



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Mariangela Torreglosa Ruiz

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE
NUCLEOTÍDEOS ÚNICOS (SNPs) EM
PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E
PESCOÇO**

São José do Rio Preto
2008

Mariangela Torreglosa Ruiz

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE
NUCLEOTÍDEOS ÚNICOS (SNPs) EM
PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E
PESCOÇO**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Doutor no Curso
de Pós-graduação em Ciências da Saúde,
Área de Concentração: Medicina e
Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo

São José do Rio Preto
2008

Ruiz, Mariangela Torreglosa

Análise de Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos (SNPs) em
pacientes com câncer de cabeça e pescoço / Mariangela Torreglosa
Ruiz

São José do Rio Preto, 2008.

170 p.; 29,7 cm

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
– FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo

1. Neoplasia de Cabeça e Pescoço; 2. Polimorfismo genético; 3.
Fatores de risco

Mariangela Torreglosa Ruiz

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE
NUCLEOTÍDEOS ÚNICOS (SNPs) EM PACIENTES
COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO**

BANCA EXAMINADORA

**TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR**

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Eny M. Goloni-
Bertollo

2º Examinador: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva

3º Examinador: Prof. Dr. Wilson A. Silva Jr.

4º Examinador: Profa. Dra. Flávia C. R. Lisoni

5º Examinador: Profa. Dra. Érika C. Pavarino-
Bertelli

Suplentes: Profa. Dra. Adriana Madeira Alvares da
Silva

São José do Rio Preto, 08/10/2008.

SUMÁRIO

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xv
Resumo	xviii
Abstract	xx
I.Introdução	1
II. Artigos Científicos	11
Artigo I. Epidemiologia e biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço.....	14
Artigo II. Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State	21
Artigo III. Methionine synthase gene polymorphism (<i>MTR</i>) and risk of head and neck cancer	29
Artigo IV. Vascular endothelial growth factor genetic variability and head and neck cancer in Brazilian population	53
Artigo V. Polymorphism of <i>KiSS-1</i> gene in Brazilian head and neck cancer patients	79

Artigo VI. Validação de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) do Projeto Genoma Humano do Câncer em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.....	100
III. Conclusões	129
IV. Referências Bibliográficas	131
V. Apêndice	145
Material e Métodos	146
VI. Anexos	168
Anexo I - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CEP).....	169
Anexo II – Aprovação do Comitê Nacional de Ética (CONEP).....	170

Dedico esta tese aos meus pais **Ginez Antônio Ruiz** (*in memoriam*) e **Célia Aparecida Brito Ruiz**, à minha irmã **Mariana Torreglosa Ruiz**, à minha avó **Angelina Pereira de Souza** (*in memoriam*) e ao meu namorado **Rodrigo Rodrigues Cintra**, que são a minha base, onde sempre tenho o apoio e carinho que eu preciso.

Amo muito vocês!!!!

“Ainda que eu falasse a língua dos homens, que eu falasse a língua dos anjos sem amor eu nada seria” (ICO 13 : 1, 2)

Agradecimentos

A conclusão deste trabalho somente foi possível graças à colaboração, direta ou indireta, de todos aqueles que, de diferentes formas, estiveram nele envolvidos.

À Deus por tudo.

À minha orientadora **Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo**, por toda a confiança depositada em mim na realização deste trabalho, pela compreensão, dedicação, afeto e aconselhamento nos momentos difíceis, pela oportunidade única que me deu na vida profissional e por toda a liberdade concedida na realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino-Bertelli**, pelo exemplo de profissionalismo, pelas muitas discussões a respeito do estudo, pela amizade, colaboração e compreensão, que muito contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

À **Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva**, pelo apoio em um dos meus momentos profissionais mais difíceis e pelo importante auxílio na execução deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Emmanuel Dias-Neto** e ao **Prof. Dr. Pedro Édson Moreira Guimarães**, pelo auxílio na elaboração, etapas iniciais do projeto e pela correção dos artigos científicos.

Ao **Prof. Dr. José Victor Maniglia** pela colaboração na coleta das amostras dos pacientes e auxílio na análise clínica deste estudo.

À **Profa. Dra. Élide Paula Benquique Ojopi** pela colaboração na etapa do seqüenciamento automático das amostras.

À **Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza** e à **Profa. Msc. Marcela Pinhel**, pela colaboração na coleta dos indivíduos controles.

Ao **Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy**, por sua paciência e atenção, sua contribuição foi muito importante na etapa final do trabalho.

Ao **Prof. Dr. José Antônio Cordeiro**, pelo auxílio na análise e tratamento dos dados.

À **Profa. Adília Maria Pires Sciarra**, pelo auxílio nas traduções e por toda a calma e disponibilidade nos ensinamentos de inglês.

À **Profa. Dra. Cláudia Márcia A. Carareto**, pelos esclarecimentos nas dúvidas de evolução, e pelo auxílio na minha formação inicial.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e colaboração.

Aos biólogos **Carla Renata Graça** e **Carlos Fabian Mendiburu**, pelo auxílio no início do trabalho.

Às biólogas **Ana Livia Silva Galbiatti** e **Janayna Fernanda Balachi**, pela dedicação ao projeto, companheirismo e auxílio nestes anos.

Aos médicos e funcionários do **Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, em especial ao **Prof. Luiz Sérgio Raposo** e **Maurício J. Cabral Ruback** e aos funcionários do **Hemocentro do Hospital de Base de São José do Rio Preto** pela atenção e disponibilidade na coleta de amostras.

Aos funcionários da **Biblioteca**, em especial a Sra. **Rosângela Maria Moreira Cavanami**, pela disponibilidade e auxílio na busca de materiais bibliográficos.

A todos do **Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica da FAMERP**, pelo auxílio na utilização dos equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do **Serviço de Atendimento Ambulatorial (SAME)**, em especial **Sílvia Cristina de Santana**, pela disponibilidade na consulta dos prontuários médicos.

Aos coordenadores **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)**, **Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile**, **Prof. Dr. Reinaldo Azoubel**, **Prof. Dr. Emmanuel A. Burdmann** e **Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza**, pelo incentivo à pesquisa e pela constante dedicação na manutenção e fortalecimento do curso de pós-graduação da Instituição.

Aos funcionários do **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP**, em especial ao **Sr. José Antônio Silistino**, pela disponibilidade e auxílio em todas as etapas do curso de doutorado.

Aos funcionários da Diretoria de Pesquisa, **Celso P. Reis Filho**, **Eliana Longo** e **Fábio Oliveira**, pelo auxílio constante nestes anos.

Aos amigos da UPGEM, **Amanda Priscila de Oliveira, Bruna Lancia Zampieri, Joice Matos Biselli, Patrícia Matos Biselli, Rodrigo Castro**, pela convivência diária, troca de experiências e amizade neste período. Agradeço também a todos os estagiários do laboratório, pela convivência nestes anos.

Aos pós-graduandos que concluíram o curso neste período, **Prof. Dr. Alexandre Guerzoni Rodrigues, Profa. Dra. Rosana Pagliuso, Prof. Dr. Gustavo Navarro Betônico e Profa. Dra. Maria Paula Sanches Alvarenga** pela amizade, o incentivo e troca de experiências.

Aos pesquisadores e funcionários do Bloco U-6 – Laboratório de Pesquisa “**Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile**” pelo convívio diário agradável.

Às amigas **Heloisa Cristina Caldas e Rosa S. Kawasaki-Oyama**, pela amizade e convívio durante este período.

Aos amigos **Marcos Roberto Higino Estécio, Alessandra Bernadete Trovó e Giovana Mussi Polachini**, que são provas constantes que para a amizade não existem distâncias.

Ao meu pai **Ginez Antonio Ruiz** (*in memoriam*), que em vida me ensinou muito com seu jeito honesto, humilde, e com sua inteligência e sabedoria indispensáveis na minha formação. Que agora acredito que cuida de mim e sempre cuidará, em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe **Célia Aparecida Brito Ruiz**, meu exemplo de força e superação. Agradeço seu esforço sem medidas para dar sempre o melhor todo tempo em minha vida.

À minha irmã **Mariana Torreglosa Ruiz**, que é uma pesquisadora exemplar e que sempre esteve do meu lado! Quanta inteligência e sabedoria, somados ao amor a mim dedicados!!!

Ao meu namorado **Rodrigo Rodrigues Cintra**, minha calma e tranquilidade, sempre acreditou que eu conseguiria e que iria dar tempo de terminar tudo na hora exata, me apoiando incondicionalmente em todas as minhas decisões. Aproveito para agradecer a toda **família Cintra** pelo apoio e incentivo.

À minha avó **Angelina Pereira de Souza**, meu exemplo de fé, otimismo e amor à vida! Agradeço por suas orações, por sua experiência, discernimento e sabedoria.

A todos os meus tios, primos e amigos que participaram direta e/ou indiretamente desta fase da minha vida.

Ao **Prof. Dr. Humberto Liedtke Junior**, Diretor Geral da FAMERP, pelo grande incentivo e contribuição para o desenvolvimento e fortalecimento desta Instituição.

A direção da **FUNFARME** (Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto) pela colaboração na execução deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (**CNPq**) pelo auxílio financeiro a este projeto.

A todos os pacientes que participaram deste estudo, minha eterna gratidão.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

De tudo na vida ficam três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando

A certeza de que é preciso sempre continuar

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo,

Fazer da queda um passo de dança,

Do medo uma escada,

E do sonho uma ponte.

Fernando Pessoa

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO III

- Figure 1.** Kaplan-Meier curve representing (A) *Survival Time* - Patients with the G allele had a higher survival rate than those with the AA genotype. (B) *Recurrence Time* – Patients with AA genotype had a higher recurrence rate than those with G allele..... 51

ARTIGO IV

- Figure 1.** Kaplan–Meier curves for the overall survival (A) and relapse time (B) for patients according to the -1154G/A *VEGF* polymorphism..... 76

ARTIGO V

- Figure 1.** Kaplan–Meier curves for the overall survival (A) and relapse time (B) for patients according to the Q36R *KiSS-1* polymorphism 99

ARTIGO VI

- Figura 1.** Curvas de Kaplan–Meier curves para tempo de óbito (A) e tempo de recidiva da doença (B). O grupo 1 representa até 1 alelo alterado e o grupo 2 os genótipos com mais de um alelo alterado... 128

APÊNDICE - CASUÍSTICA E MÉTODO

- Figura 1.** Digestão com a enzima *Hae III* do produto de PCR do gene *MTR* os genótipos estudados (Linha 2, homozigoto AA, linha 3 heterozigoto AG e linha 4 homozigoto GG) Na primeira linha do gel, pode-se observar o marcador de peso molecular e ao lado da foto o tamanho de cada um destes fragmentos..... 154
- Figura 2.** Curvas da discriminação alélica produzidas pela análise no software SDS. O eixo X representa o número de ciclos de amplificação e o eixo y, o valor da fluorescência. (A) Exemplo de um homozigoto (GG); (B) Exemplo de um homozigoto (AA); (C) Exemplo de um heterozigoto (GA)..... 156
- Figura 3.** Gel de poliacrilamida 7.5% apresentando os padrões de migração eletroforética dos produtos de amplificação do gene *KiSS-1* após a técnica de SSCP (Coluna M: marcador de peso molecular 100 pb; colunas 1, 3, 4 e 5: padrão usual e coluna 2: padrão não usual)..... 158
- Figura 4.** Digestão com a enzima *Hae III* do produto de PCR do gene *NINJ 1* mostrando os dois alelos observados (A com 212 pb e C com 176 pb) e os três diferentes genótipos (Linhas 8, 13, 14 heterozigotos AC; linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13 homozigotos AA e linha 15 homozigoto CC). Na primeira linha do gel, pode-se observar o marcador de peso molecular e ao lado da foto o tamanho de cada um destes fragmentos..... 161
- Gel de eletroforese após digestão com a enzima *Apo I* do produto

-
- Figura 5.** de PCR do gene *TAX1BP1* mostrando os dois alelos observados (A com 264 pb e T com 205 pb) e os três diferentes genótipos (Linha 10, heterozigoto TA; linhas 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14 homozigotos TT e linha 5 homozigoto AA). Na primeira linha do gel, pode-se observar o marcador de peso molecular e ao lado da foto o tamanho de cada um destes fragmentos..... 163
- Figura 6.** Cromatogramas apresentando o seqüenciamento automático do gene *LADININ*, as setas indicam o local analisado A: homozigoto AA; B: heterozigoto AG e C: homozigoto GG..... 165

LISTA DE TABELAS E QUADROS

ARTIGO I

Quadro 1. Alterações moleculares em câncer de cabeça e pescoço	18
---	----

ARTIGO II

Table 1. Age distribution of head and neck cancer patients	24
Table 2. Occupation of male head and neck cancer patients.....	25
Table 3. Occupation of female head and neck cancer patients.....	25
Table 4. Primary anatomic site in head and neck cancer patients.....	25
Table 5. Distribution of primary tumor anatomical sites according to the TNM classification (category T).....	25
Table 6. Distribution of primary tumor anatomical sites according to the TNM classification (category N).....	26
Table 7. Distribution of primary tumor anatomical sites according to the TNM classification (category M).....	26
Table 8. Histological differentiation of head and neck cancer patients	26

ARTIGO III

Table 1.	Demographic characteristics of patients with head and neck cancer and control individuals.....	47
Table 2.	Allelic and genotypic distributions in patients with head and neck cancer and control individuals.....	48
Table 3.	Distribution of <i>MTR</i> A2756G polymorphism in controls and patients with head and neck cancer.....	49
Table 4.	Distribution of demographic data, risk factors, genotypes, <i>MTR</i> 2756 alleles and odds ratio (OR) for the head and neck cancer.....	50

ARTIGO IV

Table 1.	Distributions of characteristics of case and control status.....	73
Table 2.	Distribution of the -1154G/A <i>VEGF</i> polymorphism among head and neck cancer patients and controls.....	73
Table 3.	Odds Ratio of head and neck cancer related to <i>VEGF</i> genotype: gender, age, smoking and drinking habits	74
Table 4.	Clinicopathological features and <i>VEGF</i> polymorphism.....	75

ARTIGO V

Table 1.	Distribution of characteristics in case and control individuals	95
-----------------	---	----

Table 2.	Distribution of the Q36R polymorphism of <i>KiSS-1</i> in head and neck cancer patients and controls	96
Table 3.	Odds Ratio of head and neck cancer related to the genotypes of <i>KiSS-1</i> polymorphisms by gender, age, smoking and drinking habits	97
Table 4.	Clinicopathological features and the <i>KiSS-1</i> polymorphisms.....	98

ARTIGO VI

Tabela 1.	Seqüência de oligonucleotídeos <i>primers</i> e temperaturas de anelamento (Ta) das Reações em Cadeia da Polimerase.....	122
Tabela 2.	Distribuição dos dados demográficos dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço e indivíduos do grupo controle.....	122
Tabela 3.	Frequência gênica e alélica na análise univariada.....	123
Tabela 4.	Frequências genotípicas dos polimorfismos dos genes <i>KiSS-1</i> , <i>NINJI</i> , <i>TAX1BP1</i> , <i>LAD1</i>	124
Tabela 5.	Número de alelos polimórficos entre pacientes e controles	125
Tabela 6.	Distribuição dos dados demográficos, fatores de risco, polimorfismos estudados em odds ratio (OR) para câncer de cabeça e pescoço	126
Tabela 7.	Características clínico patológicas e polimorfismos estudados	127

APÊNDICE – CASUÍSTICA E MÉTODO

Tabela 1. Dados sociodemográficos dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço e indivíduos controles.....	147
Tabela 2. Distribuição entre os casos por sítio primário de ocorrência do tumor.....	148
Tabela 3. Distribuição dos sítios anatômicos primários do tumor em relação ao TNM (categoria T).....	150
Tabela 4. Distribuição dos sítios anatômicos primários do tumor em relação ao TNM (categoria N).....	150
Tabela 5. Distribuição dos sítios anatômicos primários do tumor em relação ao estágio.....	150

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

INCA	Instituto Nacional do Câncer
µmol/L	Micromol / litro
AJCC	<i>American Joint Committee for Cancer</i>
bp	<i>Base pair</i>
CCDN1	<i>Ciclin D1</i>
CEP	Research Ethics Committee
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico <i>(National Council for Scientific and Technological Development)</i>
CONEP	<i>Research National Commission of Brasília</i>
dATP	<i>Adenine</i>
dGTP	<i>Guanine</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>Desoxirribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dTTP	<i>Thymine</i>
dUTP	<i>Uracyl</i>
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDTA	<i>Ethylenediaminetetracetic acid</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (<i>São José do Rio Preto Medical School</i>)
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (<i>São Paulo State Research Foundation</i>)
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto

