratada com cisplatina, avaliando genes de reparo do DNA (*XRCC1* e *XPA*) e de apoptose (*BAX*). A genotipagem das variantes genéticas foi realizada por PCR-RFLP em 150 pacientes com carcinoma bucal e 150 controles. Os SNPs investigados foram Arg194Trp e Arg399Gln no gene *XRCC1* e Thr241Met no gene *XRCC3*. Para a análise de expressão foi utilizada a linhagem SCC25 tratada com cisplatina na concentração de 0,01 μ M. O RNA total foi extraído e a quantificação relativa foi realizada por PCR em Tempo Real. A presença das variantes polimórficas de *XRCC1* códon 194 (OR 0,82, 95% IC 0,44-1,51), códon 399 (OR 0,94, 95% IC 0,59-1,50) e *XRCC3* (OR 0,72; 95% IC 0,45-1,16) não foram significativamente associadas com aumento de risco de câncer bucal isoladamente ou em combinações genotípicas. Os genótipos variantes também não se mostraram associados a parâmetros histopatológicos: diferenciação tumoral, invasão de linfonodos e tamanho do tumor. Na análise de expressão gênica, apenas o gene *XPA* mostrou expressão aumentada, indicando que pode conferir uma diminuição da sensibilidade à cisplatina da linhagem celular utilizada neste estudo. Entretanto, os dados de expressão são preliminares e serão confirmados com análises adicionais, que também incluirão novos genes. Nossos resultados sugerem ainda que variantes polimórficas nos genes *XRCC1* e *XRCC3* não constituem bons marcadores de suscetibilidade para carcinomas orais e também não estão associadas a estágios mais avançados do processo tumoral.

Palavras-chave: Carcinoma bucal. Polimorfismos. Genes de reparo. Genes de apoptose. Expressão gênica.

REIS, MARIANA BISARRO. **Analysis of allelic variants in repair genes and expression of genes associated with resistance to cisplatin in oral carcinoma.** 2010.84f. Dissertação (Master' degree in Molecular Biology and Genetics) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the association between the presence of allelic variants in *XRCC1* and *XRCC3* genes and susceptibility to oral cancer and to correlate the results of genetic tests with histopathological parameters. Additionally, implementing technical analysis of gene expression in the laboratory of Mutagênese e Oncogenética at UEL, conducting experiments with a cell line of oral carcinoma treated with cisplatin, evaluating the DNA repair genes (*ERCC1* and *XPA*) and apoptosis genes (*BAX*). Genotyping by PCR-RFLP was carried out on 150 patients with oral squamous cell carcinoma and 150 controls. SNPs investigated included Arg194Trp and Arg399Gln of the *XRCC1* gene and Thr241Met of the *XRCC3* gene. To analyze the expression was used the cell line SCC25 treated with cisplatin at a concentration of 0.01 μ M. Total RNA was extracted and relative quantification was performed by Real Time PCR. Presence of the polymorphic variant of *XRCC1* codon 194 (OR 0.82, 95% CI 0.44-1.51), codon 399 (OR 0.94, 95% CI 0.59-1.50) and *XRCC3* (OR 0.72; 95% CI 0.45-1.16) were not significantly associated with increased risk of oral cancer alone or in combination genotype. Genotypes variants also were not associated with histopathological parameters: tumor differentiation, invasion of lymph nodes and tumor size. In the analysis of gene expression, only the *XPA* gene showed increased expression, indicating that it may provide a decreased sensitivity to cisplatin of the cell line used in this study. However, the expression data are preliminary and will be confirmed with additional analysis, which also include new genes. Our results also suggest that polymorphic variants in genes *XRCC1* and *XRCC3* are not good markers of susceptibility to oral carcinomas and are also not associated with later stages of the tumor.

Keywords: oral cancer, polymorphisms, repair genes, apoptotic genes, genic expression

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

Table 1 – Summary on PCR-RFLP assay of polymorphisms in DNA repair genes	41
Table 2 – Characteristics of the study population	42
Table 3 – Frequencies of allelic variants isolated for <i>XRCC1</i> and <i>XRCC3</i> genes in patients with oral cancer and matched controls.....	43
Table 4 – Distribution of patients with presence or absence of risk genotypes in relation to the regional lymph nodes invasion, tumor differentiation and tumor size	44

ARTIGO B

Table 1 – List of primers used in the study.....	56
---	----

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Interação proteína-proteína mediada por <i>XRCCI</i> . NTD: Domínio N-terminal, NLS: sinal de localização nuclear.....	23
Figura 2 – Reparo por excisão de bases.....	25
Figura 3 – Reparo Homólogo de quebra de dupla fita.....	27
Figura 4 – Estrutura do quimioterápico cisplatina.....	29
Figura 5 – Formação e efeitos dos aductos de cisplatina.....	30
Figura 6 – Reparo por Excisão de Nucleotídeos Global do Genoma	33

ARTIGO B

Figure 1 – Mathematical model of relative expression ratio in Real Time PCR.....	56
Figure 2 – Cytotoxicity of SCC25 cells induced by cisplatin. After 24 h of treatment with the drug, MTT activity was read at 550 nm and values were expressed as viability percentage	57
Figure 3 – Results of relative quantification of repair genes <i>ERCCI</i> and <i>XPA</i> and pro-apoptotic gene <i>BAX</i>	58

LISTA DE ABREVIATURAS

5'Drp	5' desoxiribose-5-fosfato
AP	sítio apurínico/pirimidinico
APEX1	gene "APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1"
ATM	gene "Ataxia telangiectasia mutated
BAX	gene "Bcl2-associated X protein"
BCL2	gene "B-cell CLL/lymphoma 2"
BER	do inglês: Reparo por Excisão de Bases
BRCA1	gene "Breast cancer 1"
BRCT1	BRCA1 carboxyl-terminal 1
DNA	Ácido desoxirribunucleico
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase
DSB	do inglês: Reparo de quebra de dupla fita
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERCC1	gene "Excision Repair Cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1"
FEN1	structure-specific nuclease Flap endonuclease 1
GGR	do inglês: Reparo por Excisão de Nucleotídeos Global do Genoma
CCECP	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço
HR	do inglês: Recombinação Homóloga
IC	Intervalo de confiança
ICD	Classificação Internacional de Doenças
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NER	do inglês: Reparo por Excisão de Nucleotídeos
NHEJ	do inglês: Recombinação não Homóloga
OR	razão de probabilidade
PCNA	do inglês: antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	reação em cadeia da polimerase
PARP1	poli (ADP ribose) polimerase 1
PHA	do inglês: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

RFLP	do inglês: polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
SNP	do inglês: polimorfismo de base única
TCR	do inglês: Reparo por Excisão de Nucleotídeos Acoplada a Transcrição
TNM	Sistema de Classificação de Tumores Malignos
TP53	Gene “Tumor protein p53”
XPA	Gene “Xeroderma Pigmentosum, complementation group A”
XPB	Gene “Xeroderma Pigmentosum, complementation group D”
XRCC1	Gene “X-ray Cross Complementing Group 1”
XRCC2	Gene “X-ray Cross Complementing Group 2”
XRCC3	Gene “X-ray Cross Complementing Group 3”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO	17
1.1.2	Tumores de Cavidade Bucal	18
1.1.3	Diagnóstico, Prevenção e Tratamento	19
1.1.4	Fatores de Risco	20
1.2	CÂNCER DE CAVIDADE BUCAL: ASPECTOS GENÉTICOS E MOLECULARES	21
1.2.1	Gene <i>XRCC1</i>	23
1.2.2	Gene <i>XRCC3</i>	26
1.3	RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO	28
1.3.1	Cisplatina e Resistência	29
1.3.2	Reparo por Excisão de Nucleotídeos, Gene <i>ERCC1</i> e <i>XPA</i>	31
1.3.3	Resposta à Apoptose e Gene <i>BAX</i>	33
2	OBJETIVOS	35
3	ARTIGOS	36
	ARTIGO A	36
	ABSTRACT	36
	INTRODUCTION	38
	MATERIAL AND METHODS	39
	STUDIED POPULATION	39
	GENETIC POLYMORPHISMS	40
	STATISTICAL ANALYSIS	40
	RESULTS	42
	Association between polymorphisms for DNA repair genes and oral cancer	42
	<i>Association between polymorphisms for DNA repair genes and histopathologic paramemetr</i>	43
	DISCUSSION	45
	ACKNOWLEDGEMENTS	47
	REFERENCES	48

ARTIGO B	51
ABSTRACT.....	52
INTRODUCTION	53
MATERIAL AND METHODS	54
CELL LINES.....	54
CYTOTOXICITY	54
CULTURE CONDITIONS	55
RNA PREPARATION AND REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION	55
REAL TIME PCR.....	55
STATISTICAL ANALYSIS.....	56
RESULTS.....	57
<i>Cytotoxicity induced by cisplatin in SCC25 cell line</i>	57
<i>Relative Quantification of ERCC1, XPA and BAX Transcript Expression in SCC25</i>	
Cell Line	57
DISCUSSION.....	58
REFERENCES.....	61
4 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO A	76
ANEXO B.....	78
ANEXO C.....	79

1 INTRODUÇÃO

Hoje, o câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, o que tem levado a comunidade científica a dar grande ênfase ao estudo das características que tornam o indivíduo suscetível a desenvolver tumores.

O câncer é resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que leva a progressão de uma célula normal a uma célula cancerosa, em um processo que envolve múltiplos passos (BRAAKHUIS, BRAKENHOFF e LEEMANS, 2005), sendo considerado uma coleção de doenças nas quais crescimento e divisão celulares estão desregulados. Sem regulação, as células se dividem arar, acumulando-se umas em cima das outras para formar tumores (SNUSTAD e SIMMONS, 2001).

Para que esse crescimento desregulado ocorra, é necessário que haja uma alteração inicial. Segundo a Teoria Clonal do Câncer, proposta parcialmente por Knudson, esta alteração inicial é transmitida a todos os descendentes da célula-mãe, permitindo então a formação de um clone de células contendo a mesma alteração. Uma vez estabelecido, este grupo de células passa por uma segunda alteração genética, que se propaga pelos descendentes celulares, conferindo novas características e criando um clone dentro de um clone - ou ainda, um subclone (LOURO, 2000).

Alberts *et al.* (2002) afirmam que uma única mutação não é suficiente para converter uma célula sadia típica numa célula cancerosa, pois há várias evidências indicando que a gênese de um câncer requer, como regra geral, que vários acidentes raros e independentes ocorram juntos em uma célula.

Portanto, devido à complexidade e à presença de vias alternativas no controle da proliferação celular, é necessário a ocorrência de mutações adicionais e sucessivas em diferentes genes para que haja a formação de um tumor. Cada nova mutação é acompanhada de uma nova onda de expansão clonal e, ao final desse processo, surge uma população celular com grande potencial de crescimento, um tumor maligno (CAMARGO *et al.*, 1999).

Em alguns casos a predisposição a desenvolver câncer é herdada. Entretanto, a maioria dos casos de câncer é devida ao acúmulo de mutações nos tecidos

somáticos (SNUSTAD e SIMMONS, 2001), resultado de uma interação genética-ambiente (PERERA, 1997).

Segundo Field (1995), são reconhecidas duas classes de genes ligados ao câncer: oncogenes e genes supressores de tumor. A ativação de proto-oncogenes juntamente com a inativação de supressores tumorais são as principais alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento tumoral (PONDER, 2001). A classe de oncogenes está provavelmente envolvida na iniciação e progressão da doença (FIELD, 1995). A ativação dos proto-oncogenes em oncogenes pode se dar por translocações cromossômicas, amplificação gênica, mutações de ponto ou deleções (KNUDSON, 1985 *apud* FIELD, 1995), e levar à desregulação do controle do ciclo celular. Isto ocorre porque os proto-oncogenes são genes que atuam no controle do ciclo celular e que apresentam sua expressão rigorosamente regulada nas células normais.

Os genes supressores tumorais atuam como reguladores negativos da proliferação celular (VERMA e TRIANTAFILLOU, 1998). São genes normais, que quando ativados por uma mutação, deleção ou por vírus, causam desregulação das vias críticas que controlam o crescimento e diferenciação celular (HARRIS, 1991).

Relacionados aos mecanismos de reparo de DNA, uma terceira classe de genes tem sido associada ao desenvolvimento do câncer. Estes genes são responsáveis pela manutenção da estabilidade genética, reparando as lesões que podem ocorrer no material genético. O sistema de reparo atua em diferentes vias, removendo as diferentes lesões de acordo com a natureza química do agente genotóxico (BENHAMOU e SARASIN, 2000).

1.1 CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Os cânceres de cabeça e pescoço têm uma expressiva incidência e são responsáveis por uma substancial morbidade e mortalidade, havendo uma relevante preocupação para a saúde no mundo, particularmente nos países em desenvolvimento (PISANI, BRAY e PARKIN, 2002). Os sítios anatômicos do trato aéreo digestivo superior acometidos compreendem a faringe, cavidade bucal, cavidade nasal e laringe (ARGIRIS *et al.*, 2008).

Durante os últimos 5 anos, os novos casos de câncer aumentaram 25%, enquanto as taxas globais da doença aumentaram apenas 5% no mesmo período (LIU *et al.*, 2009).

Os tumores de cabeça e pescoço pela expressiva incidência e mortalidade, assim como alta letalidade, constituem uma relevante preocupação para a saúde no mundo, particularmente nos países em desenvolvimento (PISANI, BRAY e PARKIN, 2002). Dentre os cânceres de cabeça e pescoço estão os carcinomas de células escamosas, que constituem 90% de todos e estão associados a altas taxas de mortalidade, devido ao seu alto potencial infiltrativo (DE HERDT e BAATENBURG DE JONG, 2008).

1.1.2 Tumores de Cavidade Bucal

O câncer de cavidade bucal é considerado o tipo mais comum de câncer de cabeça e pescoço (LIPPMAN e HONG, 2001), sendo o carcinoma de células escamosas o tipo histológico prevalente (ZAKRZEWSKA, 1999). Entre os tipos menos comuns de câncer bucal estão os tumores malignos das glândulas salivares, melanomas, linfomas, neoplasias do tecido ósseo e conjuntivo, alguns tipos de tumores odontogênicos, carcinomas maxilar antral, neoplasias metastáticas (do peito, pulmão, estômago ou do fígado) e o sarcoma de Kaposi (SCULLY e POTER, 2000).

O câncer bucal refere-se a um subgrupo de câncer de cabeça e pescoço que se desenvolve nos lábios, língua, glândulas salivares, gengiva, assoalho da boca, orofaringe, superfície bucal e outras localizações intra-orais, de acordo com a *International Classification of Diseases* (ICD version 9, categories: 140-146, 149) (TSANTOULIS *et al.*, 2007).

Este tipo de tumor é incomum em países desenvolvidos, exceto em partes da França, mas se encontra disseminado em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, particularmente no sudeste da Ásia e no Brasil, principalmente em indivíduos de classes sócio-econômicas menos favorecidas (SCULLY e PORTER, 2000).

Mais de 300.000 novos casos de câncer de células escamosas de cavidade oral são diagnosticados por ano no mundo (PARKIN *apud* TSANTOULIS *et al.*, 2007). Este tipo de tumor é considerado como o sexto tipo mais comum de câncer no mundo (BOYLE *et al.*, 1992) e sétimo no Brasil, estando entre as principais causas de óbitos por neoplasias. A estimativa de incidência de câncer de boca no Brasil para o ano de 2010, incluindo os cânceres de lábio e bucal, foi de 14.120 casos (www.inca.gov.br).

1.1.3 Diagnóstico, Prevenção e Tratamento

Há vinte anos, diagnósticos e tratamentos para câncer de cabeça e pescoço têm sido aprimorados através de esforços combinados em cirurgias, radioterapia e quimioterapia, mas as longas taxas de sobrevida têm sido melhoradas apenas marginalmente e a taxa de sobrevivência de acima de 5 anos para pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) está entre as mais baixas entre os tumores mais prevalentes (HARDISSON, 2003).

O prognóstico de casos avançados de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço é particularmente ruim, devido à variação do comportamento biológico do tumor. Atualmente, os únicos fatores específicos de prognóstico que são rotineiramente considerados para se decidir o tratamento são o estágio, o local do tumor primário e a presença de nódulos e metástases à distância (HARDISSON, 2003). A biópsia realizada com anestesia local é considerada o melhor e o mais simples método, sendo a mais usada para o diagnóstico. Radiografia intra-oral e tomografia computadorizada podem ajudar a definir a extensão da lesão (ZAKRZEWSKA, 1999).

Segundo Zakrzewska (1999), o carcinoma pode se apresentar de várias maneiras, mas a maioria das lesões são assintomáticas. A leucoplasia oral, definida como uma mancha crônica branca na mucosa, é de fácil acesso para o diagnóstico e pode ser considerada como um indicador de risco de carcinoma bucal (MAJUMDER *et al.*, 2005).

Segundo dados do INCA (www.inca.gov.br) a prevenção do câncer bucal deve ser feita promovendo a higiene bucal, consultas odontológicas periódicas,

combatendo o tabagismo e o álcool e estimulando uma dieta saudável. A detecção precoce de lesões pré-malignas também ajuda na prevenção deste tipo de tumor (ZAKRZEWSKA, 1999).

Os carcinomas são frequentemente tratados cirurgicamente, sendo este o fator prognóstico mais importante para os pacientes (SAWAIR *et al.*, 2003). Em casos em que o tumor se encontra em estágios mais avançados, a remoção cirúrgica é combinada com radioterapia e/ou com quimioterapia pós-operatória como tratamento adjuvantes (HADDAD e SHIN, 2008).

A terapia do câncer bucal nem sempre é satisfatória (TANTOULIS *et al.*, 2007). Utilizando uma combinação de protocolos com radioterapia pré e pós operatória e/ou juntamente com quimioterapia, a taxa de sobrevivência de 2 e 5 anos para câncer avançado diminuiu para 20% e 12%, respectivamente (REICHARD *et al.*, 1993).

1.1.4 Fatores de Risco

As doenças complexas, incluindo o câncer, são baseadas em três fatores principais: o estilo de vida, a exposição ambiental e a suscetibilidade genética. Sendo o câncer uma das principais causas de morte em todo o mundo, a comunidade científica tem dado grande ênfase ao estudo das características que tornam o indivíduo suscetível a desenvolver tumores (AU *et al.*, 2001).

Segundo Doll & Peto (*apud* HATAGIMA, 2002), estudos epidemiológicos mostram que 80-90% de todos os cânceres são relacionados com fatores ambientais, como hábito de fumar, exposição ocupacional e dieta.