HB	Hospital de Base
Hcy	homocysteine
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPV	Vírus papiloma humano
HWE	equilíbrio de Hardy-Weinberg/ <i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i>
<i>KiSS-1</i>	KiSS-1 metastasis-suppressor
<i>LAD1</i>	<i>Ladinin-1</i>
LIM	Laboratório de Neurociências
M	presença de metástase à distância
MMPs	metaloproteínas
MTR	Metionina sintase (<i>Methionine synthase</i>)
N	presença de linfonodos regionais comprometidos
<i>NIN1I</i>	<i>Nerve Injury Induced by Protein 1</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
rcf	Rotação de força centrípeta
RFLP	Polimorfismo de comprimento de restrição
rpm	Rotações por minuto
SCC	<i>Squamous cell carcinoma</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeos únicos/ <i>Single Nucleotide</i>

Polymorphisms

SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
T	Tamanho do tumor
Ta	Temperatura de anelamento
<i>TAX1BP1</i>	<i>Human T-cell leukemia virus type I binding protein 1</i>
TEB	Tris-EDTA-Borato
TNM	Classificação dos Tumores Malignos
UICC	<i>Union International Control Cancer</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
<i>VEGF</i>	<i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>

Introdução: O câncer de cabeça e pescoço é responsável por uma alta incidência de óbitos. Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) constituem a variação mais comum do genoma humano e podem estar associados à base molecular do câncer. **Objetivo:** Estabelecer a incidência da doença no Serviço Ambulatorial de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base de São José do Rio Preto; investigar a frequência de SNPs nos genes *MTR*, *VEGF*, *KiSS-1*, *NINJI*, *TAX1BP1* e *LADI* em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e em uma população controle; avaliar a associação dos polimorfismos com os hábitos tabagista e etilista, gênero e idade e verificar a associação entre os polimorfismos e os parâmetros clínicos da doença. **Casística e Método:** Foram analisados os dados epidemiológicos de pacientes atendidos no Serviço Ambulatorial de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base de São José do Rio Preto, no período de 2000 a 2005. Para a investigação molecular foram incluídos no estudo 805 indivíduos (254 pacientes com câncer de cabeça e pescoço e 551 controles). A análise molecular foi realizada com DNA genômico, e foram utilizadas as técnicas de PCR em Tempo Real (gene *VEGF*), PCR-SSCP (gene *KiSS-1*), PCR-RFLP (genes *MTR*, *NINJI* e *TAX1BP1*) e seqüenciamento automático (gene *LADI*). **Resultados:** A análise dos dados epidemiológicos mostrou predominância de pacientes do sexo masculino (86%), hábitos tabagista (83%) e etilista (77,95%). O sítio anatômico primário mais frequente foi a cavidade oral (35,37 %). Na análise molecular, foram encontradas diferenças estatísticas na distribuição do polimorfismo *MTR* A2756G (OR = 1,69; IC 95% 1,09-2,62; p = 0,019) entre pacientes e controles. Para o sítio anatômico primário do tumor, foi encontrada uma frequência aumentada do alelo polimórfico na laringe (OR = 2,32; IC 95% 1,12 – 4,82; p = 0,02) para o gene *KiSS-1*; uma frequência aumentada do

polimorfismo para *NINJI* em cavidade oral (OR = 1,86; IC 95% 1,05 -3,30; p = 0,03) e reduzida na laringe (OR = 0,40 IC 95% 0,22-0,74; p =0,003) e um aumento da frequência do polimorfismo para o gene *TAXIBP1* na cavidade oral (OR =2,25; IC 95% 1,20-4,21; p =0,01). Foi observada uma menor frequência do polimorfismo do gene *VEGF* em tumores com extensão T3 e T4 (OR = 0,36; IC 95% 0,14 – 0,93; p = 0,0345) e uma frequência menor do polimorfismo do gene *LADI* em tumores com estádios III e IV (OR = 0,39 IC 95% 0,18-0,83; p = 0,01). **Conclusões:** O câncer de cabeça e pescoço é mais frequente em homens, em indivíduos com hábitos tabagista e etilista e o sítio anatômico primário mais representativo é a cavidade oral. O genótipo *MTR A2756G* está associado ao câncer de cabeça e pescoço. Não há evidência de associação entre os polimorfismos e os hábitos tabagista, etilista, gênero e idade. Há evidências de associação entre o polimorfismo do gene *KiSS-1* e laringe, entre os polimorfismos dos genes *NINJI* e *TAXIBP1* e cavidade oral, e uma menor frequência dos polimorfismos do genes *VEGF* em tumores com extensão T3 e T4 e *LADI* em tumores com estádios III e IV.

Palavras-chave: 1. Neoplasia de Cabeça e Pescoço; 2. Polimorfismo genético; 3. Fatores de risco

Introduction: Head and neck cancer is responsible for a high death rate. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most common variation of human genome and can be associated to the molecular basis of cancer. **Objectives:** To establish the incidence of this disease in the Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery Service of Hospital de Base in São José do Rio Preto; to investigate the frequency of SNPs in the *MTR*, *VEGF*, *KiSS-1*, *NINJI*, *TAX1BP1* and *LAD1* genes in head and neck cancer patients and a control population; to evaluate the association of these polymorphisms with smoking, alcoholism, gender and age and to verify the association between polymorphisms and clinicopathological features of the disease. **Subjects and Methods:** The epidemiological data of head and neck cancer patients consulted in the Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery Service in the period from 2000 to 2005 were analyzed. Eight hundred and five individuals (254 head and neck cancer patients and 551 controls) were included in the study for molecular investigation. The molecular analyses were performed with genomic DNA utilizing Real Time PCR (*VEGF* gene), PCR-SSCP (*KiSS-1* gene), PCR RFLP (*MTR*, *NINJI* and *TAX1BP1* genes) and automatic sequencing (*LAD 1* gene) techniques. **Results:** An analysis of epidemiological data shows a prevalence of men (86%), smokers (83%) and alcoholics (77.95%). The most common primary tumor site was the oral cavity (35.37%). Statistical differences were found in the *MTR* A2756G polymorphism distribution (OR = 1.69; CI 95% 1.09-2.62; p = 0.019) by molecular analysis between patients and controls. On analyzing the primary tumor site, an increased frequency of *KISS-1* polymorphic alleles was identified in laryngeal cancer (OR = 2.32; 95% CI 1.12 – 4.82; p = 0.02); an increased frequency of the *NINJI* polymorphism was found in oral cavity cancer (OR = 1.86; 95% CI 1.05-3.30; p = 0.03) and a decreased frequency in laryngeal

cancer (OR = 0.40; 95% CI 0.22-0.74; p = 0.003); and an increase of the *TAX1BP1* gene polymorphism was seen in oral cavity cancer (OR = 2.25; 95% CI 1.20-4.21; p = 0.01). A decreased frequency of the *VEGF* gene polymorphism was observed in advanced (T3 and T4) tumors (OR = 0.36; CI 95% 0.14-0.93; p = 0.0345) and a lower frequency of the *LAD1* polymorphism in stage III and IV tumors (OR = 0.39 95% CI 0.18-0.83; p = 0.01). **Conclusions:** Head and neck cancer is more frequent in men, smokers and alcoholics with the most common primary tumor site being the oral cavity. *MTR* A2756G is associated with head and neck cancer. There is evidence of an association between this polymorphism and smoking, alcoholism, gender and age. There is also evidence of an association between the *KiSS-1* gene polymorphism and laryngeal cancer, of *NINJI* and *TAX1BP1* polymorphisms in oral cavity tumors, lower frequencies of the *VEGF* polymorphism in T3 and T4 tumors and the *LADI* polymorphism in stage III and IV tumors.

Key words: head and neck neoplasm, genetic polymorphism, risk factors

I. INTRODUÇÃO

“Câncer de cabeça e pescoço” é um termo coletivo definido por bases anatômicas e topográficas para descrever tumores malignos do trato aerodigestivo superior. Esta região anatômica inclui a cavidade oral, faringe e laringe. Cerca de 40% dos cânceres de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade oral, 15% na faringe e 25% na laringe. ⁽¹⁻³⁾

A incidência do câncer de cabeça e pescoço aumentou ao longo das duas últimas décadas e, dentre todas as neoplasias, o câncer de cavidade oral, sítio de tumor mais representativo, atinge o quinto lugar em incidência e o sétimo em taxa de mortalidade. ⁽⁴⁾ As estimativas mundiais revelam aproximadamente 481.100 casos novos e 320.000 mortes ao ano para o câncer de cabeça e pescoço. ^(5,6) A taxa de sobrevida é de apenas 40 a 50% no mundo. ^(5, 7)

A área do mundo com a maior incidência é a Melanésia, região do oeste do Oceano Pacífico a nordeste da Austrália (31,5 por 100.000 homens e 20,2 por 100.000 mulheres). Para o gênero masculino, a maior taxa de incidência é no oeste da Europa (11,3 por 100.000), sudeste da Europa (9,2 por 100.000), sul da Ásia (12,7 por 100.000), sudeste da África (11,1 por 100.000), e Austrália/Nova Zelândia (10,2 por 100.000). Em mulheres, a incidência é relativamente alta no sudeste da Ásia (8,3 por 100.000). ⁽⁴⁾

No Brasil, a incidência de câncer da cavidade oral representa cerca de 3% de todos as neoplasias. A cidade de São Paulo apresenta a taxa mais elevada dessa neoplasia no Brasil e na América Latina. ^(8,9) Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2008 para este sítio anatômico, há a estimativa de 14.160 novos casos, 10.380 homens e 3.780 mulheres para o Brasil. No estado de São Paulo são

estimados 4.510 novos casos. ⁽¹⁰⁾ Para o câncer de laringe no Brasil observa-se uma incidência aproximada de 2% de todos os tipos de cânceres do Brasil e este exibe uma das mais altas taxas do mundo e de importante expressividade na América Latina. ^(10,11)

Na região noroeste do estado de São Paulo, um levantamento realizado mostrou 427 novos casos no período de 2000 a 2005, para a região anatômica de cabeça e pescoço. ⁽¹²⁾

Variações geográficas ou regionais na prevalência do câncer de cabeça e pescoço indicam que o estilo de vida sociocultural de uma população pode desempenhar um papel importante na carcinogênese da mucosa desse sítio anatômico. ^(13,14)

O tipo histológico mais comum é o carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular, que ocorre em 90% dos pacientes ⁽⁶⁾. O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço é uma doença freqüentemente observada entre a quinta e sétima década de vida. ^(15,16) Uma das possíveis explicações para este fato é que alterações relacionadas ao estresse oxidativo na saliva contribuem para a alta prevalência de câncer oral na população mais velha. ⁽¹⁷⁾

Embora mais de 90% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço tenham idade superior a 45 anos, a incidência desta doença em indivíduos mais jovens vem aumentando. Os mecanismos etiológicos nesta faixa etária ainda não estão bem esclarecidos. Há relatos que infecções virais (vírus papiloma humano e Epstei-Barr), possam contribuir para o desenvolvimento desta neoplasia ⁽¹⁶⁾, e também que pacientes jovens parecem exibir predisposição à instabilidade genética, mostrando uma alta freqüência de instabilidade de microssatélites. ⁽¹⁸⁾

O câncer de cabeça e pescoço afeta em sua maioria homens, com uma relação de gênero em torno de 10:1. ^(19,20) Atualmente, tem-se observado um relativo aumento

de casos em mulheres, o qual é atribuído por muitos autores pelo aumento do hábito tabagista. ⁽²¹⁾

O tabagismo e o etilismo são os principais fatores de risco estabelecidos para câncer de cabeça e pescoço. ^(7, 22 - 26) O cigarro contém aproximadamente cerca de 70 tipos de carcinógenos, dentre eles as N-nitrosaminas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos aromáticos e aminas aromáticas. Os carcinógenos do cigarro podem levar à formação de adutos de DNA. A incidência de câncer de cabeça e pescoço é de quatro a sete vezes maior em indivíduos fumantes. ⁽²⁷⁾

Atualmente, o conceito do campo de cancerização é amplamente aceito como uma explicação para os efeitos carcinogênicos do cigarro na mucosa oral. O ataque direto dos radicais livres e outros carcinógenos presentes no cigarro nas células epiteliais, gradualmente acumulam alterações levando à transformação maligna no local. ⁽²⁸⁾

Estudos em animais indicam que o álcool não é genotóxico, mas pode agir como solvente para a penetração de carcinógenos. Possui como metabólito primário o acetaldeído, o qual é altamente reativo ligando-se a proteínas, aos constituintes celulares e ao DNA, formando adutos estáveis. ^(24, 29, 30) O consumo excessivo de álcool também pode levar a deficiências nutricionais devido às falhas na absorção intestinal e pelas alterações em algumas vias metabólicas. ⁽³¹⁾

Estudos demonstram que os sítios anatômicos primários de tumores variam de acordo com o hábito tabagista e etilista. Pacientes que não bebem e não fumam tendem a ter como sítio primário mais prevalente, a língua, enquanto que pacientes que possuem estes dois hábitos tendem a ter a laringe, hipofaringe e assoalho bucal como sítios anatômicos mais prevalentes. ⁽³²⁾

Algumas infecções virais também são fatores de risco para neoplasias de cabeça e pescoço, dentre elas a infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e pelo vírus papiloma humano (HPV). O vírus EBV é um membro da família Herpes considerado oncogênico devido à sua habilidade de imortalizar e transformar células *in vitro*.⁽³³⁾ Este vírus é um fator de risco bem estabelecido para carcinoma de nasofaringe.⁽³⁴⁾

Aproximadamente 20-25% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço são infectados com o vírus HPV, predominantemente pelos tipos 16, 18, 31 e 45 para a região cervical, e pelo tipo 16 para a orofaringe.^(3, 35, 36) As proteínas do vírus HPV possuem habilidade de desestabilizar funções supressoras de tumor pela interação e inativação das funções das proteínas p21, p53 e pRb, resultando em defeitos na apoptose, reparo do DNA, controle do ciclo celular e eventualmente levando à imortalização celular.⁽³⁾

Estudos também sugerem que a pobre higienização oral está associada com o risco de câncer de cabeça e pescoço. O uso regular de soluções de bochecho, falta de escovação e de visitas periódicas a odontologistas são fatores de risco para câncer na cavidade oral.⁽³⁷⁾ As doenças periodontais, resultante da pobre higienização oral, podem levar a infecções com conseqüente liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas e as reações contra as inflamações podem favorecer o desenvolvimento do câncer.⁽³⁸⁾ A perda de dentes também pode contribuir para o desenvolvimento do câncer oral uma vez que leva a alteração da flora oral favorece a redução de nitritos e nitratos e a produção de acetaldeído que leva à formação de adutos de DNA.⁽³⁹⁾

O refluxo gastroesofágico é prevalente em pacientes com câncer de laringe, constituindo um possível fator de risco para esta doença,^(40, 41) e dependendo da frequência deste fenômeno fisiológico, pode resultar em uma inflamação crônica, que é

um fator mutagênico para diversos tipos de tumores. ⁽⁴²⁾

Em relação à dieta, os resultados da literatura evidenciam que o consumo de frutas e cereais reduz o risco de câncer oral, enquanto o consumo de carnes vermelhas está associado com o aumento deste risco. ^(43 - 46)

O desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço é resultado tanto da interação de fatores ambientais quanto da herança genética, portanto, multifatorial. ^(47, 48)

Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) constituem o tipo de variação mais comum do genoma humano. Conceitualmente, os SNPs são alterações em um único nucleotídeo, com frequência acima de 1% na população humana. ⁽⁴⁹⁾ Em geral são observados a cada 1000 pares de bases do DNA ⁽⁵⁰⁾ e correspondem a mutações de pontos que foram fixadas nas populações. Suas frequências são determinadas por períodos de tempo em que ocorreram, pressões evolutivas sobre variantes biologicamente significativas, eventos de efeitos de gargalo e deriva genética. Os SNPs são importantes marcadores utilizados no entendimento de doenças genéticas complexas. ^(51- 53)

O gene *MTR* (*Metionina Sintase*) apresenta-se polimórfico, com substituição de adenina para guanina no nucleotídeo 2756 (A2756G), ⁽⁵⁴⁾ e há evidências de que esta variante exerça influência nas reações de metilação do DNA e na suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer. Os genótipos *MTR* 2756AG e GG foram associados ao risco aumentado para carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço comparado com o genótipo AA. ⁽⁵⁵⁾ Por outro lado, Paz *et al.* (2002) ⁽⁵⁶⁾ observaram menor número de ilhas CpG (citosina-fosfato-guanina) hipermetiladas em genes supressores de tumor em amostras de tumores colo-retal de indivíduos homocigotos *MTR* 2756GG em relação aos genótipos AG e AA, o que sugere um papel protetor para este genótipo contra a

inativação de genes supressores de tumor. Outros estudos, porém, não encontraram associação deste polimorfismo com o risco de suscetibilidade ao câncer. ^(57, 58) Dessa forma, a contribuição da variante *MTR* A2756G para o desenvolvimento do câncer é contraditória.

O gene *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*) está localizado em 6p21.3, apresenta ao menos 30 SNPs descritos na literatura ^(59, 60, 61) que desempenham um papel crítico na angiogênese. ⁽⁶²⁾ Os polimorfismos -634G/C, -1154G/A, 2578C/A levam à alterações na produção da proteína VEGF e têm sido associados ao desenvolvimento de melanomas ⁽⁶³⁾, bexiga ⁽⁶⁴⁾, pulmão ^(65, 66), próstata ^(67, 68), estômago ⁽⁶⁹⁾, mama ^(70,71), tireóide ⁽⁷²⁾ e cabeça e pescoço. ⁽⁷³⁻⁷⁶⁾ Alguns estudos demonstram associação entre os polimorfismos do gene *VEGF* e o prognóstico de diferentes tipos de cânceres. ⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾ No câncer oral, somente quatro estudos observaram associação dos polimorfismos -460 C/T, +960 C/T e -1154 G/A do gene *VEGF* com esta doença. ⁽⁷³⁻⁷⁶⁾ Para o polimorfismo -460CT, o estudo de Ku e colaboradores ⁽⁷³⁾, mostrou uma associação do polimorfismo em câncer oral, e o estudo de Yapijakis e colaboradores ⁽⁷⁴⁾, mostrou uma frequência aumentada de heterozigotos CT e câncer oral. Cheng e colaboradores ⁽⁷⁵⁾, mostrou uma frequência aumentada de homozigotos +960 C/C em tumores com invasão vascular. Para o polimorfismo -1154 G/A foi realizado um único estudo que mostrou uma associação entre o genótipo -1154 GG e câncer de laringe. ⁽⁷⁶⁾

O Projeto Genoma Humano do Câncer (FAPESP/Instituto Ludwig) gerou aproximadamente um milhão de seqüências derivadas de amostras tumorais e de tecidos normais, utilizando a técnica ORESTES a qual gera seqüências predominantemente da região codificadora central dos genes. ^(77, 78) Polimorfismos presentes nos genes *KiSS-1*, *NIN1*, *TAX1BP1* e *LAD1* foram descritos durante este projeto por Brentani e

colaboradores ⁽⁷⁹⁾ e por Costa e colaboradores. ⁽⁸⁰⁾ Estes genes são marcadores de interesse para o estudo por serem selecionados em uma biblioteca não-enviesada (Projeto Genoma Humano do Câncer), que passaram por uma primeira etapa de validação. ^(79, 80)

O gene *KiSS-1* metastasis-suppressor (*KiSS-1*), localizado no cromossomo 1q32, possui um polimorfismo A → G que resulta na troca do aminoácido glutamina por arginina na posição 36 da proteína. ⁽⁷⁹⁾ Sua capacidade de suprimir metástase foi demonstrada em linhagens celulares de melanomas malignos e câncer de mama. ^(81, 82) Estudos de expressão gênica demonstraram uma associação da expressão diminuída com o pobre prognóstico em câncer de bexiga, esôfago, estômago e ovário. ^(83- 85)

O gene *NINJURINI* (*NINJI*), mapeado em 9q22, possui uma transversão polimórfica de A → C em sua seqüência, responsável pela substituição do aminoácido Asparagina para Alanina na posição 110 da proteína. ⁽⁸⁰⁾ Seu produto, uma molécula de adesão, foi isolado primeiramente em células de Schwann, após uma lesão do nervo. A proteína localiza-se na superfície celular de células de Schwann e neurônios e tem um papel importante na regeneração neuronal. Além disso, se expressa em vários tecidos humanos originados de células epiteliais (por exemplo, fígados, rins, glândulas adrenais). Uma expressão aumentada deste gene foi observada em indivíduos com carcinoma hepatocelular ⁽⁸⁶⁾ e em pacientes com leucemia linfoblástica aguda. ⁽⁸⁷⁾

O gene *Human T-cell leukemia virus type I binding protein 1* (*TAX1BP1*) localizado em 7p15, possui um polimorfismo T → A que resulta na troca do aminoácido Leucina por Isoleucina na posição 306 da proteína, descrito por Costa e colaboradores em 2001. ⁽⁸⁰⁾ Este gene participa como co-fator na reação dos fatores de necrose tumoral que desempenha um papel central no crescimento e desenvolvimento celular, e

imunidade adaptativa.⁽⁸⁸⁾ Sua proteína em expressão elevada interage com a proteína anti-apoptótica *zinc finger A20*, que inibe a apoptose induzida por TNF (fator de necrose tumoral).⁽⁸⁹⁾ A análise de outros polimorfismos deste gene foi associada com artrite reumatóide⁽⁹⁰⁾, sabe-se também que este gene possui expressão elevada em câncer de ovário.⁽⁹¹⁾

O gene *LADININ-1 (LADI)* humano está mapeado em 1q25.1-q32.3 e sua proteína é um dos componentes dos filamentos de ancoragem, componente de base de membranas na junção derme-epiderme.⁽⁹²⁾ Possui uma transição (A→G) em sua seqüência, resultando em uma substituição do aminoácido Lisina para ácido glutâmico na posição 323 da proteína.⁽⁸⁰⁾

Embora estes polimorfismos referidos acima tenham sido descritos em amostras de câncer no Projeto Genoma Humano do Câncer, há ausência de estudos que correlacionam a presença dos mesmos com o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço. Por isso, é de extrema importância estudos que investiguem tal associação.

A análise molecular em tumores é muito importante para oferecer novas informações sobre suscetibilidade de desenvolvimento, bem como para estimativa de prognóstico e decisão de tratamentos.⁽³⁶⁾

I. 1 OBJETIVOS

Com base nas evidências apresentadas, este estudo teve como objetivo:

1. Caracterizar o perfil sócio demográfico e identificar fatores de risco (tabagismo e etilismo) de pacientes com câncer de cabeça e pescoço atendidos no Serviço Ambulatorial de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de

Base de São José do Rio Preto, para posterior seleção de pacientes para a análise molecular;

2. Investigar a frequência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dos genes *MTR*, *VEGF*, *KISS-1*, *NINJI*, *TAX1BP1* e *LAD1* em pacientes com câncer de cabeça e pescoço comparando-a com aquela observada em uma população controle;
3. Avaliar a associação dos polimorfismos com os hábitos tabagista e etilista, gênero e idade no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço;
4. Verificar a associação entre os polimorfismos e os sítios primários de ocorrência, extensão do tumor, comprometimento de linfonodos, agressividade do tumor e o prognóstico da doença (tempo de recidiva e óbito).

ARTIGOS CIENTÍFICOS

II. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados estão apresentados em forma de artigo. No total estão apresentados 07 artigos, dois artigos publicados, dois artigos submetidos, um artigo a ser submetido e dois artigos redigidos em português para serem traduzidos e posteriormente submetidos.

Artigo I: Revisão sobre biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço publicado em periódico nacional.

Título: Epidemiologia e biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço.

Periódico: Arquivos em Ciências da Saúde 2006 jan-mar;13(1):34-8.

Artigo II: Análise clínica dos pacientes publicado em periódico internacional.

Título: Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State

Periódico: Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, 74:68-73, 2008.

Artigo III: Resultados sobre a análise do polimorfismo *MTR* A2756G submetido para publicação em periódico internacional.

Título: Methionine synthase gene polymorphism (*MTR*) and risk of head and neck cancer.

Periódico: Oral Oncology

Artigo IV: Resultados sobre a análise do polimorfismo -1154 *VEGF* submetido para publicação em periódico internacional.

Título: Vascular endothelial growth factor genetic variability and head and neck cancer in Brazilian population

Periódico: Archives of Medical Research

Artigo V: Resultados sobre a análise do polimorfismo do gene *KiSS-1* a ser submetido para publicação em periódico internacional.

Título: Polymorphism of *KiSS-1* gene in Brazilian head and neck cancer patients.

Periódico: Anticancer Research

Artigo VI: Resultados sobre a análise dos polimorfismos gerados no projeto Genoma Humano do Câncer a ser traduzido e submetido para publicação em periódico internacional.

Título: Validação de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) do Projeto Genoma Humano do Câncer em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

ARTIGO I

Artigo I: Revisão sobre biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço publicado em periódico nacional.

Título: Epidemiologia e biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço.

Autores: Ruiz, MT; Pavarino-Bertelli EC; Maniglia JV; Ruback MJC; Goloni-Bertollo EM.

Periódico: Arquivos em Ciências da Saúde 2006 jan-mar;13(1):34-8.

ARTIGO DE ATUALIZAÇÃO

Epidemiologia e biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço.
*Head and neck cancer epidemiology and biomarkers.*Mariângela T. Ruiz¹; Érika Pavarino-Bertelli²; José Victor Maniglia³; Maurício J.C. Ruback⁴; Eny M. Goloni-Bertollo⁵.¹ Doutoranda em Ciências da Saúde*; ² Doutora em Genética*; ³ Livre Docente em Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço**;⁴ Mestrando em Ciências da Saúde**; ⁵ Livre Docente em Genética Humana e Médica*.

* Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular – UPGEM- Departamento de Biologia Molecular – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

** Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Resumo O presente artigo é uma revisão com o objetivo de atualizar os aspectos epidemiológicos e marcadores moleculares em câncer de cabeça e pescoço com ênfase nos fatores de riscos desta doença, na prevalência e nas novas descobertas de marcadores moleculares. Para isso foi realizado um levantamento bibliográfico para a obtenção destes dados. O câncer de cabeça e pescoço é responsável por uma grande incidência de óbitos e apresenta uma frequência de aproximadamente 200.000 casos novos por ano. O tabagismo e o consumo de álcool são os principais fatores etiológicos dessa doença. A análise de marcadores moleculares é útil para a compreensão da fisiologia, diagnóstico, prognóstico, seleção de tratamentos e prevenção desta doença.

Palavras-chave Epidemiologia; Neoplasias de Cabeça e Pescoço; Marcadores Biológicos; Genética; Tabagismo; Alcoolismo.

Abstract This study is a review aiming to update the epidemiological aspects and molecular markers of head and neck cancer, focusing the risks factors, the prevalence and the new findings of molecular markers of this disease. A literature review was made to obtain these data. Head and neck cancer accounts for a great incidence of deaths, and its frequency is approximately 200.000 new cases a year. Smoking and alcohol consumption are the main etiological factors of this disease. The analysis of molecular markers is useful to understand the physiology, diagnosis, prognosis, treatment choices and prevention of this disease.

Keywords Epidemiology; Head and Neck Neoplasms; Biological Markers; Genetics; Smoking; Alcoholism.

Aspectos epidemiológicos

O câncer de cabeça e pescoço é responsável por uma grande incidência de óbitos em todo o mundo, constituindo a 6ª causa de morte por câncer. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Estado de São Paulo, as estimativas de câncer na cavidade oral, para o ano 2006, mostram um total de 13.470 novos casos por 100.000 habitantes, com taxas de 10.060 para o sexo masculino e 3.410 para o sexo feminino¹.

A incidência do câncer de cabeça e pescoço aumenta com a idade. Na Europa, 98% dos pacientes têm idade superior a 40 anos de idade² e apenas 4 a 6% são indivíduos mais jovens. Entretanto, a incidência nesta faixa etária tem aumentado em vários países³ e os mecanismos envolvidos na tumorigênese de pacientes jovens são pouco conhecidos^{4,5,6}.

O tipo histológico mais freqüente, presente em mais de 90% dos casos⁷, é o carcinoma de células escamosas com ocorrência aproximada de 40% na cavidade oral, 15% na faringe e 25% na laringe. O restante nos demais sítios remanescentes, como por exemplo as glândulas salivares. Outros tumores da região da cabeça e pescoço, tais como, cérebro, tireóide e face não são

convencionalmente inclusos no termo “câncer de cabeça e pescoço”².

O câncer de cabeça e pescoço é caracterizado pela agressividade local e pelo risco de ocorrência de tumores secundários. O risco para o desenvolvimento de tumores secundários está estimado em 20% correspondendo a uma taxa anual de 4-6%⁸, geralmente maior em mulheres quando comparadas aos homens⁹. Os pacientes em tratamento apresentam risco para neoplasmas adicionais principalmente no trato aerodigestivo. A taxa de mortalidade é estimada em, aproximadamente, 12.300 mortes por ano¹⁰ e a de sobrevida é de apenas 40 a 50% no mundo^{11,12}.

Evidências epidemiológicas sugerem que muitos fatores diferentes podem estar associados com o aumento da probabilidade de ocorrência destes cânceres. Vários estudos têm mostrado uma relação consistente do fumo com câncer de laringe e da cavidade oral. Na União Européia estima-se que aproximadamente 60% do câncer oral em homens e 30% em mulheres seriam atribuídos somente ao cigarro².

Além do fumo, o consumo de álcool também é um fator de risco

Apoio Financeiro: Auxílio FAPESP (Processo 04/14573-3) e CNPQ (Processo 477665/04)

Não há conflito de interesse

bem estabelecido para o câncer de cabeça e pescoço. Estes fatores de risco isolados podem aumentar de duas a três vezes o risco para esta doença; para a cavidade oral e laringe o risco aumenta mais de 15 vezes quando o consumo de álcool e cigarro estão combinados^{3,4,13,14,15,16,17}.

Embora os homens sejam mais afetados que as mulheres, nos últimos anos, observou-se um aumento notável na incidência entre mulheres, o que parece refletir a alteração de hábitos tabagistas e etilistas neste grupo¹⁸.

Uma pobre higiene bucal pode agir sinergisticamente com o álcool que nessas condições, aumenta a produção de acetaldeído na saliva, um metabólito do etanol que contribui para o desenvolvimento do câncer².

Em relação à dieta, as deficiências de micronutrientes parecem estar associadas com um risco aumentado deste tipo de neoplasia, entretanto essas evidências são inconsistentes. Paralelamente, há evidência de que uma dieta rica em vegetais (particularmente em carotenos) e frutas provavelmente diminui o risco^{2,19}. Por outro lado, uma história familiar positiva aumenta em 3,5 vezes a probabilidade empírica do desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço²⁰.

Variações geográficas ou regionais indicam que o estilo de vida sociocultural de uma população pode refletir a apresentação clínica e as características do tumor. Um estudo realizado no Brasil, país em desenvolvimento, revela diferenças estatisticamente significantes dessas características quando comparado àquelas de pacientes provenientes de uma instituição de país desenvolvido (Estados Unidos)²¹.

Marcadores moleculares

Os avanços na compreensão da biologia molecular do câncer de cabeça e pescoço têm aberto novas direções na ciência. O aumento das pesquisas está sendo direcionado para o desenvolvimento de terapias com alvos moleculares ou marcadores moleculares que são úteis na predição dos tratamentos ou na seleção de pacientes para terapias moleculares específicas baseadas nas características dos tumores²².

Cada passo da progressão da doença é seguido por alterações cromossômicas resultantes tanto da perda como do ganho de material genético e, conseqüentemente perda ou ganho de função celular. Os resultados fenotípicos dessas alterações estão descritos em diferentes níveis do desenvolvimento do câncer: crescimento e supressão do tumor, angiogênese e invasão, potencial metastático, resposta imune. A maioria das alterações genéticas que ocorrem durante este processo ainda não é conhecida ou não está totalmente compreendida²³. O Quadro 1 mostra algumas alterações moleculares mais freqüentes em câncer de cabeça e pescoço.

Marcadores moleculares, tais como *EGFR*, *CICLINA DL*, *FAS/FASL*, proteína *p27*, *VEGF*, e metaloproteínas têm auxiliado no prognóstico de tumores de cabeça e pescoço.

Os fatores de crescimento e seus receptores de membrana desempenham papéis importantes na proliferação celular, sobrevivência, adesão, migração e diferenciação²⁵. O gene *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) possui expressão elevada em câncer de cabeça e pescoço, e está relacionado com um mau prognóstico para a doença. A ativação do gene *EGFR* estimula o crescimento e proliferação, angiogênese, invasão, metástase e inibição da apoptose. É amplamente expresso por vários tipos celulares, incluindo linhagens epiteliais e mesenquimais^{26, 27}. Em câncer de cabeça e pescoço, é encontrada expressão elevada do RNA mensageiro em 92% a 87% dos tumores, e está

aumentada 69 vezes em 92% dos tumores quando comparados à mucosa normal^{22,28,29, 30}.

O gene da ciclina D1 (*CCDN1*) localizado em 11q13, é expresso em células epiteliais na transição G1-S do ciclo celular. Em alguns tipos celulares induz a apoptose³¹. A atividade da ciclina D1 pode ser inibida por vários genes supressores de tumor incluindo as proteínas p16 (gene *CDKN2A* - *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), p21 (gene *WAF1/CIP1* - *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) e p27 (gene *KIP1* - *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*). Vários estudos mostram que a amplificação ou expressão elevada foram associadas com a doença em estágios avançados, expansão precoce de nódulos, pobre resposta à quimioterapia e redução da sobrevida^{20, 30, 32}.

A amplificação da região 11q13 que contém os oncogenes *INT-2* (*FGF-3*), *HST-1* (*FGF-4*), *CICLINA D1* (*PRAD-1*, *BCL-1*) e *EMS-1* foi correlacionada com carcinomas invasivos e está presente em 30-50% dos tumores³⁰.