O uso de cigarro é o comportamento predominante, com maior implicação em doenças e na mortalidade em todos os países, sendo o tabaco um importante fator de risco no desenvolvimento de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (JENSEN, JENSEN e GRAU, 2007), devido ao fato dos componentes do cigarro terem a capacidade de formar aductos no DNA (SCULLY e BAGAN, 2007). As N-nitrosaminas, aminas aromáticas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PHA) são considerados os maiores carcinógenos que contribuem para o carcinoma bucal (BARTSCH *et al.*, 2000).

O álcool também é considerado um fator de risco no desenvolvimento do câncer bucal (OGDEN, 2005) e, embora a bebida e o cigarro sejam fatores de risco independentes, eles apresentam um efeito sinérgico, ou seja, aumentam o risco do desenvolvimento de câncer quando juntos (TSANTOULIS *et al.*, 2007). O fato do álcool ser considerado um fator de risco pode ser devido ao acetaldeído, o primeiro metabólito do etanol a ser considerado um carcinógeno (SCULLY e BAGAN, 2007).

Alguns autores também indicam a presença do HPV como um fator de risco (FORASTIERE *et al.*, 2001 e TSANTOULIS *et al.*, 2007), sendo que o DNA viral foi encontrado em 91% das lesões orais em estudos realizados por Tsantoulis *et al.* (2007). Os indivíduos mais acometidos pelo carcinoma da boca são do sexo masculino, principalmente de meia idade, embora esteja aumentando a incidência desta patologia entre indivíduos mais jovens, tabagistas e grupos populacionais de baixo poder sócio-econômico (SCULLY e POTER, 2000). No Brasil, os números estimados para o ano de 2010 são de 10.330 entre homens e 3.790 entre as mulheres (www.inca.gov.br).

Embora o uso do tabaco e consumo de álcool sejam os maiores fatores de risco para o carcinoma bucal, apenas uma fração das pessoas com esses hábitos desenvolvem este tipo de tumor, sugerindo que existe uma variação individual nesses fatores que contribuem para uma suscetibilidade genética na população (FRANCESCHI *et al.*, 1990). A identificação desses fatores genéticos que modulam o risco de carcinoma bucal é particularmente importante para a identificação de sub-grupos de alto risco que poderiam ser beneficiados em programas de prevenções primárias (SATHYAN *et al.*, 2006).

1.2 CÂNCER DE CAVIDADE BUCAL: ASPECTOS GENÉTICOS E MOLECULARES

Apesar da alta prevalência dos tumores de cabeça e pescoço, as alterações genéticas envolvidas no comportamento maligno e progressão desses carcinomas não são ainda completamente entendidas.

Estudos de investigação de anormalidades genéticas associadas com carcinomas orais levaram à identificação de perda de regiões cromossômicas, como as da região 9p, que foram encontradas em 70-80% das displasias estudadas por Califano

et al. (1996), sugerindo que esta perda é um evento inicial no processo de carcinogênese bucal. Além disso, a perda da região 3p cromossômica, ativação de *EGFR*, alterações no gene *TP53* e *P16*, além da superexpressão de *Ciclina D1* também estão envolvidos na transformação do epitélio normal a displasia e carcinoma bucal (LIPPMAN *et al.*, 2005).

Além de mutações raras em genes de alta penetrância, polimorfismos genéticos também são considerados fatores que contribuem para o desenvolvimento de cânceres. Embora geralmente associados a um pequeno aumento no risco de câncer, esses polimorfismos são altamente prevalentes na população; sendo assim, a atribuição ao risco de câncer pode ser alta (MATULLO *et al.*, 2001).

Foram descobertos vários genes de reparo polimórficos, o que normalmente ocorre por substituições nas bases do DNA. Estes polimorfismos ocorrem em resíduos que são idênticos no homem, hamsters e camundongos, sugerindo que os aminoácidos codificados são conservados evolutivamente (AGNEZ-LIMA, MEDEIROS e MAGGI, 2001).

A associação entre polimorfismos genéticos e marcadores moleculares intermediários envolvidos na cascata de eventos de genotoxicidade/ carcinogênese pode fornecer informações úteis na modulação de efeitos de polimorfismos genéticos, na suscetibilidade individual ligada a carcinógenos ambientais e ocupacionais e à possibilidade de ligação entre polimorfismos de reparo de DNA e taxa de reparo de DNA (VODICKA *et al.*, 2004).

Pesquisas realizadas abordando a prevalência de polimorfismos genéticos e exposição a fatores ambientais poderão conduzir a resultados relevantes para a compreensão da etiologia do câncer e, ainda, trazer novas contribuições sobre o prognóstico e a terapia dessa doença (WÜNSCH e ZAGO, 2005).

O reparo de DNA é um processo que está constantemente operando nas células; é essencial para a sobrevivência porque protege o genoma de danos e mutações nocivas. Existe uma variedade de mecanismos de reparo, cada um catalisado por um conjunto diferente de enzimas e os detalhes da etapa de excisão na reparação do DNA dependem do tipo de lesão (ALBERTS *et al.*, 1997).

Segundo Benhamou e Sarasin (2000), as vias de reparo do DNA são usualmente específicas para as classes que determinaram o dano: mau-pareamento ou anormalidades estruturais na forquilha de replicação são reparadas pela via de reparo de

mau pareamento; quebras de dupla fita são reparadas por processos de recombinação homóloga ou ilegítima; bases danificadas são usualmente reparadas pela via de reparo de excisão de bases (BER), e grandes lesões no DNA são exclusivamente reparadas pela via de reparo por excisão de nucleotídeo (NER).

Vários estudos têm demonstrado a existência de uma grande variação inter-individual na capacidade de reparo de DNA e de indivíduos com capacidade de reparo de DNA abaixo da média da população, o que pode levar a um aumento do risco de desenvolvimento de vários tipos de câncer (VODICKA *et al.*, 2004).

Dentre os polimorfismos de reparo mais estudados destacam-se os genes do *reparo por excisão de nucleotídeos* (NER), tais como os genes *XPB* (MATULLO *et al.*, 2001), os genes do *reparo de quebra de dupla fita* no DNA (reparo DSB), como o gene *XRCC3* (MATULLO *et al.*, 2001 e VODICKA *et al.*, 2004) e os genes envolvidos com o *reparo por excisão de bases* (BER), como o *XRCC1* (OLSHAN *et al.*, 2002 e MATULLO *et al.*, 2001) e *APE1* (ITO *et al.*, 2004; DE RUYCK *et al.*, 2007).

1.2.1 GENE XRCC1

O gene *XRCC1* (*X-ray cross complementing group 1*) apresenta um papel no reparo por excisão de bases (BER) e também é requerido para um reparo eficiente de quebra de fita simples (HUNG *et al.*, 2005). Este gene contém 17 éxons e está localizado no cromossomo 19q13.2 (LAMERDIN *et al.*, 1995). A proteína codificada pelo *XRCC1* interage com a DNA polimerase β , PARP [poli (ADP ribose) polimerase 1] e DNA ligase III (CALDECOTT *et al.*, 1996); apresenta um domínio BCRT, característico de proteínas envolvidas nos *checkpoints* do ciclo celular e que reagem a danos no DNA (Figura 1) (BORK *et al.*, 1997). Essa interação pode facilitar o reparo de lesões como quebras na fita de DNA e reparo por excisão de bases causadas por radiação ionizante, danos oxidativos e aductos não grandes (OLSHAN *et al.*, 2002).

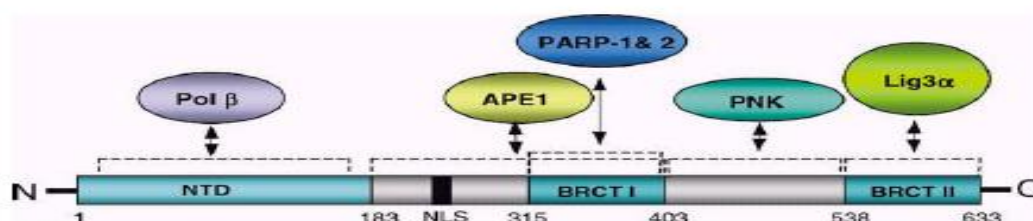


Figura 1 – Interação proteína-proteína mediada por *XRCC1*. NTD: Domínio N-terminal, NLS: sinal de localização nuclear. Fonte: CALDECOTT, 2003.

O reparo por excisão de bases (BER) (Figura 2) é uma das mais importantes vias de reparo contra danos no DNA (LINDAHL e WOOD, 1999), sendo responsável pela remoção diária de mais de 10.000 lesões no DNA (KRWAWICZ *et al.*, 2007).

Essa via de reparo é iniciada com o reconhecimento da base danificada ou incorreta por DNA glicosilases específicas, sendo essas subdivididas em glicosilases tipo I e tipo II. A glicosilase tipo I remove a base danificada deixando um sítio AP no DNA, enquanto as enzimas tipo II removem a base e subsequentemente clivam o sítio AP com uma endonuclease, aumentando a quebra na fita simples de DNA (CHRISTMANN *et al.*, 2003). Para a glicosilase tipo I, a incisão dentro da ligação fosfodiéster do sítio AP ocorre por uma AP endonuclease, como por exemplo, *APE1*, que pode interagir e estimular a ação do gene *XRCC1* (VIDAL *et al.*, 2001). A ação da enzima glicosilase tipo I resulta em 5' desoxiribose-5-fosfato (5'dRP) e 3'OH, sendo a remoção de 5'dRP um passo crítico para a escolha entre a via longa ou via curta deste tipo de reparo (CHRISTMANN *et al.*, 2003). O próximo passo é a inserção de um primeiro nucleotídeo. Durante a via curta, 5'dRP é deslocado por uma DNA polimease β (Pol β), que insere um único nucleotídeo no sítio AP (CHRISTMANN *et al.*, 2003). Ao contrário da via curta, vários passos adicionais ocorrem na via longa: após a dissociação da Pol β , a fita de DNA é deslocada e a síntese de DNA é feita pela Pol ϵ ou Pol δ acompanhada pela PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e FEN1 (*structure-specific nuclease Flap endonuclease 1*) (STUCKI *et al.*, 1998). O último passo é a ligação, que é feita por uma DNA ligase I e III. A ligase I interage com PCNA e pol β , participando principalmente da via longa, já a ligase III interage com *XRCC1*, Pol β e PARP1 e está envolvida somente na via curta (KUBOTA *et al.*, 1996).

Os polimorfismos no gene *XRCC1* têm sido associados com o risco de muitos cânceres relacionados ao cigarro, como câncer de pulmão, bexiga e esôfago

(GOODE, ULRICH e POTTER 2002) e carcinoma bucal (MATULLO *et al.*, 2001; OLSHAN *et al.*, 2002; MAJUMDER *et al.*, 2005).

Embora muitos polimorfismos tenham sido documentados no gene *XRCC1* (HAN *et al.*, 2003), dois diferentes polimorfismos: Arg194Trp (troca alelica C→T rs: 1799782) e Arg399Gln (troca alélica G→A rs: 25487) têm demonstrado alterações na capacidade de reparar o DNA em alguns fenótipos estudados (LUNN *et al.*, 1999; DUELL *et al.*, 2000; MATULLO *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2003). Devido a este importante papel na capacidade de reparar bases, a variabilidade na expressão de *XRCC1* tem sido examinada extensivamente em relação a doenças relacionadas com a idade, incluindo o câncer (GOODE, ULRICH e POTTER, 2002).

O polimorfismo no códon 194 não se encontra mapeado dentro de um domínio BRCT do gene *XRCC1*, entretando, a variante Arg399Gln (éxon 10) se encontra dentro do domínio BRCT1, uma região de extensa homologia ao BRCA1 e inclui sítios de ligação para PARP (RAMACHANDRAN, 2006). Dessa maneira, alterações nos aminoácidos dessa enzima poderiam diminuir sua eficiência no processo de reparo.

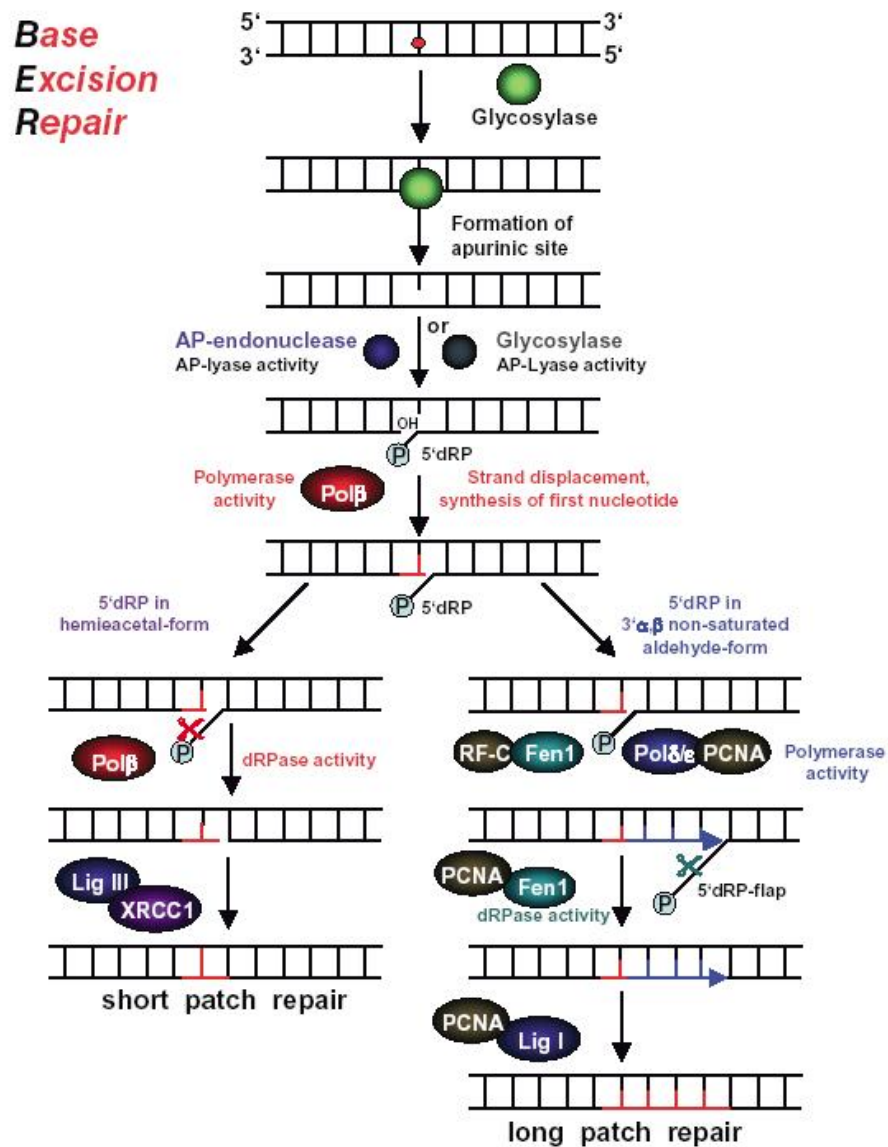


Figura 2 – Reparo por excisão de bases. Fonte: CHRISTMANN *et al.*, 2003.

1.2.2 Gene XRCC3

O gene *XRCC3* (*X-ray cross complementing group 3*) é um membro da família de genes de reparo de DNA *Rad51* (HU *et al.*, 2001) e participa do reparo de quebra/recombinação de dupla fita de DNA (LIU *et al.*, 1998).

Quebras de fita dupla de DNA são geradas por radicais produzidos endogenamente e agentes exógenos como radiação ionizante. O reparo de quebra de fita dupla (DSB) é de fundamental importância para prevenir fragmentação cromossômica, translocações e deleções (KANAAR, HOEIJMAKERS e VAN GENT, 1998). Existem duas principais vias de reparo de quebra de fita dupla, recombinação homóloga (HR) e não homóloga (NHEJ), as quais são, respectivamente, livres e propensas a erro (CHRISTMANN *et al.*, 2003). A recombinação homóloga requer uma extensa região de DNA homólogo e o reparo DSB usa a informação da cromátide irmã não danificada ou do cromossomo homólogo, enquanto a recombinação não homóloga não utiliza este tipo de molde, sendo, portanto, mais suscetível a erro (KANAAR, HOEIJMAKERS e VAN GENT, 1998).

Durante a recombinação homóloga (Figura 3), o cromossomo danificado entra em contato físico com a molécula de DNA não danificada, sendo esta usada como modelo para o reparo (CHRISTMANN *et al.*, 2003). O processo de reparo é iniciado com um complexo protéico denominado MRN (MRE11-Rad51-NBS1) e ATM (proteína mutada Ataxia Telangiectasia) (KARRAN, 2000) que fazem um corte no sentido 5'→3' no DNA (CHRISTMANN *et al.*, 2003). Esse corte na extremidade do DNA é requerido para gerar uma cauda de fita simples de DNA 3', que será o substrato para a recombinação homóloga (AGARWAL, TAFEL e KANAAR, 2006). A proteína Rad51, em seguida, polimeriza a cauda 3' para formar um filamento nucleoprotéico, que tem como função procurar DNA homólogo (KANAAR, HOEIJMAKERS E VAN GENT, 1998). Na montagem do filamento nucleoprotéico a atividade da Rad51 é facilitada pela ação de diferentes proteínas, principalmente Rad51B, C e D; *XRCC2* e *XRCC3* (WIESE *et al.*, 2002). Esse filamento nucleoprotéico invade então o “duplex” no sítio de homologia do DNA não danificado, criando um *D-loop*. Essa molécula ligada entre a cromátide irmã “quebrada” e a cromátide irmã intacta é usada como molde para a DNA polimerase, como a informação da sequência que foi perdida no processamento inicial da DSB. Em seguida, ocorre a ligação das fitas de DNA e a separação das moléculas ligadas às duas cópias intactas do DNA (AGARWAL, TAFEL e KANAAR, 2006).

O sistema NHEJ liga-se às duas extremidades da quebra de fita dupla sem requerer a sequência homóloga entre os dois finais do filamento de DNA (CHRISTMANN *et al.*, 2003). O primeiro passo nesse tipo de reparo é a ligação de um

complexo heterodímero de proteínas Ku 70 e Ku 80 à região danificada do DNA. Essa ligação sequencial ativa a função de fosforilação de proteínas quinases dependentes de DNA (DNA-PKcs), fosforilando ela mesma, o heterodímero Ku e outras proteínas envolvidas no ciclo celular (WETERINGS e van GENT, 2004). Isso facilita a ligação de um complexo DNA ligase IV/Xrcc4 (KARRAN, 2000); esse complexo liga-se às extremidades das moléculas, unindo-as (AGARWAL, TAFEL e KANAAR, 2006).