O gene *FAS* (*TNF RECEPTOR SUPERFAMILY MEMBER*) também conhecido como *TNFRSF6*, *CD95*, ou *APO-1* é um receptor de superfície celular que desempenha um papel central na sinalização da apoptose em vários tipos celulares. Este receptor interage com seu ligante natural *FASL* (também conhecido como *CD95L*), um membro da superfamília de fatores de necrose tumoral. A diminuição da expressão de *FAS* e/ou o aumento da expressão de *FASL* favorece a transformação maligna e progressão do tumor. Mutações em linhagens somáticas e germinativas do gene *FAS* e também do gene *FASL* estão associadas com um risco aumentado de câncer^{33, 34, 35}.

A proteína p16, codificada pelo gene supressor de tumor *CDKN2A* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), localizado em 9p21, pertence a família dos inibidores de quinase dependentes de ciclina, que incluem as proteínas p15 (gene *INK4B* - *cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*), p21 e p27. Estes genes regulam a fase G1 do ciclo celular de uma maneira negativa. A proteína p16 se liga a *CDK4* (*cyclin-dependent kinase-4*) e *CDK6* (*cyclin-dependent kinase-6*), inibindo sua associação com a ciclina D1. A inibição da atividade do complexo ciclina D1/CDK4/6 interrompe a fosforilação da proteína Rb (retinoblastoma) e a liberação do fator de transcrição E2F, o que leva à inibição do ciclo celular na fase de transição G1-S. Alterações genéticas em p16 podem conferir vantagens para o crescimento celular contribuindo com o processo tumorigênico³⁶. Estudos mostram que a proteína p16 alterada está associada com baixa sobrevida, aumento de recorrências, progressão tumoral, e metástase nodular em muitos estudos³². Entretanto, os resultados relacionados ao prognóstico, utilizando a proteína p16 como marcador em câncer de cabeça e pescoço são conflitantes e, portanto, o papel dessa proteína na carcinogênese ainda não está claramente estabelecido³⁷.

A proteína VEGF (gene *vascular endothelial growth factor*) foi relacionada à agressividade^{38, 39}, invasão e metástase de tumores sólidos. Desempenha um papel crítico na angiogênese, essencial para o crescimento tumoral e ocorrência de metástase. Induz a proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais durante o crescimento tumoral pela ligação às quinases receptoras de tirosinas específicas. Vários estudos mostram o valor prognóstico de *VEGF* e seu papel na promoção da invasão e no comportamento agressivo de tumores de cabeça e pescoço^{40,41,42}.

As metaloproteínas (MMPs) são enzimas proteolíticas dependentes de zinco que degradam a maioria dos componentes da

Quadro 1. Alterações moleculares em câncer de cabeça e pescoço*

Cromossomo	Cromossomo	Alteração	Frequência(%)	Genes associados	Significado
3q11-qter	3q11-qter	Ganho	37-71	AIS(p4073)	Carcinogênese e fenótipo transformado
7p12-p22	7p12-p22	Ganho	34-47	EGFR	Crescimento e fenótipo agressivo
8q13-q24.3	8q13-q24.3	Ganho	27-50	MYC, PTK2	Adesão e regulação do crescimento
11q13	11q13	Ganho	39-61	CICLINAD1, EMS, FGF3, FGF4	Progressão do ciclo celular, migração, regulação do crescimento
20q12-q13.2	20q12-q13.2	Ganho	33-48	BCAS1, ZNF217	Fenótipo agressivo
3p12-p24	3p12-p24	Perda	53-72	FHIT	Supressão de tumor
8pter-p21	8pter-p21	Perda	62-43	Desconhecidos	Suposta supressão tumoral
9p21-p24	9p21-p24	Perda	39-67	Proteínas p16, p15, p18, p19	Progressão do ciclo celular, senescência
18q	18q	Perda	58-59	DCC, DPC4, MADR2, P15, SCCA1, SCCA2, PAI2, PAI3	Pobre prognóstico
17p13	17p13	Perda ou mutação	55	TP53	Regulação do ciclo celular, apoptose

* Adaptado de Le & Giaccia, 2003²⁹.

matriz extracelular incluindo colágeno, elastina e fibronectina. A degradação da matriz de colágeno é importante para a invasão de tecidos subjacentes e metástases⁴³. Várias MMPs possuem expressão elevada em câncer de cabeça e pescoço incluindo MMP-2⁴⁴, MMP-8⁴⁵, MMP-9⁴⁶ e MMP-13⁴⁷. MMP-2 e MMP-9 e desempenham um papel importante na carcinogênese de cabeça e pescoço por degradar o colágeno tipo IV, o principal componente da membrana basal. Alguns estudos mostram uma correlação significativa entre a expressão de MMP-9 e baixa sobrevida em pacientes com câncer de cabeça e pescoço³⁷.

O gene *TP53* (*tumor protein p53*), mapeado em 17q13, está envolvido em muitas funções celulares, incluindo a manutenção da estabilidade genômica, progressão do ciclo celular, diferenciação celular, reparo a danos no DNA e apoptose. A produção da proteína é aumentada na célula em resposta a danos no DNA, induzindo a parada do ciclo celular na transição G1/S. Se o dano não for reparado, p53 leva a célula à apoptose. Na presença de mutações deste gene, o produto gênico é frequentemente presente em altas concentrações. No câncer de cabeça e pescoço, são relatadas mutações em 33 a 59% dos casos, perdas alélicas em 38% e expressão aumentada da proteína em 37 a 76%^{32,47}.

A detecção de mutações da p53 nas margens cirúrgicas ou nos nódulos linfáticos cervicais considerados histologicamente livres da doença, pode auxiliar na localização das células cancerígenas persistentes, no sangue ou na medula óssea, na ausência de doença clínica, radiológica e histopatológica. Isto poderia teoricamente evidenciar a necessidade de uma terapia adjuvante²⁸. A expressão elevada da proteína p53 nos tumores primários é considerada um sinal preditivo de sobrevida reduzida em função de sua associação com a recorrência de tumores primários e secundários²⁰.

A expressão elevada de *C-ERBB-2* (*HER-2*), gene codificador do receptor para o fator de crescimento epidérmico, localizado no cromossomo 17, observada em 75% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço, também foi correlacionada à baixa sobrevida. Expressão diferencial de outros genes como o aqueles rela-

cionados com a matriz extracelular, adesão, motilidade, inflamação e inibição da protease tem contribuído para o desenvolvimento de carcinomas oral e faríngeo metastáticos e não-metastáticos⁴⁸. A análise dos padrões de metilação (hipometilação e hipermetilação) de genes específicos também pode ser utilizada para diagnóstico precoce^{24,29}.

Genes que codificam enzimas envolvidas na biotransformação de carcinógenos têm sido associados ao desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. Dois genes em particular, *GSTT1* e *GSTM1*, que codificam enzimas pertencentes à família das glutationo S-transferases (GSTs), parecem relevantes para a suscetibilidade ao carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, pois atuam na detoxificação de metabólitos reativos de substâncias carcinógenas da fumaça do tabaco⁴⁹. Os estudos dos polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* realizados em carcinomas de cabeça e pescoço são contraditórios. Vários autores demonstram uma associação com o genótipo nulo [-] *GSTM1*^{50, 51, 52, 53, 54, 55} enquanto outros não^{56, 57, 58, 59, 60}. Para o genótipo nulo [-] *GSTR1* também foi demonstrada uma relação em alguns casos^{51, 52} e ausência da mesma em outros^{56, 57, 59, 60}. Desse modo, a variabilidade individual em genes relacionados aos processos de ativação e detoxificação metabólica parece crucial na suscetibilidade ao câncer de cabeça e pescoço.

Considerações finais

A detecção de alterações moleculares pode auxiliar no diagnóstico e no tratamento do câncer de cabeça e pescoço, o que tem estimulado a busca de biomarcadores com aplicações clínicas potenciais. A era da genômica e da proteômica, com o desvendamento do genoma humano tem melhorado significativamente a compreensão da fisiologia dos tumores sólidos resultando na rápida identificação de novos alvos moleculares para o diagnóstico, prevenção e tratamento do câncer de cabeça e pescoço²⁴.

Referências bibliográficas

1. Instituto Nacional do Câncer. Incidência de câncer na cavidade oral no Brasil. [citado 2005 Nov 20]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>
2. Döbrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the

- problem. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24(1):9-17.
3. Iamaroon A, Pattanaporn K, Pongsiriwet S, Wanachantararak S, Prapayastak S, Jitidecharaks S, et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33(1):84-8.
 4. Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya S. An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncol* 2004;40(3):304-13.
 5. Gilroy JS, Morris CG, Amdur RJ, Mendenhall WM. Impact of young age on prognostic for head and neck cancer: a matched-pair analysis. *Head Neck* 2005;27(4):269-73.
 6. Subdo J, Bryne M, Mao L, Lotan R, Reith A, Kildal W, et al. Molecular based treatment of oral cancer. *Oral Oncol* 2003;39(8):749-58.
 7. Casiglia J, Woo SB. A comprehensive review of oral cancer. *Gen Dent* 2001;49(1):72-82.
 8. Kim ES, Hong WK, Khuri FR. Chemoprevention of aerodigestive tract cancers. *Annu Rev Med* 2002;53:223-43.
 9. Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Expanding fields of genetically altered cells in head and neck squamous carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2005;15(2):113-20.
 10. McMahon S, Chen AY. Head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22(1):21-4.
 11. Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Munoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. *Oral Oncol* 2000;36(1):106-15.
 12. Zender CA, Petruzzelli GJ. Why do patients with head and neck squamous cell carcinoma experience distant metastases: can they be prevented? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13(2):101-4.
 13. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005;32 Suppl 1:S59-66.
 14. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang MJ, Jen J et al. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000;60(12):3155-9.
 15. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995;332(11):712-7.
 16. Foulkes WD, Brunet JS, Sieh W, Black MJ, Shenouda G, Narod SA. Familial risks of squamous all cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. *BMJ* 1996;313(7059):716-21.
 17. Kjaerheim K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancers: a prospective study of 10,900 Norwegian men. *Cancer Causes Control* 1998;9(1):99-108.
 18. Bradley PJ, Raghavan U. Cancers presenting in the head and neck during pregnancy. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;12(2):76-81.
 19. Sanchez MJ, Martinez C, Nieto A, Castellsague X, Quintana MJ, Bosch FX et al. Oral and oropharyngeal cancer in Spain: influence of dietary patterns. *Eur J Cancer Prev* 2003;12(1):49-56.
 20. Chin D, Boyle GM, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br J Plast Surg* 2004;57(7):595-602.
 21. Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head Neck* 2004;26(1):31-8.
 22. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002;62(24):7350-6.
 23. Awada A, Lalami Y. Molecular markers, molecular-targeted therapies and taxanes: how to integrate the progress into clinical research and practice for the management of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol* 2005;17(3):209-11.
 24. Le QT, Giaccia AJ. Therapeutic exploitation of the physiological and molecular genetic alterations in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9(12):4287-95.
 25. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001;37 Suppl 4:S3-8.
 26. Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2001;8(1):3-9.
 27. Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004;11(4):689-708.
 28. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(17):2666-72.
 29. Estecio MR, Youssef EM, Rahal P, Fukuyama EE, Góis-Filho JF, Maniglia JV, Goloni-Bertollo EM, Issa JP, Tajara EH. LHX6 is a sensitive methylation marker in head and neck carcinomas. *Oncogene* 2006;25(36):5018-26.
 30. Namazie A, Alavi S, Olopade OI, Pauletti G, Aghamohammadi N, Aghamohammadi M et al. Cyclin D1 amplification and p16 (MTS1/CDK41) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope* 2002;112(3):472-81.
 31. Kövesi G, Szende B. Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med* 2006;35(5):274-7.
 32. Gleich LL, Salamone FN. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control* 2002;9(5):369-78.
 33. Shibakita M, Tachibana M, Dhar DK, Kotoh T, Kinugasa S, Kubota H et al. Prognostic significance of Fas and Fas ligand expressions in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5(9):2464-9.
 34. Sun T, Miao X, Zhang X, Tan W, Xiong P, Lin D. Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL in esophageal squamous-cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(13):1030-6.
 35. Bel Hadj Jrad B, Mahfouth W, Bouaouina N, Gabbouj S, Ahmed SB, Ltaïeff M et al. A polymorphism in FAS gene promoter associated with increased risk of nasopharyngeal carcinoma and correlated with anti-nuclear autoantibodies induction. *Cancer Lett* 2006;233(1):21-7.
 36. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260(9):502-8.
 37. Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol* 2005;86(6):347-63.
 38. Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H, Jikko A, Furukawa S, Ishida T et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumour progression and p53 gene status. *J Clin Pathol* 1998;51(10):771-5.
 39. Lim SC. Expression of c-erbB receptors, MMPs and VEGF in head and neck squamous cell carcinoma. *Biomed Pharmacother* 2005;59 Suppl 2:S366-9.
 40. Tae K, El-Naggar AK, Yoo E, Feng L, Lee JJ, Hong WK et al. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. *Clin Cancer Res* 2000;6(7):2821-8.
 41. Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A. Microvessel density (MVD) and vascular endothelial growth factor expression (VEGF) in human oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2001;21(1B):689-95.
 42. Schimming R, Reusch P, Kuschniertz J, Schmelzeisen R. Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity: do they have prognostic relevance? *J Craniomaxillofac Surg* 2004;32(3):176-81.
 43. Werner JA, Rathcke IO, Mandic R. The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Exp Metastasis* 2002;19(4):275-82.
 44. Yoshizaki T, Maruyama Y, Sato H, Furukawa M. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2001;95(1):44-50.
 45. Moilanen M, Pirila E, Grenman R, Sorsa T, Salo T. Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol* 2002;197(1):72-81.
 46. Franchi A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M, Gallo O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2002;95(9):1902-10.
 47. Canevari RA, Rogatto SR. Câncer de cabeça e pescoço. In: Ferreira CG, Casalli JCR, organizadores. *Oncologia molecular*. 1ª ed. São Paulo:

- Atheneu; 2004 . p.189-203.
48. Schmalbach CE, Chetepa DB, Giordano TJ, Rubin MA, Teknos TN, Bradford CR et al. Molecular profiling and the identification of genes associated with metastatic oral cavity/pharynx squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130(3):295-302.
49. Evans AJ, Henner WD, Eilers KM, Montalto MA, Wersinger EM, Andersen PE et al. Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck* 2004;26(1):63-70.
50. Gronau S, Koenig-Greger D, Jerg M, Riechelmann H. Gene polymorphisms in detoxification enzymes as susceptibility factor for head and neck cancer? *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;128(5):674-80.
51. Amador AG, Righi PD, Radpour S, Everett ET, Weisberger E, Langer M et al. Polymorphisms of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93(4):440-5.
52. Sreelakha TT, Ramadas K, Pandey M, Thomas G, Nalinakumari KR, Pillai MR. Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol* 2001;37(7):593-8.
53. Drummond SN, Gomez RS, Motta Noronha JC, Pordeus IA, Barbosa AA, De Marco L. Association between GSTT-1 gene deletion and the susceptibility to oral squamous cell carcinoma in cigarette-smoking subjects. *Oral Oncol* 2005;41(5):515-9.
54. Rossit ARB, Conforti-Proes NDT. Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer. *Rev Soc Bras Cancerol* 2000;10:22-30.
55. Kietthubthwe S, Sriplung H, Au WW. Genetic and environmental interactions on oral cancer in Southern Thailand. *Environ Mol Mutagen* 2001;37(2):111-6.
56. Chang HW, Ling GS, Wei WI, Yuen AP. Smoking and drinking can induce p15 methylation in the upper aerodigestive tract of healthy individuals and patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2004;101(1):125-32.
57. To-Figueras J, Gené M, Gómez-Catalán J, Piqué E, Borrego N, Caballero M et al. Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphism in relation to laryngeal carcinoma risk. *Cancer Lett* 2002;187(1-2):95-101.
58. Li R, Folsom AR, Sharrett AR, Couper D, Bray M, Tyroer HA. Interaction of the glutathione S-transferase genes and cigarette smoking on risk of lower extremity arterial disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 2001; 154(3):729-38.
59. Goloni-Bertollo EM, Biselli JM, Correa LCL, Maniglia JV, Rossit ARB, Ruiz MT. et al., Avaliação da influência da nulidade dos genótipos *GSTT1* e *GSTM1* na carcinogênese em cabeça e pescoço. *Rev Assoc Med Bras* (in press), 2006.
60. Biselli JM, Leal RCAC, Ruiz MT, Maniglia JV, Rossit ARB, Goloni-Bertollo EM et al. Polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* em indivíduos tabagistas: com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. *Rev Bras Otorinolaringol*. No prelo 2006.

Correspondência:

Eny Maria Goloni Bertollo
Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 Bloco U6 – Laboratório UPGEM
15090-000 – São José do Rio Preto - SP
Tel: (17)3201-5720 Fax: (17)32015708
e-mail: eny.goloni@famerp.br

ARTIGO II

Artigo II: Análise clínica dos pacientes publicado em periódico internacional.