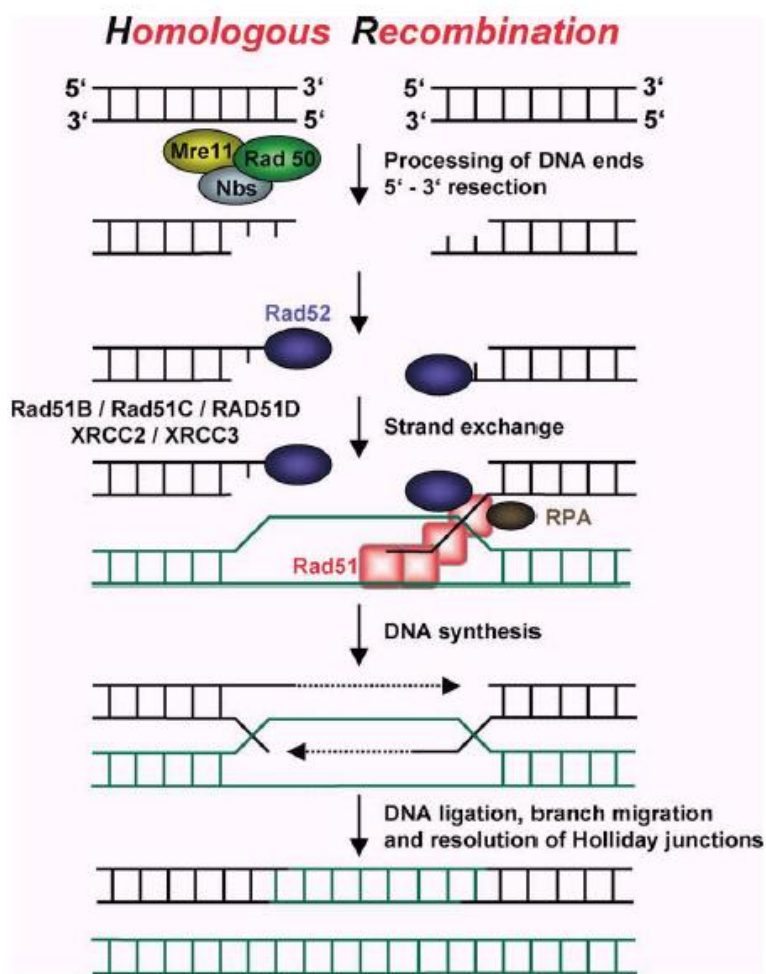


Figura 3 – Reparo Homólogo de quebra de dupla fita. Fonte: CHRISTMANN *et al.*, 2003

O gene *XRCC3* está localizado no cromossomo 14q32.3 (MANUGUERRA *et al.*, 2006) e apresenta uma variação na sequência do éxon 7 (rs: 861539), a qual resulta em uma substituição do aminoácido no códon 241 (Thr241Met),

que pode afetar a função da enzima e/ou a interação desta com outras proteínas envolvidas em danos e reparo do DNA (MATULLO *et al.*, 2001).

Estudos mostram que há uma relação positiva entre o polimorfismo Thr241Met e câncer de mama (SMITH *et al.*, 2003) e de pulmão (JACOBSEN *et al.*, 2004), e também uma associação com carcinoma de células escamosas de cavidade bucal (KIETTHUBTHEW *et al.*, 2006).

Células mutantes para *XRCC3* apresentam uma hipersensibilidade moderada à radiação ionizante e devido à sensibilidade dessas células a drogas que causam *crosslink*, esse gene tem sido candidato a ser um dos responsáveis pelo reparo por recombinação homóloga (BRENNEMAN *et al.*, 2000).

1.3 RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO

O uso de drogas citotóxicas na quimioterapia contra o câncer tornou-se uma rotina a partir da década de 50 e embora muitos tipos de tumores tenham se tornado refratários ao tratamento, as perspectivas de sobrevida para pacientes com alguns tipos de tumores aumentaram após anos de intervenção (FERGUSON e PEARSON, 1996).

A terapia contra o câncer envolve a exposição do indivíduo a agentes que matam as células cancerosas de uma maneira mais eficiente que as células de tecidos normais. As células tumorais proliferam mais rapidamente que células normais, assim, muitas drogas têm como alvo o ciclo celular. Existem várias maneiras de barrar a divisão celular, entretanto, o meio mais comum é explorar os efeitos de drogas que causam danos ao DNA, levando assim, a uma parada do ciclo celular e à morte da célula. Contudo, a toxicidade de drogas que causam esses danos pode ser reduzida pela atividade de várias vias de reparo do DNA, que removem lesões antes destas se tornarem tóxicas para a célula. Portanto, a eficácia da terapia baseada em drogas que causam danos no DNA pode ser modulada por vias de reparo a danos no DNA (HELLEDAY *et al.*, 2008).

Outro fator associado à resistência do tratamento é a alteração na expressão de genes reguladores de apoptose, que podem alterar a sensibilidade das

células após o tratamento. Um exemplo disso está no fato de que células com alto nível de expressão de inibidores de apoptose ou baixo nível de promotores de apoptose requerem um alto nível de danos antes de iniciarem o processo de morte celular (KARTALOU e ESSIGMANN, 2001).

1.3.1 Cisplatina e Resistência

O *cis*-Diamminedichloroplatinum (II) (cisplatina ou *cis*-DDP) (Figura 4) é um agente quimioterápico amplamente utilizado em terapias, mostrando uma significativa atividade anti-tumor contra cânceres de testículos, ovário, cabeça e pescoço e pulmão (KARTALOU e ESSIGMANN, 2001). Sua principal atividade citotóxica é baseada na formação de aductos de DNA, o qual causa *crosslink* inter- e intrafita (JUN *et al.*, 2008).

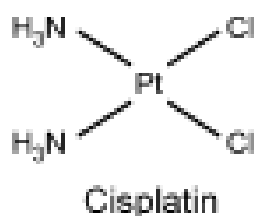


Figura 4 – Estrutura do quimioterápico cisplatina (Fonte: KARTALOU e ESSIGMANN, 2001).

A cisplatina torna-se ativada intracelularmente por um processo do tipo hidratação, no qual moléculas de água são incorporadas ao composto, no caso da cisplatina, deslocando um ou dois cloros da sua estrutura (KELLAND, 2007). A baixa concentração celular de íons cloro facilita este processo e após essa transformação, a cisplatina se torna mais reativa a alvos celulares (WANG e LIPPARD, 2005).

A molécula transformada é então capaz de interagir com moléculas dentro da célula, incluindo DNA, RNA e proteínas (RABIK e DOLAN, 2007). Ao se ligar covalentemente a molécula de DNA, forma aductos na molécula de DNA (KELLAND, 2007). O átomo de platina da cisplatina forma uma ligação covalente na posição N7 das bases purina, principalmente *crosslinks* 1,2 e 1,3-intrafita (WANG e LIPPARD, 2005), formando também *crosslinks* inter-fita, entretanto, essas representam menos de 1% das lesões induzidas pela cisplatina (SANDERSON *et al.*, 1996) (Figura 5).

Esse processo de formação de aductos ativa sinais de várias vias de transdução, como, por exemplo, os envolvidos no reconhecimento de danos e reparação de DNA, a parada do ciclo celular, e morte celular programada / apoptose (KELLAND, 2007).

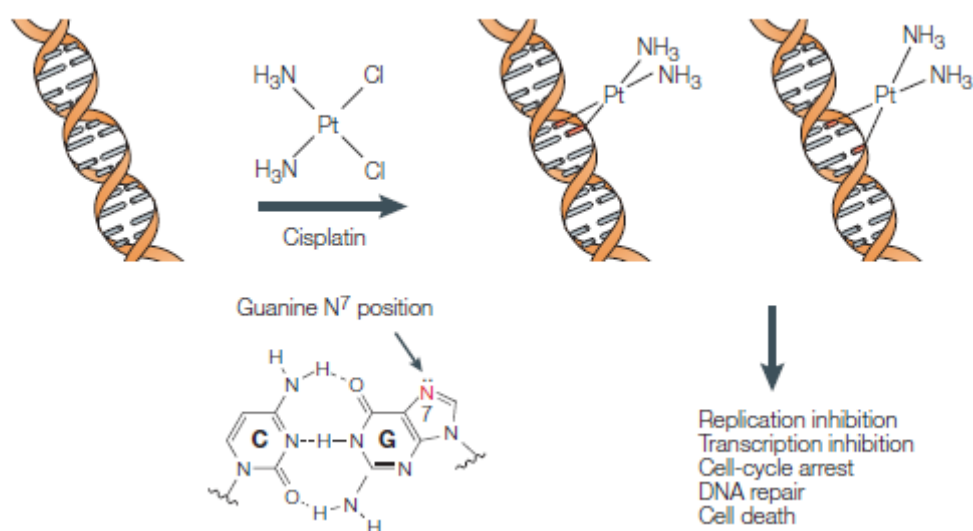


Figura 5 – Formação e efeitos dos aductos de cisplatina (Fonte: WANG e LIPPARD, 2005).

Logo após o início do uso da cisplatina como uma promessa no tratamento de diversos tipos tumorais, a atenção se voltou para estudos envolvendo resistência a essa droga, já que alguns tumores apresentam uma resistência intrínseca a este tratamento ou são capazes de desenvolver essa resistência (STEWART, 2007). Vários trabalhos mostram diversos tipos de mecanismos de resistência à cisplatina, como aumento do efluxo, inativação da droga por proteínas intracelulares como glutatonas, aumento da capacidade de replicação mesmo com danos no DNA, aumento

das taxas de reparo de aductos causados pela cisplatina e defeitos na via de resposta à morte celular programada (STEWART, 2007; KARTALOU e ESSIGMANN, 2001; BRENES *et al.*, 2007).

No tratamento dos cânceres de cabeça e pescoço, a quimioterapia é usada como um tratamento paliativo quando o paciente apresenta recorrência local do tumor ou metástases (ZAKRZEWSKA, 1999); entretanto, apenas 20-30% dos pacientes apresentam resposta a agentes platina (RABIK e DOLAN, 2007)

1.3.2 Reparo por excisão de nucleotídeos, Gene ERCC1 e Gene XPA

O reparo a danos no DNA apresenta um importante papel na modulação da citotoxicidade da cisplatina (WANG e LIPPARD, 2005). O reparo por excisão de nucleotídeos (NER- *Nucleotide Excision Repair*) é considerado como uma das mais importantes vias que mantém a integridade do genoma por reconhecimento e excisão de uma variedade de *crosslinks* causados por cisplatina e radiação (MURRAY e ROSENBERG, 1996).

O reparo por excisão de nucleotídeos é uma via altamente conservada que repara lesões que alteram a estrutura helicoidal da molécula de DNA e interfere na replicação e transcrição. Importantes passos nessa via incluem o reconhecimento do dano no DNA e a demarcação da área específica afetada, seguida pela formação de um complexo que faz a excisão da área danificada; o passo final envolve a síntese da área excisada e a ligação da molécula de DNA (MARTIN, HAMILTON e SCHILDER, 2008).

Duas vias do reparo por excisão de nucleotídeos tem sido descritas: uma via chamada Reparo por Excisão de Nucleotídeos Acoplada à Transcrição (TCR – *Transcription-coupled Nucleotide Excision Repair*), que apresenta como alvo lesões na fita transcrita de genes expressos, e uma via chamada Reparo por Excisão de Nucleotídeos Global do Genoma (GGR – *Global Genome Nucleotide Excision Repair*) que repara lesões no resto do genoma (GOSSAGE e MADHUSUDAN, 2007).

O gene *ERCC1* (Excision repair cross-complementation group 1), localizado no cromossomo 19q13.2-q13.3 (www.ncbi.nlm.nih.gov) apresenta um papel

chave no reparo por excisão de nucleotídeos e na remoção de aductos no DNA causados por agentes platina (STEWART *et al.*, 2007). Esse gene participa da via de reparo GGR e formando um heterodímero com o “Xeroderma Pigmentosum group F” (*XPF*), que faz a excisão do segmento de nucleotídeos contendo as lesões (SHIMIZU *et al.*, 2008) (Figura 6).

Segundo Damia, Guidi e D’Incalci (1998), a cisplatina causa um aumento dose e tempo dependente na expressão de mRNA- *ERCCI* e proteína *ERCCI* em células de câncer de ovário, sendo que sua superexpressão está associada com a redução da eficácia deste tipo de tratamento em alguns cânceres (STEWART *et al.*, 2007). Em SCCHN, a alta expressão do gene *ERCCI* foi correlacionada como um fator de risco para pacientes tratados com uma combinação de quimioterapia, radioterapia e cirurgia (JOSHI *et al.*, 2005).

O gene *XPA* (Xeroderma Pigmentosum, complementation group A) localizado no cromossomo 9q22.3 (www.ncbi.nlm.nih.gov) assim como o gene *ERCCI*, participa do reparo GGR (Figura 6) e codifica uma proteína chamada dedo de zinco, que faz parte de um complexo de reparo por excisão de nucleotídeos (www.ncbi.nlm.nih.gov), sendo responsável pelo reconhecimento da lesão (BENHAMOU e SARASIN, 2000). O aumento da expressão de mRNA desse gene é observado em tecidos tumorais de ovário em pacientes resistentes à quimioterapia, quando comparado aos níveis em tecidos de pacientes que respondem ao tratamento (DABHOLKAR *et al.*, 1994). A superexpressão desse gene também foi verificada em um trabalho realizado com linhagens celulares de câncer de pulmão de células não pequenas (WEAVER *et al.*, 2005). Entretanto, não existem dados na literatura relacionando a expressão deste gene com a resistência à cisplatina em carcinoma bucal.

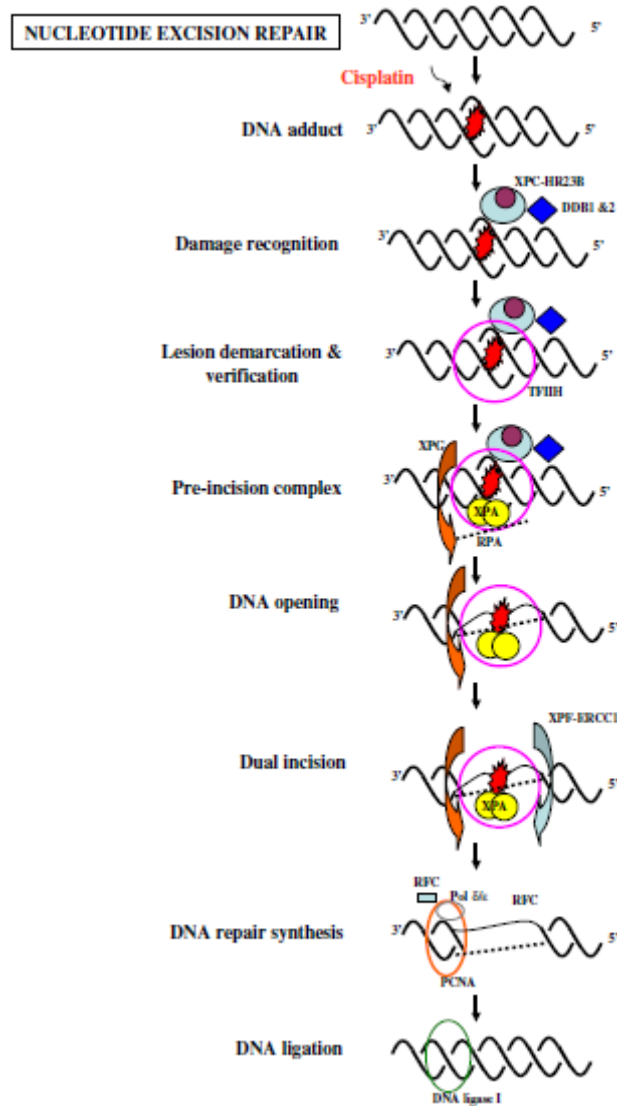


Figura 6 – Reparo por Excisão de Nucleotídeos Global do Genoma (Fonte: GOSSAGE e MADHUSUDAN, 2007).

1.3.3 Resposta à Apoptose e Gene BAX

Apoptose é uma via de morte celular programada que é iniciada por uma ativação sequencial de proteases cisteína da família caspase e é dividida em duas vias, uma *extrínseca* e uma *intrínseca* (ADAMS, 2003). A via *intrínseca* (também chamada “via mitocondrial” ou “via de estresse”) ativa a Caspase-9 quando Citocromo C é liberado da mitocôndria danificada em resposta a estresses diversos, como danos ao

DNA. Essa caspase iniciadora pode clivar e ativar caspases efetoras (-3, -6 e -7) que mediam a desorganização celular por clivagem múltipla de proteínas celulares críticas (ADAMS e CORY, 2007).

Apoptose induzida por cisplatina é geralmente resultado da capacidade desta droga de danificar o DNA (EASTMAN, 1990). Agentes quimioterápicos que usam essa estratégia são dependentes da ativação da via mitocondrial por meio de uma cascata intacta de caspases. Essa via apoptótica é regulada por membros pró e anti- apoptóticos da Família Bcl2 (TAKAOKA *et al.*, 2007). Como a apoptose é um processo regulado, alterações bioquímicas que tornam as células mais ou menos suscetíveis a apoptose podem afetar a sua sensibilidade a um grande número de agentes antineoplásicos (KAUFMANN e EARNSHAW, 2000), como por exemplo a cisplatina, e segundo Kartalou e Essigmann (2001), células que apresentam altos níveis de inibidores apoptóticos ou baixos níveis de promotores dessa via, poderiam requerer altos níveis de danos antes de iniciar a via de morte celular.

O gene *BAX* (BCL2-associated X protein) localizado no cromossomo 19q13.3-q13.4 codifica uma proteína pertencente à Família de proteína Bcl2. Esta proteína forma um heterodímero com *BCL2* e funciona como um ativador de apoptose na célula. A proteína interage com o canal de voltagem ânion dependente da mitocôndria e aumenta a intensidade da sua abertura, o que leva à perda do potencial de membrana, levando à liberação do citocromo c. A expressão desse gene é regulada pelo gene *TP53* e parece estar envolvida em apoptose mediada por esse gene supressor tumoral (www.ncbi.nlm.nih.gov). Por ser um gene que induz morte celular programada, a alteração de sua expressão pode estar envolvida no mecanismo de resistência a drogas que causam danos ao DNA. Essa resistência foi observada em uma linhagem celular de ovário resistente à cisplatina (PEREGO *et al.*, 1996). Entretanto, em um trabalho realizado com linhagens celulares de hepatoma, os autores não encontraram alteração na expressão do gene *BAX* (BRENES *et al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

- Verificar a frequência de variantes alélicas em genes de reparo a danos no DNA em pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade bucal e indivíduos controles e se existe alteração de expressão de genes ligados à resistência a quimioterapia em células submetidas ao quimioterápico cisplatina.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar as frequências genotípicas de três variantes polimórficas nos genes de reparo do DNA: *XRCC1* e *XRCC3* em pacientes com carcinoma bucal e em indivíduos controles sem histórico de neoplasia.

- Realizar um estudo de associação do tipo caso-controle para avaliar se os genes selecionados constituem bons marcadores moleculares de suscetibilidade ao câncer bucal, visando determinar sub-populações mais suscetíveis a este tipo de câncer.

- Correlacionar os dados moleculares com aspectos histopatológicos relevantes.

- Implantar a técnica de extração de RNA e PCR em Tempo Real no laboratório de Mutagênese e Oncogenética por meio da investigação da expressão de genes de reparo (*XPA* e *ERCC1*) e de controle de apoptose (*BAX*) em células tumorais tratadas com cisplatina.

3 ARTIGOS

3.1 ARTIGO A – Presence of allelic variants in *XRCCI* and *XRCC3* repair genes do not increase susceptibility of oral cancer in Brazilian patients.

Artigo a ser submetido a *Journal of Oral Pathology & Medicine*

ISSN: 1600-0714

Fator de Impacto: 1,63

Mariana Bisarro dos Reis¹; Roberta Losi Guembarovski¹; Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro²; Iglénir João Cavalli²; Maria Celeste Morita³; Gyl Ramos⁴, Benedito W. Oliveira⁴, Lauro Toyshi Mizuno⁵, Sílvia Regina Rogatto⁶, Ilce Mara de Syllos Cólus¹

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina (Londrina – PR - Brazil)

²Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (Curitiba - PR-Brazil)

³Departamento de Medicina Oral e Odontologia Infantil, Universidade Estadual de Londrina (Londrina - PR-Brazil)

⁴Hospital Erasto Gaertner, Serviço de Cabeça e Pescoço (Curitiba-PR-Brazil)

⁵Centro Odontológico Norte do Paraná, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil

⁶Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Botucatu- SP- Brazil)

Abstract

Background: DNA repair capacity is essential in maintaining cellular functions and homeostasis. However, this capacity can be altered based on DNA sequence variations in DNA repair genes and thus may contribute to the origin of cancer. Many single nucleotide polymorphisms (SNPs) in repair genes have been found to be associated with oral cancer. The aim of this study was to investigate the relationship between the

presence of allelic variants rs: 1799782 and rs: 25487 of *XRCC1* gene and rs: 861539 of *XRCC3* gene and susceptibility to oral cancer and to correlate the results of genetic testing to histopathological parameters of patients.

Methods: Genomic DNA was extracted by "salting out". Genotyping by PCR-RFLP was carried out on 150 patients with oral squamous cell carcinoma and 150 controls.

Results and conclusions: Presence of the polymorphic variants of *XRCC1* gene: codon 194 (OR 0.82, 95% CI 0.44-1.51), codon 399 (OR 0.94, 95% CI 0.59-1.50) and *XRCC3* gene (OR 0.72; 95% CI 0.45-1.16) were not associated with increased risk of oral cancer. The combinational analysis also indicated no association. When compared the analysis of allelic variants of genes with the histopathological parameters: tumor differentiation, lymph node invasion and tumor size, data were not statistically significant. These results suggest that the allelic variants studied are not suitable markers for susceptibility to carcinomas of the oral cavity and are also not related to later stages of such tumor.

Keywords: *XRCC1*, *XRCC3*, polymorphisms, oral cancer, histopathological parameters

INTRODUCTION

DNA damage plays a central role in carcinogenesis and, consequently, genes involved in DNA repair are considered key genes in cancer development (1).

Recent genetic association studies on cancer risk have focused the identification of the effects of single nucleotide polymorphisms in some genes, among which DNA repair genes, that are increasingly studied because they have a critical role in maintaining genome integrity (2). Although these polymorphisms are associated with a slight individual cancer risk, they are prevalent in population, so may contribute to determine populational risks of cancer (3).

Oral cancer is the sixth most frequent cancer worldwide (4) and the estimated incidence of oral cancer in Brazil for 2010 was 14.120 cases (5). Some repair genes have been reported to be associated with oral cancer, among them, the genes of *X-ray repair cross complementing 1* and *3* (*XRCC1* and *XRCC3*).

The DNA repair gene *XRCC1* gene codes for a protein involved in base excision repair (BER) of damaged bases caused by endogenous and exogenous oxidant and in the repair of single-strand breaks (SSB) (6). The product of this gene interacts with DNA polymerase, poly(ADP)ribose polymerase, and DNA ligase III and also contains a BRCA1 COOH terminus domain, which is characteristic of proteins involved in cell cycle checkpoint functions (7).

Several polymorphisms are described for the *XRCC1* gene, however three polymorphisms occurring at conserved sequences in this gene and were found at codons 194 (Arg-Trp), 280 (Arg-His) and 399 (Arg-Gln) in a study realized by Shen *et al.* (8). The polymorphism at codon 194 (rs: 1799782) results in a nonconservative substitution occurring within a hydrophobic core and this change is not mapped into a BRCT domain of *XRCC1* gene, however the variant Arg399Gln (exon 10) (rs: 25487) is within of the domain BRCT1, a region of extensive homology to the BRCA1 and includes binding sites for PARP (9). Thus, these changes in amino acids of this enzyme could affect its efficiency in repair process.

A common variant of *XRCC3*, comprise a threonine to methionine substitution at amino acid position 241 (rs: 861539) and this is a change that can affect the function of the enzyme and / or its interaction with other proteins involved in damage and DNA repair (3). This gene is involved in the repair of DNA double-strand

breaks (DSB) through the process of homologous recombination (HR) (10) and this repair is important to prevent chromosomal fragmentation, translocations and deletions (11).

Some studies have linked the polymorphism in *XRCC3* gene with breast cancer (12), lung cancer (13), and also an association with squamous cell carcinoma of the oral cavity (14).

In the present report we attempt to investigate associations between DNA repair genetic polymorphisms (*XRCC1* Arg194Trp and Arg399Gln, and *XRCC3* Thr241Met) and their association with the risk of oral squamous cell carcinoma (OSCC) in Brazilian patients. Because there are no work that study variations in these genes and tumor aggressiveness, we also correlated the molecular data with histopathological parameters of patients.

MATERIAL AND METHODS

STUDIED POPULATION

The case group comprised 150 patients (57.52 ± 11.85 range 22-84 years) with a histopathologically confirmed diagnosis of oral squamous cell carcinoma that were recruited from Hospital Erasto Gaertner (PR), Hospital do Câncer de Londrina (PR), Hospital A.C Camargo (SP) and Faculdade de Medicina de Botucatu (SP) in Brazil. A total of 150 normal controls (57.27 ± 11.89 range 22-82 years) were also included. All the controls were matched to patients by sex, age, ethnicity and tabagist habit. Research protocols were approved by the Ethics Committee of the participant institutions and written informed consent was obtained from all individuals.

Histopathologic analysis was performed with HE staining (hematoxylin-eosin) routine, for clinical confirmation. The pathological classification of tumors was performed according to international standards established by the International Classification of Tumors (WHO). Clinical staging was determined according to the TNM staging (size, lymph node invasion, tumor differentiation) of cancer.

GENETIC POLYMORPHISM

The polymerase chain reaction (PCR) was performed in 20 μ L reaction buffer containing 12.5 pmol each primer, 2 mM of dNTPs, 1.5 mM of MgCl₂, about 100 ng DNA and 1 U of Taq DNA polymerase. PCR was carried out in a PXR 0.2 Thermal Cycler thermocycler. PCR was performed on each DNA sample using the primer sequences, annealing temperatures and restriction enzymes for RFLP that are detailed in Table 1. All the RFLP fragments were determined on 2.5% agarose gels stained with ethidium bromide.

STATISTICAL ANALYSIS

The comparison of the gene frequencies observed in patients and controls was performed using contingency tables to calculate the odds ratios (OR) with a confidence interval (CI) of 95%, in an association study. For these genes, which the three genotypes were identified, a 3x2 contingency table was constructed taking the wild genotype as reference (OR=1.0) to determine the OR value for heterozygote and rare genotypes, using the program DPP Braille Biomedical (<http://www.braille.com.br>).

The different genotypes of *XRCC1* and *XRCC3* were compared with the histopathological parameters: tumor differentiation, lymph node invasion and tumor size, using the Fisher's Exact Test.

Table 1 – Summary on PCR-RFLP assay of polymorphisms in DNA repair genes

Gene	Polymorphism	PCR primer	PCR product (bp)	Restriction enzyme	Fragments identifying genotypes (bp)	Genotypes	Reference
<i>XRCC1</i>	Arg194Trp	F=5'GCCAGGGGCCCTCCTTCAA3' R=5'TACCCTCAGACCCACGAGT3' Ta= 63° C	485	<i>PvuII</i>	CC=485 CT=485/396/89 TT=396/89	P H R	(15)
	Arg399Gln	F=5'TCTGTCTCCCCTGTCTCGTT3' R=5'ATTGCCCAGCACAGGATAAG3' Ta=60°C	239	<i>HpaII</i>	GG=187/52 GA=239/187/52 AA=239	P H R	(16)
<i>XRCC3</i>	Thr241Met	F=5'GGTCGAGTGACAGTCCAAAC3' R=5'TGCAACGGCTGAGGGTCTT3' Ta=63°C	456	<i>NlaIII</i>	CC=316/140 TC=316/211/140/105 TT=211/140/105	P H R	(16)

F= Forward primer; R= Reverse primer; Ta= Annealing temperature

P= Prevalent genotype; H= Heterozygous genotype; R= Rare genotype

RESULTS

Characterization of sample is summarized in Table 2. Because of frequency-matching by age, there were no differences in the mean age between cases (57.52 ± 11.85 range 22-84 years) and controls (57.27 ± 11.89 range 22-82 years).

Table 2 – Characteristics of the study population.

	Cases		Controls	
	N	%	N	%
Gender				
Male	122	81.33	122	81.33
Female	28	18.67	28	18.67
Ethnicity				
Euro descendants	134	89.34	134	89.34
African descendants	14	9.33	14	9.33
Asian descendants	2	1.33	2	1.33
Smoke Status				
Yes	129	86	129	86
No	21	14	21	14

Association between polymorphisms for DNA repair genes and oral cancer

In this work we studied 150 patients for the *XRCC1* polymorphisms (Arg194Trp and Arg399Gln). It was not possible to amplify some samples for *XRCC3* gene, so just 144 individuals were genotyped.

The genotype distributions for individual DNA repair genes are shown in Table 3.

Statistical analysis showed no positive or negative association between polymorphisms Arg194Trp (OR 0.82, 95% CI 0.44-1.51) and Arg399Gln (OR 0.94, 95% CI 0.59-1.50) of *XRCC1* gene and risk of oral cancer. For the *XRCC3* gene polymorphism, there was no association between the variant allele and cancer study (OR 0.72; 95% CI 0.45-1.16).

All possible combined analysis between the three polymorphisms studied were analyzed and were not statistically significant (Data not show).

Table 3 – Frequencies of allelic variants isolated for XRCC1 and XRCC3 genes in patients with oral cancer and matched controls.

Gene/ Polymorphism	Genotypes	Case		Controls		OR (CI 95 %)
		N°	%	N°	%	
<i>XRCC1</i> Arg194Trp	C/C(Arg/Arg)	127	84.67	123	82	Reference
	C/T(Arg/Trp)	23	15.33	24	16	0.92 (0.49-1.73) p=0.93
	T/T(Trp/Trp)	0	0	3	2	-----
	C/T and T/T	23	15.33	27	18	0.82 (0.44-1.51) p=0.64
<i>XRCC1</i> Arg399Gln	G/G (Arg/Arg)	64	42.67	62	41.33	Reference
	G/A (Arg/Gln)	62	41.33	54	36	1.11 (0.67-1,84) p=0.77
	A/A (Gln/Gln)	24	16	34	22.67	0.68 (0.36-1.28) p=0.30
	A/G and A/A	86	57.33	88	58.67	0.94 (0.59-1.50) p=0.90
<i>XRCC3</i> Thr241Met	C/C (Thr/Thr)	63	43.75	52	36.11	Reference
	C/T(Thr/Met)	72	50	78	54.17	0.76 (0.46-1.24) p=0.33
	T/T(Met/Met)	9	6.25	14	9.72	0.53 (0.21-1.32)) p=0-25
	C/T and T/T	81	56.25	92	63.89	0.72 (0.45-1.16) p=0.23

Association between polymorphisms for DNA repair genes and histopathologic parameters

In relation to the degree of tumor differentiation was possible to obtain information from the medical records of 127 patients. Of these, 14 (11.02%) had well differentiated tumors (Grade I), 74 (58.27%) moderately differentiated tumors (Grade II) and 39 (30.71%) poorly differentiated tumors (Grade III).

For the parameter invasion of regional lymph nodes, information was available for 131 patients (85% of the sample). Of these, 72 (54.96%) had lymph node involvement and 59 (45.04%) had no impairment.

The analysis of tumor size was possible for 124 samples. Of these, 51 (41.13%) patients showed tumors with T1 and T2 and 73 (58.87%) patients with T3 and T4 in TNM Classification of Malignant Tumors.

The analysis of three polymorphisms in relation to histopathological

parameters (invasion of regional lymph nodes, differentiation and tumor size) showed that the presence of allelic variants was not associated with a more aggressive or more advanced stage of tumors. The data are presented in Tables 4.

Table 4 – Distribution of patients with presence or absence of risk genotypes in relation to the regional lymph nodes invasion, tumor differentiation and tumor size.

Analyzed Parameters	<i>XRCCI</i> Arg194Trp		<i>XRCCI</i> Arg399Gln		<i>XRCC3</i> Thr241Met	
	Risk Genotype					
Regional Lymph nodes Invasion	P	A	P	A	P	A
With	13	59	42	30	41	29
Without	8	51	34	25	30	27
Fisher's Exact Test	1.32 (IC 95%=0.59-2.99) p= 0.62		1.01(IC 95%=0.75-1.36) p=1.00		1.11 (IC 95%=0.81-1.52) p=0.59	
Tumor Differentiation	P	A	P	A	P	A
Grade I and II	13	75	48	40	50	36
Grade III	9	30	26	13	20	17
Fisher's Exact Test	0.64 (IC 95%=0.30-1.37) p=0.31		0.81 (IC 95%=0.61-1.1) p=0.24		1.076(IC 95%=0.76-1.52) p=0.69	
Tumor Size	P	A	P	A	P	A
T1 and T2	7	44	27	24	25	26
T3 and T4	13	60	45	28	39	31
Fisher's Exact Test	0.77 (IC 95%=0.33-1.80) p=0.63		0.86 (IC 95%=0.62-1.18) p=0.36		0.88(IC 95%=0.62-1.24) p=0.58	

P= Presence of risk genotype; A= Absence of risk genotype

DISCUSSION

A large percentage of cancers have been associated with environmental risk factors. The head and neck squamous cell carcinoma is a heterogeneous disease with distinct patterns of presentation and behavior (17), and is an example of carcinogenic process triggered by environmental factors. The accurate functioning of the DNA-repair proteins is a crucial step in maintaining genomic homeostasis and preventing carcinogenesis (18) and polymorphisms in repair genes could alter individual susceptibility to cancer.

Although a large number of studies have been undertaken in respect of strategies to prevent oral cancer, few studies are known about the clinical significance of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in DNA repair genes and its possible role as tool for identifying high risk sub-groups (9).

Brazilian population is one of the most heterogeneous (19) in the world with a mixture of native indigenous people and immigrants from Europe, Africa and Asia and beyond that polymorphisms in some genes show different frequencies in different populations (20). When studying samples from Brazilian individuals must also take into account the heterogeneity, because both factors make it difficult to compare data obtained from homogeneous populations with the Brazilian population.

Studies of allelic variants in repair genes are of great importance since they are responsible for correct damaged nucleotide residues generated by exposure to carcinogens and so maintaining cellular functions and homeostasis. Besides that, access to care with oral health has been hindered in Brazil, because of bad condition of major part of population, which makes difficult to prevent and diagnoses early disease.

In this study we analyzed the allelic variants of genes involved in repair processes of DNA damage (*XRCC1* and *XRCC3*), since many studies have indicated that some allelic variants in these genes are associated with cancers related to exposure to environmental carcinogens (15). We did not found the association between the Arg194Trp and Arg399Gln (*XRCC1* gene) and significant differences in cancer development. Studies with these variants are controversial in the literature since some authors found positive results and others not. Ramachandran *et al.* (9) reported the Arg194Trp is associated with an increased risk of oral cancer in a Indian population and a marginally significant risk of oral cancer was observed in a case-control study in Thailand (14).

Kietthubthew et al. (14) found a protective effect against oral cancer for the presence of the homozygous variant 399Gln, although the presence of this genotype was associated with a reduction in the excision repair of bases. However Sturgis et al. (15) found a positive relationship with the presence of this genotype and smoking (OR= 3.18 IC95% 1.28 – 7.94). In a metaanalysis conducted by Hung et al. (21) with various tumor types, was observed the modification of the effect of the *XRCC1* Gln/Gln genotype by tobacco smoking. Although the sample of this study was composed of 86% smokers, we found no change in the risk of oral cancer and the presence of this polymorphism.

We also studied the *XRCC3* polymorphism (Thr241Met) and no association was found between this variant and an increased risk of oral cancer. This gene participates in the repair of DNA double-stranded breaks and this type of damage is the most common lesion in the genome and can occur as a result of multiple damaging agents, such as ionizing radiation or chemical exposure (22).

Similar results to those found in this study were seen by Yen et al. (23), who found a higher frequency of allelic variant 241Met between the control group and by Huang et al. (24), which found no association between the variant and the risk of head and neck cancer. An association of this allelic variant with oral cavity cancer was observed by Kietthubthew et al. (15) in a study conducted in Thai population. Shen et al. (25) also observed an association of this variant in squamous cell of head and neck cancer for women and also smokers individuals.