Título: Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo.

Autores: Alvarenga LM, **Ruiz MT**, Pavarino-Bertelli EC, Ruback MJC, Maniglia JV, Goloni-Bertollo EM.

Periódico: Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, 74: 68-73, 2008.

Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State

Larissa de Melo Alvarenga¹, Mariangela
Torreglosa Ruiz², Érika Cristina Pavarino-
Bertelli³, Maurício José Cabral Ruback⁴, José
Victor Maniglia⁵, Eny Maria Goloni-Bertollo⁶

Keywords: epidemiology, and neck neoplasia, tobacco and alcohol.

Summary

Head and neck cancer accounts for nearly 200.000 new cases worldwide. A mean of 13.470 new cases of cancer in the oral cavity for 100.000 inhabitants is observed in Brazil. **Aim:** To analyze clinical and epidemiological aspects in patients consulted in the Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery ward in a University hospital of Northwestern São Paulo, Brazil. **Materials and Methods:** A total of 427 patients consulted in the hospital in the period from 2000 to 2005 were investigated. The variables analyzed included: age, gender, occupation, skin color, tobacco and alcohol consumption, primary site of the tumor, clinical staging, degree of histological differentiation and outcome. The data was analyzed by descriptive and exploratory statistics. **Results:** Prevalence was found among men (86%), white color (90%), smokers (83.37%), and alcoholics (65.80%); the average age was 61 years, 24.25% of men were farmers and 60% of women, housekeepers. Primary site of tumor was usually in the oral cavity (35.37%), with histological squamous cell. The incidence of deaths was 164. **Conclusion:** This study has provided the profile of the patients assisted in this hospital; moreover, it has contributed to outline further programs for preventing this disease.

¹ Undergraduate Nurse.

² Master's degree in Biological Science, Biologist - Sao Jose do Rio Preto Medical School.

³ Doctorate in Biological Science, Adjunct Professor of Genetics - Sao Jose do Rio Preto Medical School.

⁴ Physician, Otorhinolaryngology and Head & Neck Surgery Specialist.

⁵ Associate Professor (livre-docente habilitation) of Otorhinolaryngology and Head & Neck Surgery.

⁶ Associate Professor (livre-docente habilitation) of Human and Medical Genetics, Associate Professor (livre-docente) of the Genetics Discipline, Sao Jose do Rio Preto Medical School.

Address for correspondence: Faculdade de Medicina de Sao Jose do Rio Preto - FAMERP UPGEM - Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular. Av. Brigadeiro Faria Lima 5416 Bloco U-6 São José do Rio Preto SP 15.090-000.

Scientific Initiation Scholarship - CNPq/PIBIC.

Paper submitted to the ABORL-CCF SGP (Management Publications System) on December 4th, 2006 and accepted for publication on August 11th, 2007. cod. 3543.

INTRODUCTION

Head and neck cancer is a collective term based on anatomical and topographic definitions for describing malignant tumors of the upper aerodigestive tract. This anatomical region comprises the oral cavity, the pharynx and the larynx. "Oral cancer" is one of the major subgroups of head and neck carcinomas; it involves the mucosa of the mouth (lips, base of tongue, tongue, floor of the mouth and the hard palate) and pharynx (oropharynx, hypopharynx and nasopharynx). About 40% of head and neck cancers occur in the oral cavity, 15% occur in the pharynx, 25% occur in the larynx and the remaining tumors occur in other sites (salivary glands and thyroid).¹ The most frequent histological type, occurring in over 90% of cases, is the squamous cell carcinoma.²

This disease is responsible for many deaths worldwide; it is the sixth cause of death by cancer. Each year approximately 200 thousand new cases of head and neck cancer are diagnosed worldwide.³ In Brazil, estimates indicate that there will be approximately 13,470 new cases of oral cavity cancer for each 100 thousand persons in 2008 (10,060 estimated in males and 3,410 estimated cases in females).⁴ The incidence of mouth cancer in Brazil is 2% of all cancers, one of the highest in the world, and significant in Latin America.⁵ The estimated mortality rate is approximately 12,300 deaths per year;⁶ the survival rate is 40 to 50% for diagnosed patients.^{7,8}

Epidemiological evidence shows that the incidence of head and neck cancer increases with age. In Europe, 98% of the patients are aged over 40 years.¹ This type of tumor is rare in young patients, involving only 4 to 6% of persons aged below 40 years, although this incidence has increased in a number of countries.⁹ The carcinogenetic mechanisms in this age group are still little known.^{1,8,10}

Smoking and alcohol drinking are well-established risk factors for head and neck cancer.¹¹ Although this form of cancer affects mostly males, there has been a significant increase in the incidence in females, probably reflecting changes in smoking and drinking habits.¹²

The aim of this paper was to describe the social and demographic profile of head and neck cancer patients at a university hospital, and to identify the risk factors (smoking and alcohol drinking) to support disease prevention programs.

SERIES AND METHOD

The Research Ethics Committee of our institution approved the research project (protocol 5566/2005).

A retrospective study was done of the medical files of head and neck cancer patients of the hospital Otorhinolaryngology Unit comprising six years between 2000 and 2005.

Variables were age, sex, occupation, skin color,

smoking and alcohol drinking habits, primary tumor site, clinical staging, histological differentiation, treatment and patient mortality.

Tumors were classified according to the anatomical site in the mouth, the pharynx and the larynx. The oral cavity was divided into the lips, the anterior 2/3 of the tongue, the palate, the oral mucosa, the gingiva, the retromolar trigone and the hard palate. The pharynx was divided into the following three separate regions: the oropharynx (soft palate and uvula, the tonsils, and the lateral and posterior walls), the hypopharynx (piriform sinuses, hypopharyngeal wall, the postcricoid region and non-postcricoid areas), and the nasopharynx (lateral walls, choanae). The larynx is subdivided into the supraglottis, the glottis and the subglottis.¹³

Tumor staging (TNM) was done according to the guidelines of the American Joint Committee on Cancer (AJCC).^{14,15} Initially, the files of 427 patients were analyzed, but only 372 were TNM-staged.

Data were compiled in the software Microsoft Excel and analyzed by exploratory descriptive statistics.

RESULTS

Data were collected from 427 patients seen between 2000 and 2005.

There were 367 male patients (86%) and 60 female patients (14%). Age ranged from 30 to 94 years (mean - 61.77 years; standard deviation - 11.44 years). Table 1 shows the age distribution of patients for each age group. Skin color was subdivided into two types (white and non-white). Non-white subjects were those with black, brown and oriental skin colors. In this study 90% of the subjects were white.

Table 1. Age distribution of head and neck cancer patients.

Age group	Number of patients (%)
30 a 40	9 (2,11)
41 a 50	66 (15,45)
51 a 60	121 (28,34)
61 a 70	127 (29,75)
71 a 80	82 (19,2)
81 a 90	20 (4,68)
> 90	2 (0,47)

The most frequent professional occupation in males was a rural activity (grower - 24.25%), followed by bricklayer (13.9%) and driver (11.17%). The most frequent occupation for females was housewife (60%) and rural activities (grower - 8.3%). Retirement with no specification

as to the previous occupation was reported by 8.17% of males and 15% of females (Table 2 and 3).

Smoking was a habit in 83.37% of the sample; 65.8% reported using alcoholic beverages; 55.27% of the sample reported having both habits; and 6.18% reported having neither habit. Quantities consumed were not documented.

Table 2. Occupation of male head and neck cancer patients.

Occupation of males	Number of patients (%)
Grower	89 (24,25)
Bricklayer	51 (13,9)
Driver	41 (11,17)
Retired	30 (8,17)
Shopkeeper	16 (4,36)
Non-specialized services	13 (3,55)
Carpenter	11 (3)
Painter	9 (2,45)
Guard	9 (2,45)
Other	98 (26,7)

Table 3. Occupation of female head and neck cancer patients.

Occupation of females	Number of patients (%)
Housewife	36 (60)
Retired	9 (15)
Grower	5 (8,3)
Other	10 (16,7)

Table 4 shows the primary tumor sites in 427 patients. The oral cavity had the highest rate, 35.37% (151 of the 427 cases).

Tables 5, 6 and 7 present tumor staging according to the malignant tumor classification (TNM) and their frequency in the primary tumor sites. This information was not reported in the files in 55 cases.

Table 4. Primary anatomical site in head and neck cancer patients.

Anatomical site	Number of patients (%)
Oral cavity	151 (35,37)
Larynx	133 (31,15)
Oropharynx	69 (16,15)
Hypopharynx	36 (8,43)
Nasopharynx	8 (1,88)
Unknown primary site	30 (7,02)

Table 5. Distribution of primary tumor anatomical sites according to the TNM classification (category T).

Category	Anatomical site	Number of patients (%)
T1	Oral cavity	26 (38)
	Larynx	26 (38)
	Oropharynx	9 (13)
	Hypopharynx	4 (6)
	Nasopharynx	3 (4)
T2	Oral cavity	39 (48)
	Larynx	27 (33)
	Oropharynx	11 (14)
	Hypopharynx	2 (2)
	Unknown primary site	2 (2)
T3	Oral cavity	32 (30)
	Larynx	38 (36)
	Oropharynx	17 (16)
	Hypopharynx	15 (14)
	Nasopharynx	2 (2)
T4	Unknown primary site	3 (3)
	Oral cavity	39 (41)
	Larynx	23 (24)
	Oropharynx	21 (22)
	Hypopharynx	10 (11)
Tx	Nasopharynx	1 (1)
	Unknown primary site	1 (1)
	Larynx	2 (9,5)
Tx	Nasopharynx	1 (4,75)
	Unknown primary site	18 (85,75)

There was a predominance of squamous cell carcinomas (SCC), which was present in 96.7% of cases. Other histological types were also found, such as non-Hodgkin's lymphoma, undifferentiated carcinomas and others (Table 8).

Indications for radiotherapy or surgery generally balanced out for T1 and T2 tumors; most of the T3 and T4 tumors, however, required multimode treatment, usually surgery and adjuvant radiotherapy. On the other hand, other factors may have influenced somewhat the choice of treatment, such as age, professional voice users, uncontrolled smoking or alcohol drinking, as well as social and economic factors that might have required short-term solutions. At our unit treatment includes surgery, chemotherapy and radiotherapy. Most of the patients underwent surgery associated with radiotherapy (33.25%).

There were 164 deaths out of 427 cases; lack of information in the charts precluded a survey of the causes of death in most patients.

Table 6. Distribution of primary tumor anatomical sites according to the TNM classification (category N).

Category	Anatomical site	Number of patients (%)
N0	Oral cavity	94 (40)
	Larynx	87 (37)
	Oropharynx	31 (13)
	Hypopharynx	15 (6)
	Nasopharynx	4 (2)
N1	Unknown primary site	2 (1)
	Oral cavity	25 (42)
	Larynx	13 (22)
	Oropharynx	13 (22)
	Hypopharynx	6 (10)
N2	Unknown primary site	3 (5)
	Oral cavity	12 (23)
	Larynx	9 (17)
	Oropharynx	12 (23)
	Hypopharynx	7 (13)
N3	Nasopharynx	3 (6)
	Unknown primary site	9 (17)
	Oral cavity	5 (21)
	Larynx	6 (25)
	Oropharynx	2 (8)
Nx	Hypopharynx	3 (13)
	Unknown primary site	8 (33)
	Larynx	1 (33)
	Unknown primary site	2 (67)

Table 7. Distribution of primary tumor anatomical sites according to the TNM classification (category M).

Category	Anatomical site	Number of patients (%)
M0	Oral cavity	120 (36)
	Larynx	111 (33)
	Oropharynx	54 (16)
	Hypopharynx	23 (7)
	Nasopharynx	6 (2)
M1	Unknown primary site	19 (6)
	Oral cavity	1 (25)
	Larynx	1 (25)
	Unknown primary site	2 (50)
	Oral cavity	15 (43)
Mx	Larynx	4 (11)
	Oropharynx	4 (11)
	Hypopharynx	8 (23)
	Nasopharynx	1 (3)
	Unknown primary site	3 (9)

Table 8. Histological differentiation of head and neck cancer patients.

Histological differentiation	Number of patients (%)
Squamous cell carcinoma (SCC)	413 (96,7)
Non-Hodgkin's lymphoma	3 (0,69)
Undifferentiated carcinoma	3 (0,69)
Other *	8 (1,92)

* adenocarcinoma, cystic adenoid carcinoma, clear cell carcinoma, mucoepithelioid carcinoma, poorly differentiated carcinoma.

DISCUSSION

Most of the subjects in our sample were aged between 51 and 70 years, which is similar to the data reported by the Head & Neck Unit of the Oncology Center, Oswaldo Cruz University Hospital, in the state of Pernambuco; their data shows that 55.82% of these tumors occur in this age group.¹⁶

Our finding that there is a higher incidence of head and neck tumors in males is similar to existing reports in the literature.² Head and neck tumors are relatively rare in females,¹⁷ particularly in developing countries, where males predominate.¹⁸ In recent years there has been a significant increase in the incidence of head and neck tumors in females, probably due to changes in smoking and alcohol drinking habits.¹² There were more rural workers among males, and more housewives among females. A survey undertaken at the Head & Neck Surgery Unit of the Heliopolis Hospital in the state of Sao Paulo revealed that the most frequent occupation among males was that

of bricklayer, with rural activities in sixth place; the most frequent occupation for females was that of housewife, followed by rural activities.¹⁹ It should be noted that rural work exposes individuals constantly to the sun and to carcinogens, which helps promote cancer development.^{19,20} Another study done at the same hospital showed that about 85% of male and female patients were white.¹⁹ White was also the predominant skin color in our sample (90%).

Most of our patients were smokers (83,37%) and alcohol drinkers (65,8%), which strengthens the association between alcohol drinking and smoking and head and neck cancers.¹ Many studies have shown a consistent relation between tobacco and alcohol, and cancer of the larynx and oral cavity.^{1,21-23}

The most frequent tumor site in our series was the oral cavity (35,37%), followed by the larynx (31,15%). Epidemiological studies have also reported that 40% of head and neck cancers occur in the oral cavity.¹ This

finding appears to reflect smoking and alcohol drinking habits, which may increase two or threefold the risk of these diseases in the oral cavity.^{9,31}

The TNM classification of our series revealed that 25% of the cases were T3, 35.65% of the cases had lymph node involvement, and 2% presented metastases, showing that advanced disease was present upon the diagnosis. The literature reports that a high frequency of head and neck cancer cases are diagnosed at an advanced stage,²⁴ as we ourselves also demonstrated. A Brazilian study, taking place in a developing country, shows statistically significant differences in these features compared to the findings of studies about patients from institutions in developed countries.¹⁷

The most representative histological type was the squamous cell carcinoma (96.7% of cases). Another study done in the state of Pernambuco has reported this type as the most frequent.¹⁶ The literature shows that over 90% of the cases of head and neck cancer are squamous cell carcinoma.²²

Open surgery and external radiotherapy are fundamental approaches to treat carcinomas.²³ Radiotherapy associated with surgery was the predominant approach in our series (33.25%), followed by radiotherapy only (28.10%). In another study, 528 out of 1,010 cases underwent surgery, 335 were treated by both surgery and radiotherapy, and 67 were treated by surgery, radiotherapy and chemotherapy.²⁵ In our sample only 23 cases were treated with surgery associated with chemotherapy.

There were 164 deaths (38.4%) between 2000 and 2005. Head and neck cancer is characterized by local aggressiveness and by a high recurrence rate of secondary tumors with a high mortality rate.¹⁰

High-risk populations should be targeted for educational and surveillance programs. These programs and measures can attenuate the unfavorable outcomes in patients with mouth cancer, and decrease the risk of developing secondary tumors.

CONCLUSION

The analysis of 427 patients seen at a university hospital between 2000 and 2005 is in agreement with data reported in the literature showing that head and neck cancer is more frequent in male smokers aged over 40 years. Medical data reveal that the primary site in most of the patients is the oral cavity. Identifying the risk factors for these patients may enable strategies for implementing prevention programs against this disease.