However, the study of allelic variants isolated has no big information power as the combined analysis. According Yen et al. (23), the combined analysis of the allelic variants is justified by the fact that the interaction between these variants within the same gene, and variants of multiple genes is widely accepted as a factor that influence the oral carcinogenesis. When the analysis was performed for the combined risk genotypes of *XRCC1* and *XRCC3* genes studied in the present study, the OR indicated no association between allelic variants and OSCC.

Regarding the association of genotypes and histopathological data, no analysis was statistically significant. Thus, the risk genotypes did not influence the later differentiated tumor, regional lymph nodes invasion or tumor growth. The histopathological criteria are extremely important to define and support the diagnosis and prognosis of the patient. However, in the literature are few studies that compare histopathological parameters in oral cavity tumors with genes that can increase the risk of

developing this type of cancer. An example is the study of Raju et al. (26), who found a correlation between tumor grade and expression of cell cycle proteins, cyclin D1 and Ki-67 in patients from Yemen and India.

Pathways that involve the DNA damage repair has been studied in relation to risk of developing cancer and its evolution, though the evaluation of multiple genes interacting among themselves is of great importance. This is because the use of tobacco and alcohol are important environmental factors involved in oral carcinogenesis and biometabolism enzymes can influence the biological response to carcinogens. In a recent study published by our group (27) was found no association between polymorphisms in *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* genes and risk of development of OSCC and also with prognostic parameters in 91 patients. In the present study it was made a combined analysis of the genes *XRCC1* and *XRCC3* and allelic variants of the 3 genes mentioned above in 63 individuals. Due to stratification of the sample, was not possible to carry out a statistical analysis, but the combinations suggested no association with oral cancer, reinforcing the data of individual study, where we concluded that none of the 6 polymorphisms assessed individually or in combination are good markers of susceptibility to malignant oral tumors.

Based on the selected polymorphisms, we found no associations between allelic variants and susceptibility to OSCC and also with advanced stages of cancer. This can be explained by the polygenic model for tumor susceptibility that indicated that much of the inherited cancer susceptibility is due to multiple risk alleles, each with a low to moderate risk and that the number of alleles for any cancer is unknown, may be hundreds or thousands (28).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Hospital Erasto Gaertner, Hospital do Câncer de Londrina and Centro Odontológico Universitário Norte do Paraná, Hospital A.C Camargo (SP) and Faculdade de Medicina de Botucatu (SP), for providing samples, to SETI (PR Tecnologia), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq for financial support and for providing a grant to I.M.S. Cólus, S.R. Rogatto, I.J. Cavalli and for a Master's Scholarship to M.B. Reis.

REFERENCES

- 1-FALAGAN-LOTSCH P, RODRIGUES MS, ESTEVES V, et al. XRCC1 gene polymorphisms in a population sample and in women with a family history of breast cancer from Rio de Janeiro (Brazil). *Genet Mol Biol* 2009; 32: 255-259.
- 2-HUNG RJ, HALL J, BRENNAN P, BOFFETTA P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005; 162: 925-942.
- 3-MATULLO G, PALLI D, PELUSO M, et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and ³²P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis*; 22: 1437-1445, 2001.
- 4- DAS N, MAJUMDER J, DASGUPTA UB. ras Gene mutations in oral cancer in eastern India. *Oral Oncol* 2000; 36: 76-80.
- 5- Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em 27 março 2007.
- 6- SKJELBRED CF, SÆBØ M, WALLIN H, et al. Polymorphisms of the XRCC1, XRCC3 and XPD genes and risk of colorectal adenoma and carcinoma, in a Norwegian cohort: a case control study. *BMC Cancer* 2006; 6:67.
- 7- MAJUMDER M, SIKDAR N, PAUL RR, ROY B. Increased risk of oral leukoplakia and cancer among mixed tobacco users carrying XRCC1 variant haplotypes and cancer among smokers carrying two risk genotypes: one on each of two loci, GSTM3 and XRCC1 (Códon 280). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 25: 2106-2112.
- 8- SHEN MR, JONES IM, MOHRENWEISER H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* 1998; 58: 604-608.
- 9- RAMACHANDRAN S, RAMADAS K, HARIHARAN R, KUMAR RR, PILLAI MR. Single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XPD and its molecular mapping in Indian oral cancer. *Oral Oncol* 2006; 42: 350-362.
- 10- LIU N, LAMERDIN JE, TEBBS RS, et al. XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol Cell* 1998; 1: 783-793.
- 11- KANAAR R, HOEIJMAKERS JHJ, VAN GENT DC. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *trends CELL BIOLOGY* 1998; 8: 483-489.
- 12- SMITH TR, MILLER MS, LOHMAN K, et al. Polymorphisms of XRCC1 and XRCC3 genes and susceptibility to breast cancer. *Cancer Lett* 2003; 190: 183-190.

- 13- JACOBSEN NR, RAASCHOU-NIELSEN O, NEXO B, et al. XRCC3 polymorphisms and risk of lung cancer. *Cancer Lett* 2004; 213: 67-72.
- 14- KIETTHUBTHEW S, SRIPLUNG H, AU WW, ISHIDA T. Polymorphism in DNA repair genes and oral squamous cell carcinoma in Thailand. *Int J Hygiene Environment Health* 2006; 209: 21-29.
- 15- STURGIS EM, CASTILLO EJ, LI L, et al. Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 1999, 20: 2125-2129.
- 16- HU JJ, SMITH TR, MILLER MS, MOHRENWEISER HW, GOLDEN A, CASE LD. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis* 2001; 22: 917-922.
- 17- STURGIS EM, WEI Q, SPITZ MR. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol* 2004; 31: 726-733.
- 18- WERBROUCK J, DE RUYCK K, DUPREZ F, et al. Single-nucleotide polymorphisms in DNA double-strand break repair genes: Association with head and neck cancer and interaction with tobacco use and alcohol consumption. *Mutat Res* 2008; 656: 74–81.
- 19- ARRUDA VR, GRIGNOLLI CE, GONCALVES MS, SOARES MC, MENEZES R, SAAD ST, COSTA FF. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clin Genet* 1998; 54: 210–214.
- 20- AU, W.W.; OH, H.Y.; GRADY, J.; SALAMA, S.A.; HEO, M.Y. Usefulness of genetic susceptibility and biomarkers for evaluation of environmental health risk. *environmental and molecular. Mutagenesis*, 37, 215-225, 2001.
- 21- HUNG RJ, HALL J, BRENNAN P, BOFFETTA P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005; 162:925–942.
- 22- ATAIAN Y, KREBS JE. Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair. *Biochem Cell Biol* 2006; 84: 490–504.
- 23- YEN CY, LIU SY, CHEN CH, et al. Combinational polymorphisms of four DNA repair genes XRCC1, XRCC2, XRCC3, and XRCC4 and their association with oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 271–277.
- 24- HUANG WY, OLSHAN AF, SCHWARTZ SM, et al. Selected genetic polymorphisms in MGMT, XRCC1, XPD, and XRCC3 and risk of head and neck cancer: A Pooled Analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1747-1753.
- 25- SHEN H, STURGIS EM, DAHLSTROM KR, ZHENG Y, SPITZ MR, WEI Q. A variant of the DNA repair gene XRCC3 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. *Int J Cancer* 2002; 99: 869-872.

26- RAJU B, MEHROTRA R, OIJORDSBAKKEN G, AL-SHARABI AK, VASSTRAND EN, IBRAHIM SO. Expression of p53, cyclin D1 and Ki-67 in pre-malignant and malignant oral lesions: association with clinicopathological parameters. *Anticancer Res* 2005; 25: 4699-4706.

27- LOSI-GUEMBAROVSKI R, CÓLUS IM, DE MENEZES RP, et al. Lack of Association among Polymorphic Xenobiotic-Metabolizing Enzyme Genotypes and the Occurrence and Progression of Oral Carcinoma in a Brazilian Population. *Anticancer Res*. 2008; 28: 1023-1028.

28- PHAROAH PDP, DUNNING AM, PONDER BAJ, EASTON DF. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 850-860.

3.2 ARTIGO B – Expression of repair and apoptotsis genes in human oral squamous cell carcinoma cell lines treated with cisplatin drug

Expression of repair and apoptotsis genes in human oral squamous cell carcinoma cell lines treated with cisplatin drug

Mariana Bisarro dos Reis¹; Roberta Losi Guembarovski¹; Silvia Regina Rogatto², Ilce Mara de Syllos Cólus¹

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina (Londrina - PR - Brazil)

²Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Botucatu- SP- Brazil)

Abstract

The use of cisplatin in cancer chemotherapy is limited by acquired or intrinsic resistance of cells to the drug. *ERCC1* and *XPA* genes involved in NER (nucleotide excision repair) and *BAX* involved in response to apoptosis pathway has been related to an increase the resistance to cisplatin. The purpose of the present study was to evaluate the expression of these genes in a cell line of oral squamous cell carcinoma treated with cisplatin. The mRNA expression levels for the *ERCC1*, *XPA* and *BAX* genes were examined by Quantitative Real-time Reverse Transcription PCR. A statistically significant correlation was observed between the relative expression of *XPA* in cell treated with cisplatin, while we did not observe changes in the expression of repair gene *ERCC1* and of pro-apoptotic gene *BAX* in the cell line studied. These results suggest that *XPA* gene could confer a decreased sensitivity to cell line used in this study. However, data are preliminary and will be confirmed with further analyzes.

INTRODUCTION

Head and neck cancer is the sixth most common cancer worldwide (GIL and FLISS, 2009) and over the past few decades the five years survival associated with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) has significantly increased from less than 50% in the 1960s to approximately 70% at the present time (YAO *et al.*, 2007).

Cisplatin-based combination chemotherapy (*cis*-Diamminedichloroplatinum(II)) displays significant antitumor activity against testis, ovary and lung cancers (KARTALOU and ESSIGMANN, 2001) and presents an important role in multidisciplinary treatment of head and neck cancer (TAKEMURA *et al.*, 2005).

Although the survival of patients has increased, resistance to cisplatin, a commonly used chemotherapy drug in the treatment of HNSCC, has limited the efficacy of this agent. Resistance to platinum-based chemotherapy can be intrinsic or acquired and may be mediated by factors outside or within the cancer cell or at its cell membrane (MARTIN, HAMILTON, and SCHILDER, 2008).

Many studies showed several types of mechanisms of cisplatin resistance, such as increased efflux; drug inactivation by intracellular proteins such as glutathione; increased replication capacity even with DNA damage; increased rates of repair of adducts caused by cisplatin and defects in way of response to programmed cell death (STEWART, 2007; KARTALOU and ESSIGMANN, 2001; BRENES *et al.*, 2007).

Cisplatin, a bifunctional alkylators, can cause double-strand breaks, DNA crosslinks, bulky adducts and replication lesions (HELLEDAY *et al.*, 2008). The efficacy of anticancer drugs, as the cisplatin, is highly influenced by ability of cells repair these damages and whether cisplatin-DNA adducts may kill cells by induction of apoptosis.

Among the repair pathways, NER is the main mechanism for removing cisplatin adducts (FURUTA *et al.*, 2002) and the *ERCC* and *XP* genes appears to be involved in recognition and excision of these lesions. In the NER pathway, *XPA* protein stabilizes the open segment around the damage during the process (FURUTA *et al.*, 2002) and *ERCC1* forms a heterodimer with the Xeroderma Pigmentosum group F (*XPF*) protein and excises the nucleotide segment containing the adducts in coordination with *XPG* protein (SHIMIZU *et al.*, 2008).

Regarding to the apoptotic events induced by clinical drugs used, alterations in the expression of regulators of apoptosis can alter the sensitivity of the cells

to apoptosis following cisplatin treatment (KARTALOU and ESSIGMANN, 2001). Apoptosis is a form of physiological cell death mediated by caspases (KAUFMANN and VAUX, 2003) and these are controlled by Bcl-2 family members (CORY and ADAMS, 2002), including, *BAX* and *BCL-2* genes. The *BAX* gene is a proapoptotic family member and facilitate opening of the voltage dependent ion channel in the mitochondrial membrane (SHIMIZU *et al.*, 1999).

In the present study, we examined the mRNA levels of *XPA* and *ERCC1* genes involved in the NER and *BAX* genes involved in apoptosis, once the differential expression of these in the presence of cisplatin could affect sensitivity to the drug. Thus a better understanding of these mechanisms may contribute to the elucidation of the processes that culminate with the resistance to chemotherapy in some patients.

MATERIAL AND METHODS

CELL LINE

The cell line used [SCC-25 (CRL-1628)] was established from primary tongue carcinoma of male patients with 70 years (ATCC, USA) and was provided to our laboratory by Prof. Dr. Edgad Graner (ESALQ-USP).

CYTOTOXICITY

The cytotoxicity of cisplatin was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay as described previously by Mosmann (1983). In brief, cells were seeded in 96-well plates at a density of 1×10^4 cells/well (200 μ l/well) for 24h before use. The culture medium was replaced by fresh medium containing different concentrations of cisplatin (Bergamo®) ranging from 0 μ M to 0,1 μ M for 24 h. Water-soluble tetrazolium MTT (Invitrogen, USA) was added (0,5 mg/mL). After 4 h incubation, the supernatant was discarded and the purple crystals were re-suspended in 200 μ L of DMSO. After 10 minutes the analysis was performed in spectrophotometer (Uniscience) at 550 nm. The cellular viability was calculated as the ratio of the absorbance of the experimental well to that of a blank well.

CULTURE CONDITIONS

Cell line was cultured in 25cm² polyethylene flasks in DMEM/F-12 (Invitrogen, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO- Brazil), 400 ng/mL hydrocortisone (hydrocortisone sodium succinate) and 100 µg/mL kanamycin (kanamycin sulfate- GIBCO) at 37°C in atmosphere containing 5% CO₂ and 95% humidity. The culture medium was changed every 48 hours.

After the test of cytotoxicity, 3x10⁶ cells were seeded and after 48h of stabilization, the cells were treated with 0,01µM cisplatin for 24 h. The treatments were performed in duplicate.

RNA PREPARATION AND REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION

Total RNA was isolated from cell line without treatment as a control and after treatment with the chemotherapeutic agent, using PureLink™ RNA Mini Kit. The kit included a DNase treatment step. Thereafter, 1µg of total RNA was reverse transcribed (RT) using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol.

REAL TIME PCR

PCR was carried out by SYBER Green method and was performed using a Chromo4 Detection System (MJ Research). The primers were designed by Gene Runner program and their sequences are shown in Table 1.

The Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UGD (Invitrogen) was used as the reaction mixture with 10pmol of each primer and 2µL of template cDNA in final volume of 20µL. The real-time PCR conditions were: an initial step at 95°C for 5 min, and 40 cycles at 95°C for 20 sec, 60°C for 15 sec and 72°C for 20 sec, followed by 95°C for 10 sec and 40°C for 1 min. A melting curve analysis was performed at the end of the experiment to check for primer-dimer artifacts and contamination.

All experiments were performed with two independent cultures for control, treated cells and each cDNA was analyzed in two technical replicates for each gene studied.

Table 1 – List of primers used in the study

Gene	Primer	Anneling Temperature (°C)
<i>BAX</i>	F:GATGATTGCCGCCGTGGAC	60
<i>BAX</i>	R:GCCTTGAGCACCAGTTTG	60
<i>ERCC1</i>	F:CGAGGAAGCTGGGCGGTA	60
<i>ERCC1</i>	R:CAAATGTGGTCAGGAGGGTC	60
<i>XPA</i>	F:GGGTAGAGGGAAAAGGGTT	60
<i>XPA</i>	R:CATCGTGGAGACAGAAATCG	60
<i>GAPDH</i>	F:GGGCATCCTGGGCTACTACT	60
<i>GAPDH</i>	R:GGTCCAGGGGTCTTACTC	60

STATISCAL ANALYSIS

The Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) was used to evaluate the cytotoxicity of cisplatin to the line SCC25.

To quantify changes in gene expression, the Pfaffl method (Figure 1) (Pfaffl, 2001) was used to calculate the relative fold changes, normalized against *GAPDH* (glyceraldehydes-3-phosphate-dehydrogenase) gene.

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{Ct target (control-treated)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct ref (control-treated)}}}$$

Figure 1 – Matemathical model of relative expression ratio in Real Time PCR.

Where:

E_{target} is the real time efficiency of target gene transcript

E_{ref} is the real time efficiency of reference gene transcript

ΔCP_{target} is the crossing point deviation of control – sample of target gene transcript

ΔCP_{ref} is the crossing point deviation of control – sample of reference gene transcript

RESULTS

Cytotoxicity Induced by Cisplatin in SCC25 Cell Line

The data for the cytotoxicity evaluation of cisplatin in the SCC25 cell line are shown in Figure 2. Concentrations higher than 0.03 μM of cisplatin reduced mitochondrial activity when compared with the control group, indicating cytotoxicity. From this evaluation the concentration of 0.01 μM was determined for use in the treatment of SCC25 cell line for 24 hours.

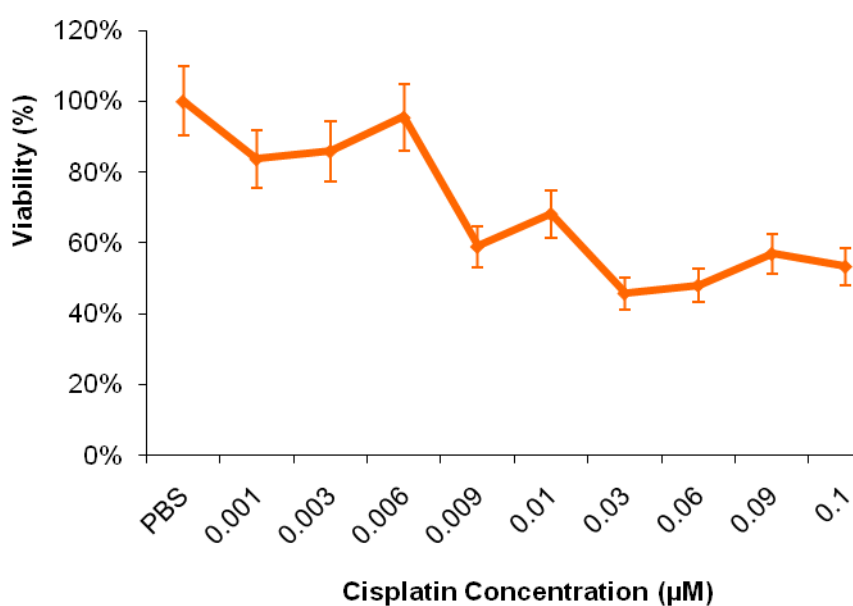


Figure 2 – Cytotoxicity of SCC25 cells induced by cisplatin. After 24 h of treatment with the drug, MTT activity was read at 550 nm and values were expressed as viability percentage.