REFERENCES

1. Dobrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer and Metastasis Rev* 2005;24:9-17.
2. Deditis RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma epinoecular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorinolaringol* 2004;70:35-40.
3. Walker DM, Boey G, McDonald LA. The pathology of oral cancer. *Pathology* 2003;35:376-83.
4. Home Page: Instituto Nacional do Câncer. [citado em 2005 Nov]. Disponível em <http://www.inca.gov.br>.
5. Wunsch V. Epidemiologia do câncer de laringe no Brasil. *Sao Paulo Med J* 2004;122:188-94.
6. McMahon S, Chen AY. Head and neck cancer. *Cancer and Metastasis Rev* 2003;22:21-4.
7. Franceshi S, Bidoli E, Herrero R, Munoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: Etiological clues. *Oral Oncol* 2000;36:106-15.
8. Zender CA, Petruzzelli GJ. Why do patients with head and neck squamous cell carcinoma experience distant metastases: can they be prevented? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13:101-4.
9. Iamarnom A, Pattanapom K, Pongsiriwet S, Wanachantararak SW, Prapayasatok S, Jitidecharaks S, et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33:84-8.
10. Kim ES, Hong WK, Khuri FR. Chemoprevention of aerodigestive tract cancers. *Annu Rev Med* 2002;53:223-43.
11. Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya S. An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncol* 2004;40:304-13.
12. Bradley PJ, Raghavan U. Cancer presenting in the head and neck during pregnancy. *Curr Opin Otolaryngol & Head Neck Surg* 2004;12:76-81.
13. Lee KJ. *Essential otolaryngology: head e neck surgery*. 8th ed. New Haven (Connecticut): McGraw-Hill; 2003.
14. Instituto Nacional do Câncer. UICC- União Internacional Contra o Câncer, 2002 - TNM - Classificação de Tumores Malignos 6ª. Edição. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA 2004.
15. Greene FLPD, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M. *AJCC Cancer Staging Manual* 6 ed. Springer (NY), 2002.
16. Antunes AA, Antunes AP. Estudo retrospectivo e revisão de literatura dos tumores dos lábios: experiência de 28 anos. *Rev Bras Cancerologia* 2004;50:295-300.
17. Carvalho AL, Bruvanesh S, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head Neck* 2004;26:31-8.
18. Stewart BW, Kleihues P. *World Cancer Report*, WHO International Agency for Research on Cancer, IARC Press, Lyon, 2003.
19. Carvalho MB, Lenzi J, Lehn CN, Fava AS, Amar A, Kanda JL, Walder F, Menezes MB, Franzi AS, Magalhães MR, Curioni OA, Marcel R, Szeliga S, Sobrinho J, Rapoport A. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino. *Rev. Assoc Med Bras* 2001;47:208-14.
20. Scully C, Porter S. Oral cancer. *WJM* 2001;174:348-51.

21. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang M-J, Jen J Sidransky D. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000;60:3155-9.
22. Casiglia J, Woo SB. A comprehensive review of oral cancer. *Gen Dent* 2001;49:72-82.
23. Zain RB. Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer - a brief overview. *Oral Oncol* 2001;37:205-10.
24. Herchenhorn D, Dias FL. Avanços no tratamento quimioterápico e radioterápico do câncer de cabeça e pescoço. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 2004;59:39-46.
25. Filho FSA, Sobrinho JA, Rapoport A, Ferreira NN, Juliano Y. Paradigma da disseminação linfática no carcinoma espinocelular da base de língua. *Rev Col Bras Cir* 2006;33:79-83.
26. Campos GG, Reis JGC, El Hadj LA, Araújo ML, Mello PP, Melo LFP. Laringectomia frontal anterior: técnica de Tucker. Estudo retrospectivo. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2004;70:171-6.

ARTIGO III

Artigo III: Resultados sobre a análise do polimorfismo MTR A2756G submetido para publicação em periódico internacional.

Título: Methionine synthase gene polymorphism (MTR) and risk of head and neck cancer.

Autores: Galbiatti ALS, **Ruiz MT**, Biselli PM, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino-Bertelli EC, Goloni-Bertollo EM.

Periódico: Oral Oncology

Methionine synthase gene polymorphism (MTR) and risk of head and neck cancer.

A.L.S Galbiatti¹, M.T Ruiz¹, P.M Biselli¹, L.S Raposo², J.V Maníglia², E.C Pavarino-Bertelli.¹ e E.M Goloni-Bertollo.¹

¹ Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular- UPGEM, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- Brasil, ² Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço de Medicina de São José do Rio Preto – Brasil

Head and neck cancer may be caused by changes in DNA methylation associated with the deficiency of folate. Low folate levels may also reduce the ability to repair DNA, resulting in malignant cell alterations. The A2756G polymorphism of the methionine synthase gene (*MTR*) may lead to alteration of the MTR enzyme, involved in the pathway of folate and, therefore, may be a risk factor for cancer. We evaluated the frequency of the *MTR* A2756G polymorphism in patients with head and neck cancer and in individuals without any history of neoplasias and to investigate the association of this polymorphism with clinical parameters. One overall of 705 individuals was included in the study (236 with head and neck cancer and 469 without history of cancer). The PCR-RFLP technique was performed for genotyping of A2756G polymorphism of the gene *MTR*. For statistical analysis were used chi-square test (univariate analysis), binary logistic regression (multivariate analysis) and Log-Rank test. The results showed that tobacco consumption ($p < 0.001$), alcohol consumption ($p < 0.001$), age > 42 years ($p < 0.001$), AG genotype ($p = 0.019$) and G allele ($p = 0.028$) can be predictors of the disease. There was a higher frequency of carriers of the polymorphic allele in the men group with cancer in relation to men group without the

disease ($p = 0.008$), however, the male gender was not predictor for the development of head and neck cancer. The analysis of polymorphism regarding clinical parameters did not show association with the primary sites, aggressiveness, lymph nodes involvement, and extension of the tumor. In conclusion, an association between the *MTR* A2756G polymorphism and the risk for head and neck cancer was observed.

Introduction

“Head and neck cancer” is a term defined by anatomical and topographical databases to describe malignant tumors of the upper aerodigestive tract, anatomical region that includes oral cavity, pharynx and larynx.¹

The most frequent histological type is the squamous cell carcinoma accounting for 90%.^{2,3} This cancer can be developed in an epithelium subject to a cancerization field, proposed by Slaughter and collaborators (1953).⁴ The factors that seem to promote this field include environmental exposures to tobacco and alcohol, viral infections, especially with the 16 and 18 virus papiloma subtypes and vitamin and micronutrient deficiencies, such as folate, vitamins A, C, E, selenium and zinc.⁵⁻¹¹

Low folate levels may increase the risk of cancer by causing hipometilation of DNA and, consequently, activation of proto-oncogenes that lead to malignant transformation. The DNA methylation is the transfer of methyl groups (CH₃) to position 5' of residues cytosines located in dinucleotides cytosine-guanine (CpG), through reactions catalyzed by proteins called DNA methyltransferases.¹² This epigenetic modification of the DNA has several functional roles, including control of gene expression,¹³ stability of the structure of cromatin⁽¹²⁾ and maintenance of genomics stability.¹⁴

Folate deficiency is also associated with reduced capacity to repair DNA.¹⁵ This relationship is due to the importance of folate in the synthesis of purines and thymine. The Thymidilate synthase enzyme catalyzes the conversion of deoxyuridine (dUMP) to deoxythymidine monophosphate (dTMP) using 5,10 methylenetetrahydrofolate as donor of methyl groups. Under low concentrations of folate, dUMP can be accumulated, inducing the incorporation of uracil to DNA instead of thymine. DNA repair enzymes remove misincorporated uracil of DNA, resulting in temporary breaks in the molecule, which are, afterwards, sealed by the DNA ligase enzyme. However, if the availability of folate is continuously limited, the uracil misincorporation and repair of the DNA molecule can occur continuously in a cycle of uncontrolled repair, resulting in frequent breaks in DNA and chromosomal damage, resulting in malignant cell alteration.¹⁶⁻¹⁹

The relationship between the presence of polymorphisms of genes involved in the folate metabolism and the risk for head and neck cancer is based on the influence of them in the reactions of cellular methylation and DNA synthesis and, thus, in maintaining the structure of chromatin and chromosome stability. The *Methionine synthase (MTR)* gene, located in chromosome 1q43,²⁰ encodes the methionine synthase enzyme, which is involved in the folate metabolism, catalyzes the remethylation of homocysteine (Hcy) to methionine, reaction essential for adequate maintenance of methionine and intracellular normal homocysteine concentration.^{21,22}

The basis alteration adenine to guanine in position 2756 of the *MTR* gene results in the replacement of the amino acid aspartic to glycine in codon 919 of the protein²³ and is related to alterations in metabolic pathway of folate.²⁴

Results of research on the influence of the polymorphism *MTR* A2756G in the development of cancer are contradictory. Some studies show association with colon,²⁵

lung²⁶ and breast,²⁷ cancer and relationship with tumor aggressiveness and different responses to the treatment of esophagus cancer.²⁸ Other studies have not confirmed the association between polymorphism and various types of cancer, including colorectal,^{29,30} lung,³¹ bladder³² and stomach cancer.³³

Few studies evaluated the influence of *MTR* A2756G polymorphism in the development of head and neck cancer.^{34,35} The increased risk for this type of cancer was associated to the presence of G polymorphic allele (AG and GG genotypes) in the study of Zhang and collaborators (2005).³⁴ On the other hand, study of Suzuki and collaborators (2007)³⁵ showed no influence of this polymorphism alone, but showed interaction between the *MTR* 2756GG genotype and the alcohol consumption in risk for head and neck cancer.

Based on the presented evidences, the aim of this study was to compare the frequency of the *MTR* A2756G polymorphism in patients with head and neck cancer with those observed in individuals with no history of cancer, and to investigate the association of this polymorphism with clinical analyzed characteristics.

Patients and Methods

In this study, 236 patients with head and neck cancer, and 469 individuals with no history of cancer assisted in the Head and Neck Surgery services of Hospital de Base, São Jose do Rio Preto – SP, Brazil were evaluated. All samples were obtained after free and informed consent. The study was initiated after approval of the Ethics Committee of Research (CEP). The diagnosis was made from pathological specimens after total excision or biopsy. All tumor cell types were squamous cell carcinoma and the samples were collected before beginning the treatment.

The analyzed variables were gender, age, exposure to risk factors (tobacco and alcohol consumption), primary site of occurrence, aggressiveness, extension of the tumor and lymph node involvement. Individuals who have smoked ≥ 100 cigarettes in their lifetime and now smoke every day or some days were considered smokers. Individuals who have drunk four drinks a week were considered alcohol consumers.^{36,37}

The tumors were classified according to the parameters of the International Union of Cancer Control (UICC), 2002 and American Joint Committee for Cancer (AJCC), 2002, following three criteria: extension of the tumor (T), presence of regional lymph nodes involved (N) and presence of metastasis at a distance (M).³⁸

The genomic DNA was obtained from peripheral blood following Miller and collaborators (1988) with modifications.³⁹ PCR-RFLP technique (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) was used to determine the genotypes *MTR* A2756G. The primers used were: sense 5'-CCA GGG TGC GAC GTA TAC AG - 3' and anti-sense 5' - GCC TTT TAC ACT CCT CAA AAC C - 3'. The amplification was obtained with initial denaturation at 94° C during 4 minutes, followed by 30 cycles at 94° C during 1 minute to denaturation of DNA, 56° C during 1 minute to

annealing the primers and 72° C during 1 minute to extension. A final cycle during 10 minutes at 72° C was performed for final extension. The product of 498 base pairs (bp) was submitted to digestion with restriction enzyme *Hae III*, during 2 hours to 37° C, according to the manufacturer's instructions. The fragments were analyzed in 2% agarose gel, after staining with ethidium bromide. In the presence of G polymorphic allele, fragments of 390, 123 and 85 bp were generated, and in the presence of the A allele, fragments of 413 and 85 bp were observed.

Statistical analysis

Data were presented as mean and standard deviation, numbers or proportions (percentages). Comparisons between the groups were performed using the Chi-square test (univariate analysis). This test was also used for analysis of Hardy-Weinberg's balance, using the BioEstat program. Multiple logistic regression models were used to determine the effect of *MTR* A2756G polymorphism on the variables in head and neck squamous cell carcinoma. The model included age (divided by quartis), gender (reference: female), smoking habits (reference: non-smokers) and drinking habits (reference: non-drinkers). Results are shown as odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% CI).

The clinicopathological features were analyzed by multiple logistic regression. Tumor classification was divided into low T (T1,T2) and high T (T3,T4) classification categories. N classification was dichotomized into negative involvement of lymph nodes (N0) and positive involvement (N1, N2, N3). Stage grouping was divided into early stage (Stage I or II) and advanced stage (Stage III or IV) categories.

The Kaplan-Meier method was used to examine the survival rates and time of disease recurrence. Log-rank test was used to assess the differences considering the different genotypes.

Statistical analyses were performed using the computer program Minitab for Windows (Version 12.22). Value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Sample characterization

The characteristics of the population are described in Table 1. An overall of 705 individuals (236 patients and 469 controls), with mean age of 52.5 ± 13.7 years, was included in this analysis. Five hundred and twenty-nine were men (75%) and 176 were women (25%). There were statistically significant differences between patients and controls for age, gender, smoking and drinking habits.

Among the patients with cancer, 38.1% had oral cavity as a site of primary tumor, followed by larynx (32.2%) and pharynx (25%). In 4.7% of cases the primary site was not known.

Analysis of *MTR* A2756G polymorphism

Table 2 shows the allelic and genotypic distributions in patients with head and neck cancer and control individuals. There were no significant statistical differences between both groups regarding genotypes ($p = 0.148$) and allelic ($p = 0.185$) frequencies.

Hardy-Weinberg Equilibrium test showed that genotypic distribution was similar to the expected in both groups: case and control ($X^2 = 0.028$, $p = 0.868$ and $X^2 = 2.868$; $p = 0.09$, respectively).

The frequency of the G polymorphic allele (AG and GG genotypes) was stratified for gender (Table 3). There was higher frequency of carriers of the G variant allele in the group of men with head and neck cancer in relation to the group of men with no history of cancer ($p = 0.008$). No difference between patients and controls ($p = 0.335$) was observed among females.

Since the matching between demographic data and risk factors between patients with cancer and individuals control was not possible, the multivariate analysis was performed for the adjustment of these variables. The following variables were included: age in quartiles (<42 years, 42-51 years, 51-63 years and > 63 years), gender, tobacco and alcohol consumption and *MTR* A2756G polymorphism. Tobacco ($p < 0.001$), alcohol ($p < 0.001$), age > 42 years ($p < 0.001$), AG heterozygous genotype ($p = 0.019$) and G polymorphic allele ($p = 0.028$) were predictors for the disease (Table 4).

The analysis of polymorphism for clinical parameters did not show association with the primary site of tumor ($p = 0.12$), extension of the tumor ($p = 0.38$), lymph nodes involvement ($p = 0.35$) and stage of tumor ($p = 0.18$).

The survival curve of the Kaplan-Meier considering the different *MTR* genotypes is shown in Figure 1. There was no significant statistical difference between the presence of polymorphism and survival ($p = 0.52$) and between the presence of polymorphism and time to the disease recurrence ($p = 0.25$).

Discussion

Evidence suggests that the folate deficiency is related to the cause of the head and neck squamous cell carcinoma^{40,41} and the *MTR* gene plays an important role in the folate metabolism.²²

MTR A2756G polymorphism has also been associated with variations in Hcy concentrations. Fillon-Ermery and collaborators (2004)⁴² associated elevated Hcy concentrations with the presence of the wild-type allele (A), while Laraqui and collaborators (2006) observed a correlation with the polymorphic allele (G).⁴³

Association between the A2756G polymorphism of the gene *MTR* and the development of some types of cancer has been shown in previous studies,^(25,26,27) while others did not confirm these findings.²⁹⁻³³ In head and neck cancer, only two studies investigated this polymorphism.^{34,35} Zhang and collaborators (2005)³⁴ showed that the *MTR* 2756AG heterozygous genotype is associated with the risk for developing head and neck squamous cell carcinoma, while Suzuki and collaborators (2007)³⁵ have not observed any association between the presence of *MTR* A2756G polymorphism and the risk for the disease. The latter demonstrated an interaction of alcohol consumption and 2756GG genotype in risk for this type of cancer.

In the present study, the results did not show significant differences in allelic and genotypic distributions between both groups (patients with head and neck cancer *versus* control subjects) according to univariate analysis. However, multivariate analysis, performed after adjusting for gender, age, tobacco and alcohol consumption, showed that the G polymorphic allele and AG heterozygous are associated with increased risk for the disease with odds ratio (OR) of 1.60 and 1.69, respectively.

Advanced age (> 42 years), tobacco and alcohol consumption were also associated with head and neck cancer in the multivariate analysis. These are well-established risk factors for head and neck cancer, and this type of malignancy occurs more frequently in individuals with older age.⁴⁰

The univariate analysis showed that men with head and neck cancer had a higher frequency of the G polymorphic allele than men with no history of cancer. Our study did not corroborate with the findings of Zhang and collaborators (2005)⁽³⁴⁾ who observed that the *MTR* 2756AG genotype is associated with an increased risk for this type of cancer, especially in younger individuals, women and former smokers. However, in multivariate analysis, the male gender was not a predictor for cancer, while ages over 42 years and tobacco and alcohol consumption maintained significant statistics.