Relative Quantification of ERCC1, XPA and BAX Transcript Expression in SCC25 Cell Line.

We examined the mRNA expression levels of genes previously highlighted as important in cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma.

Treatment with cisplatin for 24h did not induce changes in the expression of repair gene *ERCC1* and of pro-apoptotic gene *BAX* in the cell line studied (Figure 3). A significant difference was observed between control and treated cell in relation to repair gene *XPA* (Figure 3).

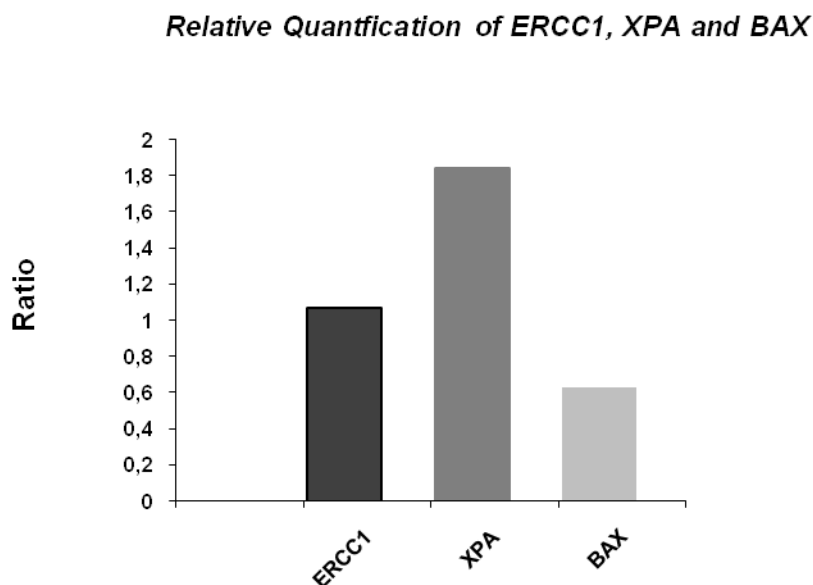


Figure 3 – Results of relative quantification of repair genes *ERCC1* and *XPA* and pro-apoptotic gene *BAX*.

DISCUSSION

Cisplatin is a commonly used chemotherapeutic agent in the treatment of various tumors, however there is a limitation in the successful treatment with platinum drugs, since the cancer cells may be resistant or acquire drug resistance (KARTALOU and ESSIGMANN, 2001).

It is well known that cisplatin cytotoxicity is attributed to the formation of various DNA adducts that trigger a cellular response culminating in apoptosis (ZHANG *et al.*, 2006) and that DNA repair and apoptosis pathway have a significant role in the modulating of this cytotoxicity (WANG and LIPPARD, 2005), being considered mechanisms of resistance to cisplatin.

In the present study, real-time quantitative RT-PCR was used to quantify the mRNA expression of *ERRC1*, *XPA* and *BAX* genes in response to treatment of SCC25 cells for 24h with cisplatin. All the three genes showed expression, however there was no difference in expression of genes in cells treated with the drug from those used as control.

Increased expression of *ERCC1* gene has been linked to chemotherapy resistance in several cancers such as ovarian cancer, where a 3-fold higher expression of *ERCC1* was correlated with cisplatin resistance *in vitro* (FERRY *et al.*, 2000) and cervical cancer (BRITTEN *et al.*, 2000). In a study realized with squamous cell carcinoma of the head and neck patients treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation, the low expression of *ERRC1* was a factor associated with lower risk of cancer death (JUN *et al.*, 2008), in agreement with the fact that a high expression of this gene could lead to a small tumor response to treatment.

Our results show that repair gene *ERCC1* appears not be activated to repair the damage caused by cisplatin for 24 hours, since there was no difference in expression between the treated and control groups. However the expression of the *XPA* gene, indicated an enhanced activation. This type of activation of NER factors, has been proposed to account for cisplatin resistance (KARTALOU and ESSIGMANN, 2001). Some studies have shown an increase in the expression of this gene in non-small cell lung cancer cell lines (WEAVER *et al.*, 2005) and that *XPA* downregulation sensitised DU145 cells (prostate cancer cell lines) to cisplatin (CUMMINGS *et al.*, 2006). However in a study with metastatic ovarian carcinoma, Stevens *et al.* (2005) found that *XPA* increased expression was associated with better response to chemotherapy and predicted better progression-free survival and overall survival of patients.

Faced with conflicting results in the literature, the genic expression data obtained in this study for the *XPA* gene does not allow a final conclusion, because the average obtained for the ratio of gene expression of treated and control groups was 1.839. When it is subtracted the baseline 1.0, the *XPA* gene was 0.83-fold more expressed in the cells treated with cisplatin than control cells.

Although cisplatin-DNA adducts are removed primarily by the NER pathway *in vitro* and *in vivo* (WANG *et al.*, 2003), other pathways are able to remove the damage caused by cisplatin, as Homologous Recombination Repair (HR), Fanconi Anemia (FA) repair pathway and endonuclease-mediated repair (HELLEDAY *et al.*, 2008). The fact that the cell line SCC25 did not show a change in the expression of 2 repair genes

analyzed may be due to the fact that this cell line is sensitive to chemotherapy or have other repair pathways that could be activated to remove the damage caused by cisplatin.

We also studied *BAX* gene in oral squamous cell carcinoma cell line and no significant expression was observed for this gene, suggesting that in the conditions studied, this pathway was not activated. An explanation could be that the cisplatin concentration used was not sufficient to induce apoptosis, since it was chosen from the cell viability test. In a study with oral SCC cell lines, Takemura *et al.* (2005) found a decrease in the number of viable cells in cell lines in which Bax protein expression was enhanced after treatment with cisplatin.

The cell line used in this study was obtained from a primary tumor and during the experiment received only one dose of cisplatin for 24 hours. Several studies on resistance to chemotherapy have been published using resistant cell lines generated in the laboratory after prolonged exposure (around 2 years) to anti-cancer drugs (NICOLANTONIO *et al.*, 2005). Although these studies can show changes in expression of some genes, this may not be similar to what happens in clinical treatment, when patients are exposed to one cycle of chemotherapy to each 3-4 weeks.

Due to the complex nature of the NER and apoptosis process, the molecular basis for the increased platinum–DNA adduct repair capacity and changes that lead to altered response to cell death, many studies still are necessary to define predictive tools for chemotherapy in oral SCC.

However, the elucidation of the activity of genes responsible for DNA repair and apoptosis pathway gene expression, as well as other means of resistance to drugs, could provide insight into strategies to control the resistance to quimioterapeutic in human cancers.

REFERENCES

- BAUER, J.A.; TRASK, D.K.; KUMAR, B.; LOS, G.; CASTRO, A.; LEE, J.S.J.; CHEN, J.; WANG, S.; BRADFORD, C.R.; CAREY, T.E. Reversal of cisplatin resistance with a BH3 mimetic, (-)-gossypol, in head and neck cancer cells: role of wild-type p53 and Bcl-xL. **Molecular Cancer Therapeutics**, 4, 7, 1096-104, 2005.
- BRENES, O.; ARCE, F.; GÄTJENS-BONICHE, O.; DÍAZ, C. Characterization of cell death events induced by anti-neoplastic drugs cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil on human hepatoma cell lines: Possible mechanisms of cell resistance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 61, 6, 347-55, 2007.
- BRITTEN, R.A.; LIU, D.; TESSIER, A.; HUTCHISON, M.J.; MURRAY, D. ERCC1 expression as a molecular marker of cisplatin resistance in human cervical tumor cells. **Int J Cancer**, 89, 5, 453-457, 2000.
- CORY, S.; ADAMS, J.M. The BCL2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews**, 2, 647-656, 2002.
- CUMMINGS, M.; HIGGINBOTTOM, K.; MCGURK, C.J.; WONG, O.G.; KOBERLE, B.; OLIVER, R.T.D.; MASTERS, J.R. XPA versus ERCC1 as chemosensitising agents to cisplatin and mitomycin C in prostate cancer cells: Role of ERCC1 in homologous recombination repair. **Biochemical Pharmacology**, 72, 166 – 175, 2006.
- FERRY, K.V.; HAMILTON, T.C.; JOHNSON, S.W. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF. **Biochemical Pharmacology**, 60, 9, 1305-13, 2000.
- FURUTA, T.; UEDA, T.; AUNE, G.; SARASIN, A.; KRAEMER, K.H.; POMMIER, Y. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. **Cancer Research**, 62, 4899–4902, 2002.
- GIL, Z.; FLISS, D.M. Contemporary management of head and neck cancers. **Israel Medical Association Journal**, 11, 5, 296-300, 2009.
- HELLEDAY, T.; PETERMANN, E.; LUNDIN, C.; HODGSON, B.; SHARMA, R.A. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, 8, 3, 193-204, 2008.
- JUN, H.J.; AHN, M.J.; KIM, H.S.; YI, S.Y.; HAN, J.; LEE, S.K.; AHN, Y.C.; JEONG, H.S.; SON, Y.I.; BAEK, J.H.; PARK, K. ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation. **British Journal of Cancer**, 99, 167 – 172, 2008.
- KAUFMANN, S.H.; VAUX, D.L. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. **Oncogene**, 22, 7414–7430, 2003.
- KARTALOU, M.; ESSIGMANN, J.M. Mechanisms of resistance to cisplatin. **Mutation Research**, 478, 1-2, 23-43, 2001.

MARTIN, L. P.; HAMILTON, T.C.; SCHILDER, R.J. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. **Clinical Cancer Research**, 14, 5, 1291-1295, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, 55-63, 1983.

NICOLANTONIO, F.; MERCER, S.J.; KNIGHT, L.A.; GABRIEL, F.G.; WHITEHOUSE, P.A.; SHARMA, S.; FERNANDO, A.; GLAYSHER, S.; DI PALMA, S.; JOHNSON, P.; SOMERS, S.S.; TOH, S.; HIGGINS, B.; LAMONT, A.; GULLIFORD, T.; HURREN, J.; YANGOU, C.; CREE, I.A. Cancer cell adaptation to chemotherapy. **BMC Cancer**, 5, 78, 2005.

PFAFFI, M.W. A new mathematical model for relative quantification in Real Time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, 29, 9, 2002-1007, 2001.

SHIMIZU, J.; HORIO, Y.; OSADA, H.; HIDA, T.; HASEGAWA, Y.; SHIMOKATA, K.; TAKAHASHI, T.; SEKIDO, Y.; YATABE, Y. mRNA expression of *RRM1*, *ERCC1* and *ERCC2* is not associated with chemosensitivity to cisplatin, carboplatin and gemcitabine in human lung cancer cell lines. **Respirology**, 13, 510-517, 2008.

SHIMIZU, S.; NARITA, M.; TSUJIMOTO, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. **Nature**, 399, 483-487, 1999.

STEVENS, E. V.; RAFFELD, M.; ESPINA, V.; KRISTENSEN, G.B.; TROPE, C.G.; KOHN, E.C.; DAVIDSON, B. Expression of Xeroderma Pigmentosum A Protein predicts improved outcome in metastatic ovarian carcinoma. **Cancer**, 103, 11, 2313-2319, 2005.

STEWART, D.J. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, 63, 1, 12-31, 2007.

TAKEMURA, K.; NOGUCHI, M.; OGI, K.; TOKINO, T.; KUBOTA, H.; MIYAZAKI, A.; KOHAMA, G.; HIRATSUKA, H. Enhanced Bax in oral SCC in relation to antitumor effects of chemotherapy. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 34, 93-99, 2005.

WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs. **Nature Reviews**, 4, 307 - 320, 2005.

WANG, Y.; SPITZ, M.R.; ZHU, Y.; DONG, Q.; SHETE, S.; WU X. From genotype to phenotype: correlating *XRCC1* polymorphisms with mutagen sensitivity. **DNA Repair**, 2, 901-908, 2003.

WEAVER, D.A.; CRAWFORD, E.L.; WARNER, K.A.; ELKHAIRI, F.; KHUDER, S.A.; WILLEY, J.C. *ABCC5*, *ERCC2*, *XPA* and *XRCC1* transcript abundance levels correlate with cisplatin chemoresistance in non-small cell lung cancer cell lines. **Molecular Cancer**, 4, 1, 18, 2005.

ZHANG , P.; ZHANG, Z.; ZHOU, X.; QIU, W.; CHEN, F.; CHEN, W. Identification of genes associated with cisplatin resistance in human oral squamous cell carcinoma cell line. **BMC Cancer**, 6, 224, 2006.

YAO, M.; EPSTEIN, J.B.; MODI, B.J.; PYTYNIA, K.B.; MUNDT, A.J.; FELDMAN, L.E. Current surgical treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncology**, 43, 3, 213-23, 2007.

4 CONCLUSÕES

1. As três variantes alélicas de genes do reparo de DNA estudadas não mostraram associação significativa quando analisadas separadamente ou de maneira combinada em relação ao câncer oral.

2. A análise das mesmas variantes em relação aos dados histopatológicos dos pacientes também não mostrou diferença estatisticamente significativa, o que nos leva a concluir que os genótipos em questão não influenciam no desenvolvimento e nem na progressão dos tumores malignos da boca.

3. O estudo da expressão de genes relacionados com a resistência à cisplatina mostrou que apenas o gene *XPA* apresentou um pequeno aumento de expressão, indicando que o tratamento com o quimioterápico para essa linhagem celular pode conferir um aumento de resistência à morte das células tumorais; entretanto, não foi observado aumento de expressão do gene *ERCCI* que atua na mesma via de reparo do gene *XPA* e do gene pró- apoptótico *BAX*.

4. A investigação da expressão dos genes de reparo *XPA*, *ERCCI*, e do gene de controle de apoptose *BAX* em células tumorais tratadas com cisplatina permitiu implantar a técnica de extração de RNA e PCR em Tempo Real no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J.M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. **Genes & Development**, 17, 2481–2495, 2003.
- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2-regulated apoptosis switch: mechanism and therapeutic potential. **Current Opinion in Immunology**, 19, 5, 488–496, 2007.
- AGARWAL, S.; TAFEL, A.A.; KANAAR, R. DNA double-strand break repair and chromosome translocations. **DNA Repair**, 5, 1075–1081, 2006.
- AGNEZ-LIMA, L. F.; MEDEIROS, S.R.B.; MAGGI, B.S. Base excision repair in sugarcane. **Genetic Molecular Biology**, 24, 1-4, 123-129, 2001.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Mecanismos Genéticos Básicos. In: ____ **Biologia Molecular da Célula**. 3ª edição. Porto Alegre, 1997. 223-290.
- ALBERTS, A.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of The Cell**, 4ª edição. Garland Science, New York, 2002.
- ARGIRIS, A.; KARAMOUZIS, M.V.; RABEN, D.; FERRIS, R.L. Head and neck cancer. **Lancet**, 17, 371, 1695-709, 2008.
- ARRUDA, V.R.; GRIGNOLLI, C.E.; GONCALVES, M.S.; SOARES, M.C.; MENEZES, R.; SAAD, S.T.; COSTA, .FF. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? **Clinical Genetics**, 54, 210–214, 1998.
- ATAIAN, Y.; KREBS, J.E. Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair. **Biochemistry and Cell Biology**, 84, 490–504, 2006.
- AU, W.W.; OH, H.Y.; GRADY, J.; SALAMA, S.A.; HEO, M.Y. Usefulness of Genetic Susceptibility and Biomarkers for Evaluation of Environmental Health Risk. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 37, 215-225, 2001.
- BARTSCH, H.; NAIR, U.; RISCH, A.; ROJAS, M.; WIKMAN, H.; ALEXANDROV, K. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**. 9, 3-28, 2000.
- BENHAMOU, S.; SARASIN, A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. **Mutation Research**, 462, 149-158, 2000.

BORK, P.; HOFMANN, K.; BUCHER, P.; NEUWALD, A.F.; ALTSCHUL, S.F.; KOONIN, E.V. A superfamily of conserved domains in DNA damage- responsive cell cycle checkpoint proteins. **The FAESB Journal**, 11, 68-76, 1997.

BOYLE, P.; MACFARLANE, G.J.; ZHENG, T.; MAISONNEUVE, P.; EVSTIFEEVA, T.; SCULLY, C. Recent advances in epidemiology of head and neck cancer. **Current Opinion in Oncology**, 4, 471-477, 1992.

BRAAKHUIS, B.J.; BRAKENHOFF, R.H.; LEEMANS, C.R. Head and neck cancer: molecular carcinogenesis. **Annals of Oncology**, 2, 249-50, 2005.

BRENES, O.; ARCE, F.; GÄTJENS-BONICHE, O.; DÍAZ, C. Characterization of cell death events induced by anti-neoplastic drugs cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil on human hepatoma cell lines: Possible mechanisms of cell resistance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 61,6, 347-55, 2007.

BRENNEMAN, M.A.; WEISS, A.E.; NICKOLOFF, J.A.; CHEN, D.J. XRCC3 is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination. **Mutation Research**, 459, 89-97, 2000.

BRITTEN, R.A.; LIU, D.; TESSIER, A.; HUTCHISON, M.J.; MURRAY, D. ERCC1 expression as a molecular marker of cisplatin resistance in human cervical tumor cells. **International Journal of Cancer**, 89, 5, 453-457, 2000.

CALDECOTT, K.W.; AOUFUCHI, S.; JOHNSON, P.; SHALL, S. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase β and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. **Nucleic Acids Research**, 24, 22, 4387-4394, 1996.

CALDECOTT, K.W. XRCC1 and DNA strand break repair. **DNA Repair**, 2, 955-969, 2003.

CALIFANO, J.; VAN DER RIET, P.; WESTRA, W.; NAWROZ, H.; CLAYMAN, G.; PIANTADOSI, S.; CORIO, R.; LEE, D.; GREENBERG, B.; KOCH, W.; SIDRANSKY, D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer Research**, 56, 2488-2492, 1996.

CAMARGO, A.A.; NETO, E.D. E SIMPSON, A.J.G. Mutação e câncer. In: **Genética e Biologia Molecular para o Cirurgião**, 1^a. edição; Rossi, B.M. e Pinho, M. (eds.), Lemar – Livraria e Editora Marina, Brasil, 111-123, 1999.