Regarding to site of occurrence, aggressiveness, extension of the tumor and lymph node involvement, our study did not find any association with the *MTR* A2756G polymorphism. The association between tumor aggressiveness and this polymorphism was also evaluated with in esophagus cancer; individuals with this type of cancer and *MTR* 2756AG genotype or *MTR* 2756GG had higher survival regarding carriers of the *MTR* 2756AA homozygous genotype. The results of this study reported that tumors of individuals *MTR* 2756GG showed histopathological regression in 46.2% of cases, while tumors of individuals with *MTR* 2756AA genotype have not regressed.²⁸

In our study the G polymorphic allele of the *MTR* gene was not associated with survival time and tumor recurrence. No data were found in the literature assessing the Kaplan-Meier curve according to the *MTR* polymorphism in patients with head and neck cancer.

Due the lack of data on the influence the *MTR* A2756G polymorphism in the etiology of head and neck cancer, further studies are needed to show the role of this polymorphism in the disease development. Moreover, study of other enzymes involved in the folate metabolism, and plasmatic concentrations and other derivatives could contribute to the understanding of the factors involved in the etiology of head and neck cancer.

In conclusion, an association between the *MTR* A2756G polymorphism and the risk for head and neck cancer and higher frequency of carriers of the G variant allele in the group of men with head and neck cancer in relation to the group of men with no history of cancer were observed; furthermore, this finding confirm the importance of folate metabolism in the process of head and neck carcinogenesis.

References

1. Rogin CCR, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on a Human Papillomavirus. *J Den Res* 2007; 86: 104-14.
2. Casiglia AJ, Woo SB. A comprehensive review of oral cancer. *Gen Dent* 2001; 49: 72-82.
3. Reichart PA. Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. *Clin Oral Invest* 2001; 05: 207-213.
4. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953; 05: 963-8.
5. Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 1992; 18:1–29.

6. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 1996; 10:1027-39.
7. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr.* 2000; 02: 129-32.
8. Raval GN, Sainger RN, Rawal RM, et al. Vitamin B12 and folate status in head and neck cancer. *Asian Pac J Cancer* 2002; 03:155–62.
9. Lingen M, Sturgis EM, Kies MS. Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers: clinical and biologic characteristics and implications for management. *Curr Opin Oncol* 2001; 13: 176–82.
10. Pelucchi C, Talamini R, Negri E, Levi F, Conti E, Francheschi S, La Vecchia C. Folate intake and risk of oral and pharyngeal cancer. *Ann Oncol* 2003; 14:1677–81.
11. Kane MA. The role of folates in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Canc Detect and Prev* 2006; 29: 46-53.
12. D'Alessio AC, Szyf M. Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem Cell Biol* 2006; 84: 463-76.
13. Ehrlich M. The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease. *Clin. Immunol* 2003; 109: 17-28.
14. Tuck-Muller CM, Narayan A, Tsien F, Smeets DF, Sawyer J, Fiala ES, et al. DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 89: 121-8.
15. Wei O, Shen H, Wang LE, Duphorne CM, Pillow PC, Guo Z, et al. Association between low dietary folate intake and suboptimal cellular DNA repair capacity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 963–9.

16. Reidy JA. Folate and deoxyuridine-sensitive chromatid breakage may result from DNA repair during G2. *Mutat Res* 1987; 192: 217-9.
17. Blount BC, Ames BN. DNA damage in folate deficiency. *Baillieres Clin Haematol* 1995; 08: 461-78.
18. Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull* 1999; 55:578–92.
19. Ames BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res* 2001; 475: 07-20.
20. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 1996; 05: 1867-74.
21. Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3059– 64.
22. Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 423–43.
23. Van der Put NM, Van der Molen EF, Kluijtmans LA, Heil SG, Trijbels JM, Eskes TK, et al. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM* 1997; 90: 511–17.

24. Harmon DL, Shields DC, Woodside JV, McMaster D, Yarnell JWG, Young IS, et al. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Gen Epidemiol* 1999; 17: 298– 309.
25. Chen K, Song L, Jin MJ, Fan CH, Jiang QT, Yu WP. Association between genetic polymorphisms in folate metabolic enzyme genes and colorectal cancer: a nested case-control study. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2006; 28: 429-32.
26. Shi Q, Zhang Z, Li G, Pillow PC, Hernandez LM, Spitz MR, et al. Polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase and risk of lung cancer: a case-control analysis. *Pharmacogenet Genomics* 2005, 15: 547-55.
27. Lissowska J, Gaudet MM, Brinton LA, Chanock SJ, Peplonska B, Welch R, et al. Genetic polymorphisms in the one-carbon metabolism pathway and breast cancer risk: a population-based case-control study and meta-analyses. *Int J Câncer* 2007; 120: 2696-703.
28. Sarbia M, Stahl M, Von Weyhern C, Weirich G, Puhlinger-Oppermann F. The prognostic significance of genetic polymorphisms (Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T, Methionine Synthase A2756G, Thymidilate Synthase tandem repeat polymorphism) in multimodally treated oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2006; 94:203-7.
29. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J, et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocysteine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 08: 825– 9.

30. Kun Chen, Qin-Ting Jiang, Han-Qing He. Relationship between metabolic enzyme polymorphism and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 331-5.
31. Suzuki T, Matsuo K, Hiraki A, Saito T, Sato S, Yatabe Y, et al. Impact of one-carbon metabolism-related gene polymorphisms on risk of lung cancer in Japan: a case control study. *Carcinogenesis* 2007; 08:1718-25.
32. Moore LE, Malats N, Rothman N, Real FX, Kogevinas M, Karami S, et al. Polymorphisms in one-carbon metabolism and trans-sulfuration pathway genes and susceptibility to bladder cancer. *Int J Cancer* 2007; 120:2452-8.
33. Zhang FF, Terry MB, Hou L, Chen J, Lissowska J, Yeager M, et al. Genetic polymorphisms in folate metabolism and the risk of stomach cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007 01:115-21.
34. Zhang Z, Shi Q, Liu Z, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of Methionine Synthase and Methionine Synthase Reductase and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: a Case-Control Analysis. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2005; 14: 1188-93.
35. Suzuki T, Matsuo K, Hasegawa Y, Hiraki A, Wakai K, Hirose K, et al. One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of head and neck squamous cell carcinoma: case-control study. *Cancer Sci* 2007, 09:1439-46.
36. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang MJ, Jen J, Sidransky D. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000; 60:3155-9.

37. Kjaerhein K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancer: a prospective study of 10.900 Norwegian men. *Cancer Causes and Control* 1998; 9: 99-108.
38. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. In: UICC- União Internacional Contra o Câncer, 2002 – TNM – Classificação de Tumores Malignos 6^a. edition . Rio de Janeiro: INCA 2004, 254 p.
39. Miller SA, Dikes DD e Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988; 16: 1215.
40. Argiris A, Karamouzis MV, David Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *J Lancet* 2008, 371: 1695-1709.
41. Eleftheriadou A, Chalastras T, Ferekidou E, Yiotaxis I, Kyrou L, Tzagarakis M et al. Association between squamous cell carcinoma of the head and neck and serum folate and homocysteine. *Anticancer Res* 2006; 26:2345-8.
42. Fillon-Emery N, Chango A, Mircher C, Barbe F, Blehault H, Hebert B, et al. Homocysteine concentrations in adults with trisomy 21: effect of B vitamins and genetic polymorphisms. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:1551-7.
43. Laraqui A, Allani A, Carrie A, Coffard AS, Benkouka F, Benjoaud A. Influence of Methionine synthase (A2756G) and Methionine synthase reductase (A66G) polymorphisms on plasma homocysteine levels and relation to risk of coronary artery disease. *Acta Cardiol* 2006; 61: 51-61.

Table 1. Demographic characteristics of patients with head and neck cancer and control individuals.

Evaluated characteristics	Patients n (%) N= 236	Controls n (%) N = 469	p
Age			< 0.0001
< 42	07 (3.0)	170 (36.0)	
42 - 51	15 (6.5)	177 (38.0)	
51 - 63	63 (27.0)	122 (26.0)	
> 63	151 (63.5)	0 (0)	
Gender			< 0.0001
Male	203 (86.02)	326 (69.51)	
Female	33 (13.98)	143 (30.49)	
Tobacco consumption			< 0.0001
Smokers	211 (89.41)	229 (48.83)	
Non-smokers	25 (10.59)	240 (51.17)	
Alcohol consumption			< 0.0001
Alcohol consumers	184 (77.97)	219 (46.70)	
Alcohol non-consumers	52 (22.03)	250 (53.30)	

Table 2. Allelic and genotypic distributions in patients with head and neck cancer and control individuals.

<i>MTR A2756G</i>	Patients	Controls
AA, n (%)	155 (65.7)	340 (72.5)
AG, n (%)	73 (31.0)	113 (24.0)
GG, n (%)	08 (3.3)	16 (3.5)
A allele frequency	0.81	0.85
G allele frequency	0.19	0.15

Table 3. Distribution of *MTR* A2756G polymorphism in controls and patients with head and neck cancer.

Group	AA		AG + GG	
	M (%)	F (%)	M(%)	F (%)
Patients	130 (55)	25 (10.5)	73 (31)	08 (3.5)
Controls	244 (52)	96(20)	82 (17.5)	47 (12.5)

M – male F – female

Table 4. Distribution of demographic data, risk factors, genotypes, *MTR* 2756 alleles and odds ratio (OR) for the head and neck cancer.

Variables	p	OR (95% CI)
Tobacco consumption		
Non-smokers		reference
Smokers	< 0.001	4.49 (2.68 – 7.54)
Alcohol consumption		
Alcohol non-consumers		reference
Alcohol consumers	< 0.001	2.30 (1.46 – 3.63)
Gender		
Female		reference
Male	0.547	1.18 (0.69 – 2.01)
Age		
< 42		reference
42 - 51	< 0.001	4.72 (2.29 – 9.72)
51 - 63	< 0.001	19.45 (9.55 – 39.59)
> 63	< 0.001	11.01 (5.33 – 22.72)
<i>MTR</i> 2756 Genotypes		
AA		reference
AG	0.019	1.69 (1.09 – 2.62)
GG	0.891	1.08 (0.37 – 3.13)
<i>MTR</i> 2756 Alleles		
A		reference
G	0.028	1.60 (1.05 – 2.44)

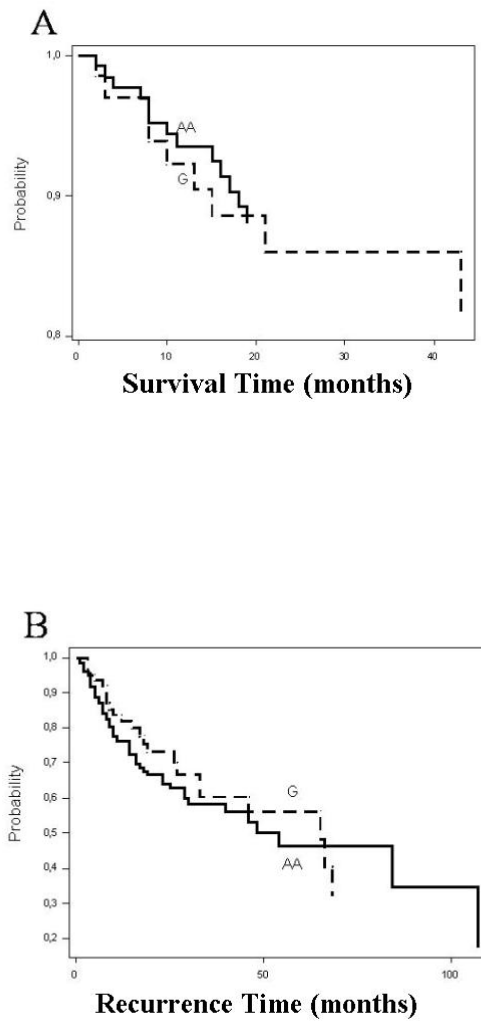


Figure 1. Kaplan-Meier curve representing (A) *Survival Time* - Patients with the G allele had a higher survival rate than those with the AA genotype. (B) *Recurrence Time* - Patients with AA genotype had a higher recurrence rate than those with G allele.

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

ORAL ONCOLOGY

Contact us  Help ? 

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Username: eny_goloni
Role: Author 

EES Version: 5.0

Submissions Being Processed for Author Eny Maria Goloni-Bertollo, Ph.D

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action 	Manuscript Number 	Title 	Initial Date Submitted 	Status Date 	Current Status 
Action Links		Methionine synthase gene polymorphism (MTR) and risk of head and neck cancer.	Sep 15, 2008	Sep 15, 2008	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

[Help](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms and Conditions](#)

© 2006 - 2007 Elsevier BV.

ARTIGO IV

Artigo IV: Resultados sobre a análise do polimorfismo –1154 *VEGF* submetido para publicação em periódico internacional.

Título: Vascular endothelial growth factor genetic variability and head and neck cancer in Brazilian population

Autores: Ruiz MT, Biselli PM, Maniglia JV, Pavarino-Bertelli EC, Goloni-Bertollo EM

Periódico: Archives of Medical Research

Vascular endothelial growth factor genetic variability and head and neck cancer in a Brazilian population

Mariangela Torreglosa Ruiz^a, Patrícia Matos Biselli^a, José Victor Maniglia^b, Érika Cristina Pavarino-Bertelli^a, Eny Maria Goloni-Bertollo^a

^a Department of Molecular Biology and ^b Head and Neck Surgery Department, Medical School in São José do Rio Preto, São Paulo – (FAMERP), São Paulo, Brazil

Reprint requests to: Eny Maria Goloni-Bertollo, PhD.

Molecular Biology Department, Medical School of São José do Rio Preto - FAMERP.

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416

CEP 15090-000

São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Phone: +55 17 3201-5720; Fax: +55 17 3201-5841

e-mail: eny.goloni@famerp.br

Abstract:

Background: Head and neck cancer is responsible for a high mortality rate, with a frequency of nearly 481,100 new cases annually. Smoking and alcoholism are the main etiological factors of this disease. The vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most potent endothelial cell mitogens and plays a critical role in angiogenesis. The aims of this study were to evaluate the association of the -1154G/A polymorphism of the *VEGF* gene with head and neck cancer and the interaction of this polymorphism with lifestyle and demographic factors. Additionally, the *VEGF* genotype distribution was investigated in respect to the clinicopathological features of head and neck cancer patients. **Methods:** The study included 100 patients with head and neck cancer and 176 individuals without any history of neoplasias. Molecular analysis of was performed after extraction of genomic DNA using the Real Time PCR technique.

Results: This investigation did not identify significant differences between healthy individuals and patients. However, an analysis of the clinicopathological features showed a decreased frequency of the A allele polymorphism in advanced (T3 and T4) tumors (OR = 0.36; CI 95% 0.14 - 0.93; p = 0.0345). **Conclusion:** The -1154 A allele of the *VEGF* gene decreases the risk of tumor growth and may be an important biomarker in head and neck cancer.

Keys words: head and neck cancer, polymorphisms, *VEGF* gene

Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) remains a significant cause of morbidity and mortality; worldwide, 481,100 new cases are reported annually. Two-thirds occur in developing countries, with an overall 5-year mortality rate of approximately 50% (1,2). In São Paulo State, Brazil, an occurrence of 4,510 new cases was estimated for 2008 (3).

The growth of solid tumors depends on angiogenesis, the process by which new blood vessels develop from the endothelium of the preexisting vasculature. Tumors promote angiogenesis by secreting or activating angiogenic factors that stimulate endothelial migration, proliferation, and capillary morphogenesis. Newly formed blood vessels supply the tumor with nutrients and oxygen, dispose of the metabolic waste products of tumor cells, generate paracrine stimuli, and provide potential routes for tumor dissemination. Thus, tumor-induced angiogenesis plays a pivotal role in cancer progression and metastasis (4,5).

The vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most potent endothelial cell mitogens and plays a critical role in angiogenesis. VEGF binds specifically to two transmembrane VEGF receptor tyrosine kinases on endothelial cells to initiate intracellular signal transduction pathways that mediate angiogenesis and vascular permeability (6). Angiogenesis properties are correlated with tumor aggressiveness, with intratumor microvessel density having been identified as an independent prognostic factor (7).

VEGF forms the new blood vessels of the tumor by acting as an endothelial cell mitogen, thereby promoting the growth and invasion of the tumor. VEGF functions to

increase the vascular permeability, which causes edema in the extracellular matrix and supports the spouting and splitting of new blood vessels by making fibrin freely available; VEGF also allows the intravascular circulating tumor cells to easily penetrate the basement membrane of blood vessels (8).

Several lines of compelling evidence from *in vitro* and *in vivo* experiments have shown that increased *VEGF* expression is associated to tumor growth and metastasis, whereas the inhibition of VEGF signaling results in suppression of both tumor-induced angiogenesis and tumor growth (6).

The *VEGF* gene is located on chromosome 6p21.3 and consists of 8 exons. At least, 30 single-nucleotide polymorphisms (SNP) in this gene have been described in the literature. Among these, evidence has shown that the -634G/C, -1154G/A, and -2578C/A *VEGF* polymorphisms are associated with increases in VEGF production (9,10,11).

Recently, *VEGF* polymorphisms have been evaluated in skin (12), bladder (13), lung (14,15), prostate (16, 17), stomach (18) and breast (19,21) cancers in patients. Several studies have focused on the potential prognostic importance of *VEGF* polymorphisms (13, 19, 20).