CHRISTMANN, M.; TOMICIC, M.T.; ROOS, W.P.; KAINA, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**, 193, 3-34, 2003.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The BCL2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews**, 2, 647-656, 2002.

CUMMINGS, M.; HIGGINBOTTOM, K.; MCGURK, C.J.; WONG, O.G.; KOBERLE, B.; OLIVER, R.T.D.; MASTERS, J.R. XPA versus ERCC1 as chemosensitising agents to

cisplatin and mitomycin C in prostate cancer cells: Role of ERCC1 in homologous recombination repair. **Biochemical Pharmacology**, 72, 166 – 175, 2006.

DABHOLKAR, M.; VIONNET, J.; BOSTICK-BRUTON, F.; YU, J.J.; REED, E. Messenger RNA levels of *XPAC* and *ERCC1* in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. **The Journal of Clinical Investigation**, 94(2), 703-8, 1994.

DAMIA G, GUIDI G, D'INCALCI M. Expression of genes involved in nucleotide excision repair and sensitivity to cisplatin and melphalan in human cancer cell lines. **European Journal of Cancer**, 34,11,1783-8, 1998.

DAS, N.; MAJUMDER, J.; DASGUPTA, U.B. ras Gene mutations in oral cancer in eastern India. **Oral Oncology**, 36, 76-80. 2000

DE HERDT, M.J.; BAATENBURG DE JONG, R.J. HGF and c-MET as potential orchestrators of invasive growth in head and neck squamous cell carcinoma. **Frontiers in Bioscience**, 1; 13, 2516-26, 2008.

DE RUYCK, K.; SZAUMKESSEL, M.; DE RUDDER,I.; DEHOORNE, A.; VRAL , A.; CLAES, K.; VELGHE, A.; VAN MEERBEECK, J.; THIERENS, R. Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk. **Mutation Research**, 631, 101–110, 2007.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal of the National Cancer Institute**, 66, 1191-1308, 1981 Apud HATAGIMA, A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 18, 357-377, 2002.

DUELL, E.J.; WIENCKE, J.K.; CHENG, T.J.; VARKONYI, A.; ZUO, Z.F.; ASHOK, T.D.S.; MARK, E.J.; WAIN, J.C.; CHRISTIANI, D.C.; KELSEY, K.T. Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. **Carcinogenesis**, 21, 965-971, 2000.

EASTMAN, A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. **Cancer Cells**, 2, 8-9, 275-80, 1990.

FALAGAN-LOTSCH, P.; RODRIGUES, M.S.; ESTEVES, V.; VIEIRA, R.; AMENDOLA, L.C.; PAGNONCELLI, D.; PAIXÃO, J.C; GALLO, C.V.M. XRCC1 gene polymorphisms in a population sample and in women with a family history of breast cancer from Rio de Janeiro (Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, 32, 255-259, 2009.

FERGUSON, L.R.; PEARSON, A.E. The clinical use of mutagenic anticancer drugs. **Mutation Research**, 355, 1-12, 1996.

FERRY, K.V.; HAMILTON, T.C.; JOHNSON, S.W. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of *ERCC1-XPF*. **Biochemical Pharmacology**, 60, 9, 1305-13, 2000.

FIELD, J.K. The role of oncogenes and tumor-suppressor genes in the aetiology of oral, head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of the Royal Society of Medicine**, 88, 35-39, 1995.

FORASTIERE, A.; KOCH, W.; TROTTI, A.; SIDRANSKY, D. Head and Neck Cancer. **The New England Journal of Medicine**, 345, 26, 1890-1900; 2001.

FRANCESCHI, S.; TALAMINI, R.; BARRA, S.; BARÓN, A.E.; NEGRI, E.; BIDOLI, E.; SERRAINO, D.; LA VECCHIA, C. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. **Cancer Research**, 50, 6502-6507, 1990.

FURUTA, T.; UEDA, T.; AUNE, G.; SARASIN, A.; KRAEMER, K.H.; POMMIER, Y. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. **Cancer Research**, 62, 4899–4902, 2002.

GIL, Z.; FLISS, D.M. Contemporary management of head and neck cancers. **Israel Medical Association Journal**, 11, 5, 296-300, 2009.

GOODE, E.L.; ULRICH, C.M.; POTTER J.D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, 11, 1513-1530, 2002.

GOSSAGE, L.; MADHUSUDAN, S. Current status of excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in cancer. **Cancer Treatment Reviews**, 33, 565– 577, 2007.

HADDAD, R.I.; SHIN, D.M. Recent advances in head and neck cancer. **The New England Journal of Medicine**. 359, 11, 1143-54, 2008

HAN, J.; HANKINSON, S.E.; DEVIVO, I.; SPIEGELMAN, D.; TAMIMI, R.M.; MOHRENWEISER, H.W.; COLDITZ, G.A.; HUNTER, D.J. A prospective study of *XRCC1* haplotypes and their interaction with plasma carotenoids on breast cancer risk. **Cancer Research**, 63, 8536-8541, 2003.

HARDISSON, D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. **European Archives of Otorhinolaryngology**, 260, 502-508, 2003.

HARRIS, C.C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. **Cancer Research**, 51, 5023-5044, 1991.

HELLEDAY, T.; PETERMANN, E.; LUNDIN, C.; HODGSON, B.; SHARMA, R.A. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, 8, 3, 193-204, 2008.

HUANG, W.Y.; OLSHAN, A.F.; SCHWARTZ, S.M.; BERNDT, S.I.; CHEN, C.; LLACA, V.; CHANOCK, S.J.; FRAUMENI, J.F.; HAYES, R.B.. Selected genetic polymorphisms in *MGMT*, *XRCC1*, *XPD*, and *XRCC3* and risk of head and neck cancer: A

Pooled Analysis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 14, 1747-1753, 2005.

HU, J.J.; SMITH, T.R.; MILLER, M.S.; MOHRENWEISER, H.W.; GOLDEN, A.; CASE, L.D. Amino acid substitution variants of *APE1* and *XRCC1* genes associated with ionizing radiation sensitivity. **Carcinogenesis**, 22,6, 917-922, 2001.

HUNG, R.J.; HALL, J.; BRENNAN, P.; BOFFETTA, P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: A HuGE review. **American Journal of Epidemiology**, 162, 10, 925–942, 2005.

Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em 27 março 2007.

ITO, H.; MATSUO, K.; HAMAJIMA, N.; MITSUDOMI, T.; SUGIURA, T.; SAITO, T.; YASUE, T.; LEE, K.M.; KANG, D.; YOO, K.Y.; SATO, S.; UEDA, R.; TAJIMA, K. Gene-environment interactions between the smoking habit and polymorphisms in the DNA repair genes, *APE1* Asp148Glu and *XRCC1* Arg399Gln, in Japanese lung cancer risk. **Carcinogenesis**, 25(8),1395-401, 2004.

JACOBSEN, N.R.; RAASCHOU-NIELSEN, O.; NEXO, B.; WALLIN, H.; OVERVAD, K.; TJONNELAND, A.; VOGEL, U. *XRCC3* polymorphisms and risk of lung cancer. **Cancer Letters**, 213, 1, 67-72, 2004.

JENSEN, K.; JENSEN, A.B.; GRAU, C. Smoking has a negative impact upon health related quality of life after treatment for head and neck cancer. **Oral Oncology**, 43, 187-192, 2007.

JOSHI, M.B.M.; SHIROTA, Y.; DANENBERG, K.D.; CONLON, D. H.; SALONGA, D.S.; HERNDON II, J.E.; DANENBERG, P.V.; HARPOLE JR, D.H.. High gene expression of *TS1*, *GSTP1*, and *ERCC1* are risk factors for survival in patients treated with trimodality therapy for esophageal cancer. **Clinical Cancer Research**, 11, 2215–2221, 2005.

JUN, H.J.; AHN, M.J.; KIM, H.S.; YI, S.Y.; HAN, J.; LEE, S.K.; AHN, Y.C.; JEONG, H.S.; SON, Y.I.; BAEK, J.H.; PARK, K. *ERCC1* expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation. **British Journal of Cancer**, 99, 167 – 172, 2008.

KANAAR, R.; HOEIJMAKERS, J.H.J.; VAN GENT, D.C. Molecular Mechanisms of DNA double strand break repair. **trends in CELL BIOLOGY**, 8, 483-489,1998.

KARRAN, P. DNA double strand break repair in mammalian cells. **Current Opinion in Genetics & Development**, 10, 144–150, 2000.

KARTALOU, M.; ESSIGMANN, J.M. Mechanisms of resistance to cisplatin. **Mutation Research**, 478(1-2), 23-43, 2001.

KAUFMANN, S.H.; EARNSHAW, W.C. Induction of Apoptosis by Cancer. **Chemotherapy Experimental Cell Research**, **256**, 42–49, 2000.

KAUFMANN, S.H.; VAUX, D.L. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. **Oncogene**, **22**, 7414–7430, 2003.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews**, **7**, 573-584, 2007.

KIETTHUBTHEW, S.; SRIPLUNG, H.; AU, W.W.; ISHIDA, T. Polymorphism in DNA repair genes and oral squamous cell carcinoma in Thailand. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, **209**, 21-29, 2006.

KNUDSON, A.G. Hereditary cancer, oncogenes and anti-oncogenes. **Cancer Research**, **45**, 1437-1443, 1985 apud FIELD, J.K. The role of oncogenes and tumor-suppressor genes in the aetiology of oral, head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of the Royal Society of Medicine**, **88**, 35-39, 1995.

KRWAWICZ, J.; ARCZEWSKA, K.D.; SPEINA, E.; MACIEJEWSKA, A.; GRZESIUK, E. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. **Acta Biochimica Polonica**, **54**, 3, 413-34, 2007.

KUBOTA, Y.; NASH, R.A.; KLUNGLAND, A.; SCHAR, P; BARNES, D.E.; LINDAHL, T. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase and the XRCC1 protein. **The EMBO Journal**, **15**, 23 6662-6670, 1996.

LAMERDIN, J.; MONTEGOMERY, M.; STILWAGEN, S.; SCHEIDECKER, L.; TEBBS, R.; BROOKMAN, K.; THOMPSON, L.; CARRANO, A. Genomic sequence comparison of the human and mouse XRCC1 DNA repair gene regions. **Genomics**, **25**, 547-554, 1995.

LINDAHL, T.; WOOD, R.D. Quality control by DNA repair. **Science**, **286**, 1987- 1905, 1999.

LIPPMAN, S.M.; HONG, W.K. Molecular markers of the risk of oral cancer. **New England Journal of Medicine**, **344**, 1323-1326, 2001.

LIPPMAN, S.M.; SUDBO, J.; HONG, W.K. Oral cancer prevention and the evolution of molecular-targeted drug development. **Journal of Clinical Oncology**, **23**, 346-356, 2005.

LIU, N.; LAMERDIN, J.E.; TEBBS, R.S.; SCHILD, D.; TUCKER, J.D.; SHEN, M.R.; BROOKMAN, K.W.; SICILIANO, M.J.; WALTER, C.A.; FAN, W.; NARAYANA, L.S.; ZHOU, Z.; ADAMSON, A.W.; SORENSEN, K.J.; CHEN, D.J.; JONES, N.J.; THOMPSON, L.H. XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-Family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. **Molecular Cell**, **1**, 783–793, 1998.

LIU, X.; CHEN, Z.; YU, J.; XIA, J.; ZHOU, X. MicroRNA profiling and head and neck cancer. **Comparative and Functional Genomics**, 1-11, 2009.

LOSI-GUEMBAROVSKI, R.; CÓLUS, I.M.S.; DE MENEZES, R.P.; POLISELI, F.; CHAVES, V.N.; KUASNE, H.; LEICHSENRING, A.; GUEMBAROVSKI, A.L.; OLIVEIRA, B.W.; RAMOS, G.; CAVALCANTI, T.C.; MIZUNO, L.T.; CAVALLI, I.J.; RIBEIRO, E.M. Lack of Association among Polymorphic Xenobiotic-Metabolizing Enzyme Genotypes and the Occurrence and Progression of Oral Carcinoma in a Brazilian Population. **Anticancer Research**, 28, 1023-1028, 2008.

LOURO, I.D. Oncogenética - Parte 1 **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, 11, 2000.

LUNN, R.M.; LANGLOIS, R.G.; HSIEH, L.L.; THOMPSON, C.L.; BELL, D.A. XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. **Cancer Research**, 59, 2557-2561, 1999.

MAJUMDER, M.; SIKDAR, N.; PAUL, R.R.; ROY, B. Increased risk of oral leukoplakia and cancer among mixed tobacco users carrying XRCC1 variant haplotypes and cancer among smokers carrying two risk genotypes: one on each of two loci, *GSTM3* and *XRCC1* (Códon 280). **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, 25, 2106-2112, 2005.

MANUGUERRA, M.; SALETTA, F.; KARAGAS, M.R.; BERWICK, M.; VEGLIA, F.; VINEIS, P.; MATULLO, G. *XRCC3* and *XPB/ERCC2* Single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: A HuGE review. **American Journal of Epidemiology**, 164, 4, 297-303, 2006.

MARTIN, L. P.; HAMILTON, T.C.; SCHILDER, R.J. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. **Clinical Cancer Research**, 14, 5, 1291-1295, 2008.

MATULLO, G.; PALLI, D.; PELUSO, M.; GUARRERA, S.; CARTURAN, S.; CELENTANO, E.; KROGH, V.; MUNNIA, A.; TUMINO, R.; POLIDORO, S.; PIAZZA, A.; VIENEIS, P. *XRCC1*, *XRCC3*, *XPB* gene polymorphisms, smoking and ³²P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. **Carcinogenesis**, 22(9), 1437-1445, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, 55-63, 1983.

MURRAY, D.; ROSENBERG, E. The importance of the *ERCC1/ERCC4[XPF]* complex for hypoxic-cell radioresistance does not appear to derive from its participation in the nucleotide excision repair pathway. **Mutation Research**, 364(3), 217-26, 1996.

NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov

NICOLANTONIO, F.; MERCER, S.J.; KNIGHT, L.A.; GABRIEL, F.G.; WHITEHOUSE, P.A.; SHARMA, S.; FERNANDO, A.; GLAYSHER, S.; DI PALMA, S.; JOHNSON, P.; SOMERS, S.S.; TOH, S.; HIGGINS, B.; LAMONT, A.; GULLIFORD, T.; HURREN, J.;

YIANGOU, C.; CREE, I.A. Cancer cell adaptation to chemotherapy. **BMC Cancer**, 5, 78, 2005.

OGDEN, G.R. Alcohol and oral cancer. **Alcohol**, 35,169-173, 2005.

OLSHAN, A.F.; WATSON, M.A.; WEISSLER, M.C.; BELL, D.A. XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer. **Cancer Letters**, 178, 181-186, 2002.

PARKIN, D.M.; LÄÄRÄ, E.; MUIR, C.S. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. **International Journal of Cancer**, 41,2,184-197, 2002 apud TSANTOULIS, P.K.; KASTRINAKIS, N.G.; TOURVAS, A.D.; LASKARIS, G.; GORGOULIS, V.G. Advances in the biology of oral cancer. **Oral Oncology**, 43 (6), 523-34, 2007.

PEREGO, P.; GIAROLA, M.; RIGHETTI, S.C.; SUPINO, R.; CASERINI, C.; DELIA, D.; PIEROTTI, M.A.; MIYASHITA, T.; REED, J.C.; ZUNINO, F. Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced Bax expression in ovarian carcinoma cell systems. **Cancer Research**, 56, 556-562, 1996.

PERERA, F.P., Environment and Cancer: Who are susceptible? **Science**, 278, 1068-1073, 1997.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in Real Time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, 29, 9, 2002-2007, 2001.

PHAROAH, P.D.P.; DUNNING, A.M.; PONDER, B.A.J.; EASTON, D.F. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. **Nature Reviews Cancer**, 4, 850-860, 2004.

PISANI, P.; BRAY, F.; PARKIN, D.M. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. **International Journal of Cancer**, 97,72-81, 2002.

PONDER, B.A. Cancer genetics. **Nature**, 17, 411(6835), 336-41, 2001.

RABIK, C. A.; DOLAN, M. E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. **Cancer Treatment Reviews**, 33, 1, 9–23, 2007.

RAJU, B.; MEHROTRA, R.; OIJORDSBAKKEN, G.; AL-SHARABI, A.K.; VASSTRAND, E.N.; IBRAHIM, S.O. Expression of p53, cyclin D1 and Ki-67 in pre-malignant and malignant oral lesions: association with clinicopathological parameters. **Anticancer Research**, 25, 4699-4706, 2005.

RAMACHANDRAN, S.; RAMADAS,K.; HARIHARAN, R.; KUMAR, R.R.; PILLAI, M.R. Single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes *XRCC1* and *XPD* and its molecular mapping in Indian oral cancer. **Oral oncology**, 42, 350-362, 2006.

REICHARD, K.W.; JOSEPH K.T.; COHEN, M.; GREAGER, J.A. Squamous cell carcinoma of the tongue: experience with 86 consecutive cases. **Journal of Surgical Oncology**, 54, 4, 239-242, 1993.

SANDERSON, B.J.S.; FERGUSON, L.R.; DENNY, W.A. Mutagenic and carcinogenic properties of platinum-based anticancer drug. **Mutation Research**, 355, 59-70, 1996.

SATHYAN, K.M.; NALINAKUMARI, K.R.; ABRAHAM, T.; KANNAN, S. Influence of single nucleotide polymorphisms in H-Ras cyclin D1 genes on oral cancer susceptibility. **Oral Oncology**, 42, 607-613, 2006.

SAWAIR, F.A.; IRWIN, C.R.; GORDON, D.J.; LEONARD, A.G.; Stephenson, M.; Napier, S.S. Invasive front grading: reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 32, 1, 1-9, 2003.

SCULLY, C.; BAGAN, J.V. Recent advances in oral oncology. **Oral Oncology**, 43, 107-115, 2007.

SCULLY, C.; PORTER, S. Oral Cancer. **British Medical Journal**, 321, 97-100, 2000.

SHEN, H.; STURGIS, E.M.; DAHLSTROM, K.R.; ZHENG, Y.; SPITZ, M.R.; WEI, Q. A variant of the DNA repair gene XRCC3 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. **International Journal of Cancer**, 99, 869-872, 2002.

SHEN, M.R.; JONES, I.M.; MOHRENWEISER, H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. **Cancer Research**, 58, 604-608, 1998.

SHIMIZU, J.; HORIO, Y.; OSADA, H.; HIDA, T.; HASEGAWA, Y.; SHIMOKATA, K.; TAKAHASHI, T.; SEKIDO, Y.; YATABE, Y. mRNA expression of *RRM1*, *ERCC1* and *ERCC2* is not associated with chemosensitivity to cisplatin, carboplatin and gemcitabine in human lung cancer cell lines. **Respirology**, 13, 510-517, 2008.

SHIMIZU, S.; NARITA, M.; TSUJIMOTO, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. **Nature**, 399, 483-487, 1999.

SKJELBRED CF, SÆBØ M, WALLIN H, NEXØ, B.A; HAGEN, P.C.; LOTHE, I.M.B; AASE, S.; JOHNSON, E.; HANSTEEN, VOGÉ, U.; KURE, E.H. Polymorphisms of the *XRCC1*, *XRCC3* and *XPB* genes and risk of colorectal adenoma and carcinoma, in a Norwegian cohort: a case control study. **BMC Cancer**, 6, 67, 2006.

SMITH, T.R.; MILLER, M.S.; LOHMAN, K.; LANGE, E.M.; CASE, L.D.; MOHRENWEISER, H.W.; HU, J.J. Polymorphisms of *XRCC1* and *XRCC3* genes and susceptibility to breast cancer. **Cancer Letters**, 190, 2, 183-190, 2003.

SNUSTAND, D.P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos de Genética**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001.756.

STEVENS, E. V.; RAFFELD, M.; ESPINA, V.; KRISTENSEN, G.B.; TROPE, C.G.; KOHN, E.C.; DAVIDSON, B. Expression of Xeroderma Pigmentosum A Protein predicts improved outcome in metastatic ovarian carcinoma. **Cancer**, 103, 11, 2313-2319, 2005.

STEWART, D.J. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, 63, 1,12-31, 2007.

STUCKI, M.; PASCUCCI, B.; PARLANTI, E.; FORTINI, P.; WILSON, S.H.; HÜBSCHER, U.; DOGLIOTTI, E. Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. **Oncogene**, 17, 835 – 843, 1998.

STURGIS, E.M.; CASTILLO, E.J.; LI, L.; ZHENG, R.; EICHER, S.A.; CLAYMAN, G.L.; STROM, S.S.; SPITZ, M.R.; WEI, Q. Polymorphisms of DNA repair genes *XRCC1* in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Carcinogenesis**, 20, 2125-2129, 1999.

STURGIS, E.M.; WEI, Q.; SPITZ, M.R. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. **Seminars in Oncology**, 31, 726-733, 2004.

TAKAOKA, S.; IWASE, M.; UCHIDA, M.; YOSHIBA, S.; KONDO, G.; WATANABE, H.; OHASHI, M.; NAGUMO, M.; SHINTANI, S. Effect of combining epidermal growth factor receptor inhibitors and cisplatin on proliferation and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells. **International Journal of Oncology**, 30, 6, 1469-76, 2007.

TAKEMURA, K.; NOGUCHI, M.; OGI, K.; TOKINO, T.; KUBOTA, H.; MIYAZAKI, A.; KOHAMA, G.; HIRATSUKA, H. Enhanced Bax in oral SCC in relation to antitumor effects of chemotherapy. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 34, 93–99, 2005.

TSANTOULIS, P.K.; KASTRINAKIS, N.G.; TOURVAS, A.D.; LASKARIS, G.; GORGOULIS, V.G. Advances in the biology of oral cancer. **Oral Oncology**, 43, 6, 523-34, 2007.

VERMA, R.S.; TRIANTAFILLOU, N.G. Oncogenetic map of human genome. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, 100, 88-90,1998.

VIDAL, A.E.; BOITEUX, S.; HICKSON, I.D.; RADICELLA, J.P. XRCC1 coordinates the initial and the late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. **The EMBO Journal**, 20, 22, 6530-6539, 2001.

VODICKA, P.; KUMAR, R.; STETINA, R.; SANYAL, S.; SOUCEK, P.; HAUFROID, V.; DUSINSKA, M.; KURICOVA, M.; ZAMECNIKOVA, M.; MUSAK,L.; BUCHANCOVA, J.; NORPPA, H.; HIRVONEN, A.; VODICKOVA, L.; NACCARATI, A.; MATOUSU, Z.; HEMMINKI, K. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. **Carcinogenesis**, 25, 5, 757-763, 2004.

WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs. **Nature Reviews**, 4, 307 – 320, 2005.

WANG, Y.; SPITZ, M.R.; ZHU, Y.; DONG, Q.; SHETE, S.; WU X. From genotype to phenotype: correlating *XRCC1* polymorphisms with mutagen sensitivity. **DNA Repair**, 2, 901-908, 2003.

WEAVER, D.A.; CRAWFORD, E.L.; WARNER, K.A.; ELKHAIRI, F.; KHUDER, S.A.; WILLEY, J.C. *ABCC5*, *ERCC2*, *XPA* and *XRCC1* transcript abundance levels correlate with cisplatin chemoresistance in non-small cell lung cancer cell lines. **Molecular Cancer**, 4(1),18, 2005.

WERBROUCK J, DE RUYCK K, DUPREZ F, EIJKEREN, M.V.; RIETZSCHEL, E.; BEKAERT, S.; VRAL, A.; DE NEVE, W.; THIERENS, H. Single-nucleotide polymorphisms in DNA double-strand break repair genes: Association with head and neck cancer and interaction with tobacco use and alcohol consumption. **Mutation Research**, 656, 74–81, 2008.

WETERINGS, E.; VAN GENT, D.C.. The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. **DNA Repair**, 3, 1425–1435, 2004.

WIESE, C.; COLLINS, D.W.; ALBALA, J.S.; THOMPSON, L.H.; KRONENBERG, A., SCHILD, D. Interactions involving the Rad51 paralogs Rad51C and *XRCC3* in human cells. *Nucleic Acids Research*, 30,1001-1008, 2002.

WÜNSCH, V.F.; ZAGO, M.A. Modern cancer epidemiological research: genetic polymorphisms and environment. **Revista de Saúde Pública**, 39, 490-497, 2005.

YAO, M.; EPSTEIN, J.B.; MODI, B.J.; PYTYNIA, K.B.; MUNDT, A.J.; FELDMAN, L.E. Current surgical treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncology**, 43, 3, 213-23, 2007.

YEN, C.Y.; LIU, S.Y.; CHEN, C.H.; TSENG, H.F.; CHUANG, L.Y.; YANG, C.H.; LIN, Y.C.; WEN, C.H.; CHIANG, W.F.; HO, C.H.; CHEN, H.C.; WANG, S.T.; LIN, C.W.; CHANG, H.W.. Combinational polymorphisms of four DNA repair genes *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, and *XRCC4* and their association with oral cancer in Taiwan. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 37, 271–277, 2008.

ZAKRZEWSKA, J.M. Fortnightly review: Oral cancer. **British Medical Journal**, 318, 1051-1054, 1999.

ZHANG , P.; ZHANG, Z.; ZHOU, X.; QIU, W.; CHEN, F.; CHEN, W. Identification of genes associated with cisplatin resistance in human oral squamous cell carcinoma cell line. **BMC Cancer**, 6, 224, 2006.

ANEXO A – INFORMAÇÕES AO DOADOR

Nome do projeto de pesquisa: “Investigação Genético Molecular de Lesões da Cavidade Bucal”

1. Justificativa e objetivos da pesquisa:

Este estudo tem como principal objetivo estudar algumas características genéticas encontradas em tumores da cavidade oral. Esta pesquisa é muito importante, pois acreditamos que haja uma correlação entre estas características genéticas que desejamos estudar e o desenvolvimento das lesões (malignas ou benignas).

O que se chama de “características genéticas”, compreendem basicamente o estudo de genes que metabolizam agentes tóxicos das células que normalmente podem estar presentes em locais de trabalho, como defensivos agrícolas, raios-X, metais pesados, etc..., além de alterações genéticas em seqüências específicas do nosso genoma (microssatélites).

2. Procedimentos a serem utilizados:

Serão recrutados cerca de 100 pacientes portadores de lesões na cavidade bucal, os quais serão submetidos aos seguintes procedimentos:

- a) Os doadores responderão a um questionário padrão referente ao seu grupo étnico, estilo de vida, idade, local de nascimento, hábito tabagista, história familiar de câncer etc... Nesta etapa eles poderão fazer todas as perguntas que acharem necessárias para um perfeito esclarecimento de todas as dúvidas.
- b) Um profissional da área de saúde, devidamente treinado, colherá de cada voluntário cerca de 10 ml de sangue (punção venosa) com seringa plástica descartável, bem como uma amostra do tecido tumoral através de biópsia.
- c) O sangue e o tecido tumoral serão levados ao Laboratório de Genética e Mutagênese da UEL e serão devidamente processados para extração do DNA e análise genética molecular.
- d) Os resultados serão analisados e correlacionados com hábito de vida, idade, história familiar de câncer e outros fatores da vida de cada doador.
- e) O término deste estudo está previsto para aproximadamente 48 meses.

3. Desconforto e Riscos:

Durante a colheita do sangue e do tecido lesionado o doador poderá sentir desconfortos, ou uma ligeira dor decorrente da picada da agulha no braço ou na região oral, ou ainda, dependendo do estado emocional da pessoa, sentir pânico ao ver seu

próprio sangue ou mesmo uma fobia pela agulha da seringa. Às vezes, podem ocorrer sentimentos de desconfiança por parte do doador em relação ao profissional que está retirando o sangue. Quanto aos riscos de se doar sangue, estes são desprezíveis, pois todo o material utilizado será descartável, eliminando qualquer possibilidade de contaminação por esta via.

4. Benefícios esperados:

Os benefícios com relação a este estudo se constituirão em informar ao médico oncologista responsável os resultados obtidos nesta pesquisa e suas implicações ao paciente. O médico, por sua vez, ficará encarregado de passar as informações pertinentes ao paciente. Além disso, os dados obtidos nesta pesquisa poderão ser divulgados em eventos e periódicos que poderão contribuir para um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos com tais lesões.

5. Informações adicionais a respeito deste estudo:

O sangue periférico e o tecido serão coletados com seringas e agulhas estéreis e descartáveis e serão processados nas dependências da UEL/UFPR, em ambiente esterilizado e por profissionais especializados. No entanto, existem diferenças entre as células dos indivíduos em responder aos procedimentos técnicos utilizados e, portanto, em alguns casos, há a necessidade de se repetir a colheita do material. Caso isto aconteça, o doador poderá ser contactado para uma nova doação de sangue.

6. Confiabilidade do estudo:

Os doadores em hipótese alguma terão sua identidade divulgada para outras pessoas ou entidades, além daquelas que participam efetivamente do estudo. Também serão mantidas em sigilo todas as informações obtidas e que estejam relacionadas com a privacidade do doador.

7. Acesso às informações obtidas:

Os pesquisadores e a Comissão de Ética que aprovaram este estudo, comprometem-se a fornecer aos doadores todas as informações que venham a ser obtidas durante a pesquisa.

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO

Nome do estudo: “Investigação genético-molecular de tumores da cavidade bucal”.

CONSENTIMENTO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial (exame de sangue). E, entendo que os riscos de minha participação nesta pesquisa são mínimos.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar neste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual ou futuro.

Eu, _____, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo com a profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “Informações ao doador”, necessário para a minha compreensão do estudo.

_____ Data: __/__/__

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus ou profa. Dra. Enilze Ribeiro, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador.

_____ Data: __/__/__

Profas. Dras. Ilce Mara de Syllos Cólus ou Enilze M.S.F. Ribeiro

Código nº _____

HISTÓRIA PESSOAL

- 1- Registro hospitalar: _____
- 2- Sexo: () masculino () feminino
- 3- A qual grande grupo étnico você pertence ?
 Negro () Caucasiano () Asiático () Indígena () Outros ()
- Idade: a) 0-20 anos. b) 20 –50 anos. c) mais que 50 anos.
- Local de nascimento: Paraná ? () sim () não
- Se não: Que região brasileira ? Norte () Sul () Nordeste () Centro-Oeste ()
 Sudeste ()
- Número de filhos: (i.e. não se incluem aí filhos adotados): a)0 b) 1 c) 2 d) + de 2
- 6- Sua moradia era na zona rural ou urbana? () Rural () Urbana
- 7- Quanto tempo viveu neste local? _____anos _____meses
- 8- No local onde morou por mais tempo qual era o tipo de moradia?
 () casa () apartamento () barraco () cortiço () outra
- 9- A residência onde mora é servida por água encanada? () sim () não
- 10- Qual o seu grau de instrução?
 () analfabeto () 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto
 () 2º grau completo () técnico () profissional () superior
- 11- Qual sua religião? a) () Católico b) () Protestante c) () Outras

Histórico de moradia

- 12- Qual era o tipo de construção onde você morou mais tempo?
 () alvenaria () madeira () barro () mista
- 13- Que tipo de cobertura tinha essa moradia? () telha barro comum () laje
 () folha de zinco () brasilit-eternit () sapé () outro (qual?)_____
- 14- Você poderia me contar se morou a menos de 1 Km de uma destas indústrias por mais de 1 ano? Se sim, por quanto tempo? _____
- | | |
|-------------------------------|-----------------|
| Indústria têxtil ou tecelagem | () sim () não |
| Processamento de madeira | () sim () não |
| Papel ou celulose | () sim () não |
| Fábrica de sapatos ou curtume | () sim () não |

Metalúrgica (cromo/níquel)	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Usina de açúcar ou álcool	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Plástico ou borracha	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Refinaria de petróleo	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não

Histórico de exposição relacionado ou não ao trabalho

15- Você já se expôs a alguma destas substâncias abaixo em seu trabalho?

Se SIM, por quanto tempo e há quanto tempo foi: _____

Derivados de petróleo querosene, gasolina, solventes,...)	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Tintas/ corantes	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Indústrias têxteis ou tecelagem	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Praguicidas / Herbicidas	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Radiação	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Metais pesados (Pb, Ni, Cr,...)	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Processamento de madeira	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Papel ou celulose	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Mineração	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Fábrica de sapatos ou curtume	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Metalúrgica	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Usina de açúcar ou álcool	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Plástico ou borracha	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Outras substâncias químicas:	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não

16- Se SIM para a pergunta acima: Você utilizava equipamentos de proteção individual para trabalhar com essas substâncias químicas? (máscaras, luvas, óculos,...)

a) sim b) não

Histórico Tabagista

- 17- Você fuma atualmente? sim não
- 18- Se NÃO, mas já fumou, há quanto tempo parou de fumar?
 a) 0-5 anos b) 5-10 anos c) >10
- 19- Quanto você fuma/fumava por dia ?
 menos de ½ maço de meio a 1 maço mais de um maço (quantos: _____)
- 20- Você costuma/costumava fumar charutos? sim não
- 21- Você costuma/costumava fumar cachimbo? sim não
- 22- Você costuma/costumava fumar cigarro de palha? sim não
- 23- Você costuma/costumava mascar fumo? sim não
- 24- Você convive/conviveu em seu trabalho ou em casa com pessoas que fumam?
 a) sim b) não

Histórico de Etilismo

- 25- Você consome/consumiu bebidas alcólicas com frequência? sim não
- 26- Se já parou, há quanto tempo parou de consumir esta bebida?
 a) 0-5 anos. b) 5 –10 anos. c) mais 10 anos.
- 27- Que tipo de bebida alcóolica você costuma/ costumava consumir ?
 a) Destiladas b) Não-Destilada c) Outra
- 28- Quanto você costuma/ costumava beber por semana?
 no máximo um copo de 2 a 5 copos de 6 a 10 de 11 a 30 mais de 30
- 29- Durante a sua vida, já consumiu ou consome alguma bebida diariamente por mais de 6 meses continuamente?
 a) Sim b) Não

Histórico de Saúde

- 30- Há cerca de um ano você tem se automedicado com, por exemplo, aspirinas, antiácidos, antihistamínicos, sedativos, ou outras drogas? () sim () não () não sabe
- 31- Você toma vitaminas freqüentemente ou tem tomado nos últimos seis meses?
() sim () não () não sabe
- 32- Você já operou da garganta (amígdalas)? () sim () não
- 33- Você se submeteu a algum Raio-X de cabeça e pescoço recentemente?
() sim () não
- 34- Se SIM, quantos? a) () Menos de 10 b) () Mais de 10
- 35- Você já teve as seguintes doenças?
() Bronquite asmática () Pressão alta () Diabetes () Tuberculose () Câncer
(localização do tumor _____)
- 36- Em casos de câncer na família, qual era o parentesco?
() Pai () Mãe () Irmão () Filho () Tio () Primo () Outro
- 37- Qual era a localização do tumor?
() Boca/garganta () Pulmão () Estômago () Intestino () Ginecológico () Mama
() Outro (qual?) _____
- 38- Você já teve alguma moléstia venérea?
a) () sim b) () não

Histórico de Saúde Dentária

- 39- Você usa/usou dentadura ou aparelho móvel? () sim () não
- 40- (Se sim) há quanto tempo? a) () 0-5 anos. b) () 5 –10 anos. c) () mais 10 anos.
- 41- Esta dentadura já lhe causou alguma ferida na boca? () sim () não
- 42- Com que freqüência você vai ao dentista? () nunca () <1/ano () >1/ano
- 43- Você tem algum dente estragado? () sim () não
- 44- (Se sim) eles estão lhe machucando? () sim () não

Histórico alimentar: (refira-se somente a hábitos freqüentes)

- 45- De qual tipo é o fogão da sua casa? () gás () lenha () elétrico () outro
 46- Já residiu em casa com fogão á lenha? () sim () não
 47- Você tem o hábito de ingerir alimentos e bebidas muito quentes? () sim () não
 48- Você toma chimarrão? () sim () não
 49- Você se alimenta apenas de vegetais? ()sim () não
 50- Você come carne? ()sim () não
 51- Se SIM, com que freqüência você come estes alimentos:

Dias/Semana

	menos que 1	1-2	3-4	5-6	Diariamente
Carne	()	()	()	()	()
Peixe	()	()	()	()	()
Frango	()	()	()	()	()
Porco	()	()	()	()	()
Outros	()	()	()	()	()

Histórico genético

52-Para mulheres: você já sofreu algum aborto espontâneo?

()sim ()não

53-Para ambos os sexos: você possui algum(a) irmão(a) gêmeo idêntico(a)?

()sim ()não

Incluir informações das amostras do tumor (localização, laudo histo-patológico):