The -1154 GG *VEGF* genotype is associated with a higher VEGF production and is located in the promoter region of the gene (11) however, the -1154A/A genotype is associated with a decreased risk for prostate cancer and less advanced melanoma (14-16).

In head and neck cancer, only four studies have investigated *VEGF* polymorphisms. In one study an association of -460C/T and +960C/T *VEGF* polymorphisms was reported in oral cancer (21) and a second study showed an

association between +960C/T *VEGF* polymorphism and oral cancer (22). Cheng et al. (23) identified an association between the +960 C/T polymorphism and vascular invasion in oral squamous cell carcinoma. The -1154G/G genotype of the *VEGF* gene appears to increase the risk for laryngeal squamous cell carcinoma (24).

VEGF polymorphisms have been implicated in the risk for several types of tumors and other diseases with putative angiogenic components. Based on the biological and pathologic significance of *VEGF*, it is possible that functional genetic variations of the *VEGF* gene may contribute to the progression of the head and neck cancer. To test this hypothesis, the aims of this study were to investigate the association of the -1154G/A polymorphism of the *VEGF* gene with head and neck cancer and to evaluate whether the interaction of this polymorphism with lifestyle and demographic factors may be associated to a higher risk. In addition, *VEGF* genotype distribution was investigated in relation to the clinicopathological features of head and neck cancer patients.

Material and methods

A total of 91 male and 9 female patients, who were diagnosed with head and neck cancer, were investigated (average age 57; range: 36 - 80 years). Informed consent was obtained from all individuals enrolled in this study. Diagnosis was made from pathological specimens either from total excision or biopsy. All tumor cell types were squamous cell carcinoma with the samples being collected before the beginning of treatment. A control group comprised 176 apparently healthy volunteers with no history of familial cancer.

The patients were staged according to the tumor-node-metastasis (TNM) classification of the International Union against Cancer (25).

Methods

DNA isolation and genotyping assay

DNA was isolated from leukocytes obtained from peripheral blood according to the method described by Miller et al. (26). DNA concentration was measured using a CARY spectrophotometer. Allelic discrimination of the -1154 *VEGF* polymorphism was achieved with the ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using the fluorogenic 5' nuclease assay with Taqman Minor Groove Binder (MGB) probes. The wild-type Taqman MGB probes were FAM labeled and the mutants were VIC labeled. The final volume for each reaction was 5 μ L, consisting of 1.5 μ L Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.9 μ M of each primer, 0.2 μ M of each Taqman probe and 5 ng of genomic DNA. PCR sequencing involved an initial denaturation step at 95°C for 10 minutes followed by 40 cycles at 92°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Fluorescent signals were measured at 60°C. The

primers and probes for the G -1154 A were purchased from Applied Biosystems (ID - C_1647379-10).

The SDS computer program version 2.0 was used to analyze the fluorescence emitted in real time and at the end of the PCR reaction (endpoint read).

Statistical analysis

The demographic and lifestyle data were analysed by descriptive statistics and compared employing the Chi-Square Test.

The Chi-square test and the Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) were used for statistical analysis of the allele and genotype distributions of this polymorphism. A p-value < 0.05 was used to establish statistical significance. Multiple logistic regression models were used to determine the effect on the variables in head and neck squamous cell carcinoma. The model included age (reference: < 54 years old - mean of the groups), gender (reference: female), smoking habits (reference: non-smokers) and drinking habits (reference: non-drinkers). Results are shown as odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% CI).

The clinicopathological features were analyzed by multiple logistic regression. Tumor classification was divided into low T (T1,T2) and high T (T3,T4) classification categories. N classification was dichotomized into negative involvement of lymph nodes (N0) and positive involvement (N1, N2, N3). Stage grouping was divided into early stage (Stage I or II) and advanced stage (Stage III or IV) categories. The analysis of M classification was not performed since all patients were classified as M0.

Dependence analysis was used to assess the distribution of polymorphisms and the primary anatomic site of the tumor.

The Kaplan-Meier method was used to examine the survival rates and time of disease recurrence. Log-rank test was used to assess the differences considering the different genotypes.

Statistical analyses were performed using the computer program Minitab for Windows (Version 12.22). Value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Demographic data and lifestyle factors

Table 1 shows the distribution of the variables of patients and controls. There were statistically significant differences between patients and controls for age, gender, smoking and drinking habits.

VEGF genotype

The genotype distribution of the studied polymorphism did not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium for patients ($p = 0.9521$) or for controls ($p = 0.0675$).

The allele and genotype frequencies of the *VEGF* gene of head and neck cancer patients and the control group are shown in Table 2. There was no statistically significant difference in the allele distribution of the -1154 *VEGF* gene G/A polymorphism between controls and head and neck cancer patients ($p = 0.65$). The differences in genotype frequencies between patients and controls were not statistically significant either ($p = 0.46$).

The potential interaction between the distribution of the *VEGF* genotype and exposure to risk factors for head and neck cancer are shown in Table 3 with no statistical difference being found using multiple logistic regression.

Using dependence analysis, the distribution of genotype frequencies showed a significant association with the anatomic site of the tumor ($p = 0.041$); the GG genotype was associated to pharynx cancer, while the GA genotype was linked to oral cavity and larynx cancer ($p = 0.003$).

The associations of clinicopathological features of the head and neck cancer patients with *VEGF* genotypes are shown in Table 4. For this analysis were considered

only patients with complete pathological data. This analysis shows that the polymorphic A allele is less frequent in patients with T3 and T4 tumors. No significant association of genotype frequency was found for the other clinical parameters.

An analysis of metastasis classification was not performed since all patients were classified as M0.

The Kaplan-Meier survival curves by genotype are presented in Figure 1A, and did not demonstrate any association between the polymorphism and overall survival ($p=0.1521$); moreover, no association was observed for the time of recurrence of the disease ($p = 0.4592$) (Figure 1B).

Discussion

This study confirms the well-known fact that head and neck cancer development is strongly associated with lifestyle factors, such as alcohol intake and cigarette smoking (27, 28, 29). Additionally, a significant association was confirmed between age and gender with this disease as has previously been described (29,30).

In this study, the allele and genotype distribution of the -1154 G/A polymorphism in patients with head and neck cancer were in close agreement with those previously published for healthy Caucasian individuals (31), but, using univariate and multiple logistic regression analyses, no significant differences were observed in the allele and genotype distributions of the gene polymorphisms between patients with head and neck cancer and controls.

Four studies reported the association of *VEGF* polymorphisms and head and neck cancer. Ku et al., (21) reported the association between -460 C/T *VEGF* polymorphism and oral cancer, Yapijakis et al., (22) showed an elevated frequency of heterozygotes with the +936 C/T polymorphism and oral cancer and Cheng et al. (23) identified an association between the +960C/C *VEGF* polymorphism and vascular invasion in oral squamous cell carcinoma. Ünal et al. (24) in 2008, showed an association between the *VEGF* -1154G/G genotype and larynx cancer.

In lung cancer, an analysis revealed that the -1154A/A *VEGF* polymorphism was significantly associated with a lower *VEGF* expression compared to the GG polymorphism, while GA seemed to be related to an intermediate expression (14).

The association between the primary site of tumor and polymorphism suggest a tissue-specific role of polymorphisms. This may explain the differences in biological behavior of head and neck cancer in various anatomical locations (32).

In the analysis of clinicopathological features, the decreased frequency of the polymorphic A allele in T3 and T4 tumors supports the hypothesis that this allele is associated with decreased angiogenesis. Howell et al. (12) reported that the *VEGF* -1154A/A genotype was associated with the thinner primary vertical growth phase of malignant cutaneous melanomas while *VEGF* -1154 GG was associated with thicker primary tumors. McCarron et al. (16) observed that the *VEGF* -1154 AA genotype is associated with a reduced risk for prostate cancer development. These results indicate that the *VEGF* genotype may influence tumor growth, possibly via the effects of differential *VEGF* expressions on tumor angiogenesis.

Several studies have found that *VEGF* expression was significantly higher in patients with regional lymph node involvement (33,34) and therefore may promote oral cancer progression. In the present study no association was observed between lymph node involvement and the -1154G/A *VEGF* polymorphism. Moreover, no significant differences between the different stages of tumor and the distribution of the -1154G/A *VEGF* polymorphism were observed. In a study of the +936C/T *VEGF* polymorphism, Yapijakis et al. (22) reported an increase in the frequency of the *VEGF* 936T polymorphic allele, which is associated to lower circulating levels of *VEGF*.

A clear correlation between the *VEGF* gene and clinical parameters has not yet been established in squamous cell head and neck carcinoma (35). Our study suggests that the *VEGF* -1154A allele can reduce the risk of tumor growth and thus supports results on the role of *VEGF* in head and neck cancer published by other authors. Our result is not surprising, because *VEGF*, as a key mediator of angiogenesis, is more likely to alter the aggressiveness of the tumor than susceptibility to cancer.

Further studies of other VEGF sequence variants and expressions and their biological functions are also needed to understand the role of *VEGF* polymorphisms and haplotypes in determining the risk for head and neck cancer.

Acknowledgments

The authors wish to thank all those participating in this study, the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for their support; Prof. Adilia M. Pires Sciarra for her help in writing the text, Prof. Dr. José Antônio Cordeiro and Prof. Dr. Moacir Fernandes Godoy for their help in the statistical analysis and FAMERP/FUNFARME.

References

1. Walker DM, Boey G, McDonald L. The pathology of oral cancer. *Pathology* 2003;35(5):376–83.
2. Perez-Ordoñez, B, Beauchemin M, Jordan RCK. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 2006; 59:445-453.
3. Home Page: Instituto Nacional do Câncer. [cited in Aug 2008] Available at <http://www.inca.gov.br>
4. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.
5. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19:1207-1225.
6. Ferrara N. VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 795-803.
7. Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H, Jikko A, Furukawa S, Ishida T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumor progression and p53 gene status. *J Clin Pathol* 1998; 51:771-775.
8. Lim, SC. Expression of c-erbB receptors, MMPs and VEGF in head and neck squamous cell carcinoma. *Biomed Pharmacot* 2005; 59: S366-S369.
9. Mohammadi M, OllierWE, Hutchinson IV. A functional association study of VEGF gene promoter polymorphisms with VEGF expression by stimulated pbm cells. *Hum Immunol* 2003;64:S125.

10. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, , et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:260 - 4.
11. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, et al A common polymorphism in the 5' – untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51:1635-1639.
12. Howell WM, Bateman AC, Turner SJ, Collins A. Theaker JM. Influence of vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms on tumor development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immun* 2002; 3:229-232.
13. Kim EJ, Jeong P, Quan C, Kim J, Bae SC, Yoon SJ, et al. Genotypes of TNF- α , VEGF, hOGG1, GSTM1, and GSTT1: useful determinants for clinical outcome of bladder cancer. *Urology* 2005; 65:70-5.
14. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004;46:293-8.
15. Lee SJ, Lee SY, Jeon H-S, Park SH, Jang JS, Lee GL, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms and Risk of Primary Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(3):571–5.
16. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res* 2002; 62:3369-3372.
17. Sfar S, Hassen E, Saad H, Mosbah F, Chouchane L. Association of VEGF genetic polymorphisms with prostate carcinoma risk and clinical outcome. *Cytokine* 2006; 35:21–8.

18. Kim JG, Sohn SK, Chae YS, Cho YY, Bae H-I, Yan G, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with gastric cancer. *Ann Oncol* 2007; 18: 1030–6.
19. Lu H, Shu X-O, Cui Y, Kataoka N, Wen W, Cai Q et al. Association of genetic polymorphisms in the VEGF gene with breast cancer survival. *Cancer Res* 2005; 65: 5015-5019.
20. Jin Q, Hemminki K, Enquist K, Lenner P, Grzybowska E, Klaes R, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in relation to breast cancer development and prognosis. *Clin Cancer Res* 2005; 11:3647 -53.
21. Ku K-T, Wan L, Peng H-C, Tsai M-H, Tsai C-H, Tsai F-J. Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for oral cancer. *Oral Oncology* 2005; 41: 497–502.
22. Yapijakis C, Vairaktaris E, Vassiliou S, Vylliotis A, Nkenke E, Nixon AM, et al. The low VEGF production allele of the +936C/T polymorphism is strongly associated with increased risk for oral cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133:787–91.
23. Cheng CY, Chang CS, Liu CJ, Kao SY. Vascular endothelial growth factor 936 C/T polymorphism is associated with vascular invasion in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106:79-84.
24. Ünal ZN, Ünal M, Bagdatoglu OT, Polat G, Atik U. Genetic polymorphism of VEGF-1154 (A/G) in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Med Res* 2008; 39: 209-11.
25. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. In: UICC- União Internacional Contra o Câncer, 2002 – TNM – Classificação de Tumores Malignos 6^a. edition . Rio de Janeiro: INCA 2004, 254 p.

-
26. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
 27. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 777 – 89.
 28. Boffetta P, Hecht S, Gray N, Gupta P, Straif K. Smokeless tobacco and cancer. *Lancet Oncol* 2008; 9: 667–75.
 29. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; 371:1965- 1709.
 30. Goldstein DP, Irish JC. Head and neck squamous cell carcinoma in the young patient. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005, 13:207-11.
 31. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel Polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Human Immunology* 1999; 60: 1245-49.
 32. Timar, J Csuka O, Remenar E, Repassy G, Kasler M. Progression of head and neck squamous cell cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24: 107–127.
 33. Moriyama M, Kumagai S, Kawashiri S, Kojima K, Kakihara K, Yamamoto E. Immunohistochemical study of tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1997; 33:369–74.
 34. Wong YK, Liu CJ, Kwan PC, Chao SY. Microvascular density and vascular endothelial growth factor immunoreactivity as predictors of regional lymph node metastasis from betel associated oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:1257–62.

35. Shang ZJ, Li JR. Expression of endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma: its correlation with angiogenesis and disease progression. *J Oral Pathol Med* 2005; 34: 134–9.

Table 1. Distributions of characteristics of case and control status.

Variable	Cases (n = 100)	Controls (n = 176)	p
Gender (%)			< 0.0001
Male	91	119	
Female	9	57	
Mean age in years (SD)	57 (9,56)	52 (11,77)	< 0.0001
Smoking (%)	91	99	< 0.0001
Drinking habits (%)	81	61	< 0.0001

Table 2. Distribution of the -1154G/A *VEGF* polymorphism among head and neck cancer patients and controls.

	Patients n (%)	Controls n (%)	p
Genotypes			0.46
GG	51(51)	100 (56.81)	
GA	41 (41)	59 (33.53)	
AA	8 (08)	17 (9.66)	
Alleles			0.65
G Allele	0.72	0.74	
A Allele	0.28	0.26	

Table 3. Odds Ratio of Head and Neck Cancer related to VEGF genotypes by gender, age, smoking and drinking habits

Characteristic	GG (Cases/Controls)	OR (95% CI)*	GA and AA (Cases/Controls)	OR (95% CI)*	p
Gender					
Female	04/32	1.00 (ref)	05/25	2.22 (0.46-10.55)	0.319
Male	47/68	1.00 (ref)	44/51	1.25 (0.64- 2.41)	0.5136
Age					
< 54	16/56	1.00 (ref)	15/42	1.50 (0.59- 3.82)	0.3922
> 54	35/44	1.00 (ref)	34/34	1.33 (0.61- 2.88)	0.4692
Smoking					
Non-smokers	05/38	1.00 (ref)	04/39	1.08 (0.24-4.90)	0.9247
Smokers	46/62	1.00 (ref)	45/37	1.40 (0.72-2.71)	0.3271
Drinking habits					
Use of alcohol	41/38	1.00 (ref)	39/23	1.29 (0.61-2.72)	0.4999
Non-Use of alcohol	10/62	1.00 (ref)	10/53	1.63 (0.56 - 4.71)	0.3681

*Adjusted for age, gender, smoking and drinking habits

Table 4. Clinicopathological features and *VEGF* polymorphism.

Variables	GG Genotype	OR (95% CI)*	GA and AA Genotype	OR (95% CI)*	p
Site of tumor					
Oral cavity	22	1.00 (ref)	20	0.81 (0.35-1.89)	0.6249
Pharynx	15	1.00 (ref)	11	0.73 (0.29-1.85)	0.5131
Larynx	14	1.00 (ref)	12	0.91 (0.36-2.31)	0.8481
Tumor extension					
T1/T2	11	1.00 (ref)	15	1.00 (ref)	
T3/T4	40	1.00 (ref)	29	0.36 (0.14 - 0.93)	0.0345
N involvement					
No	26	1.00 (ref)	16	1.00 (ref)	
Yes	25	1.00 (ref)	32	2.20 (0.94-5.14)	0.0699
Stage					
I/II	7	1.00 (ref)	9	1.00 (ref)	
III/IV	36	1.00 (ref)	30	1.26 (0.33 -4.71)	0.4278

* Adjusted for age, gender, smoking and drinking habits; N = lymph node

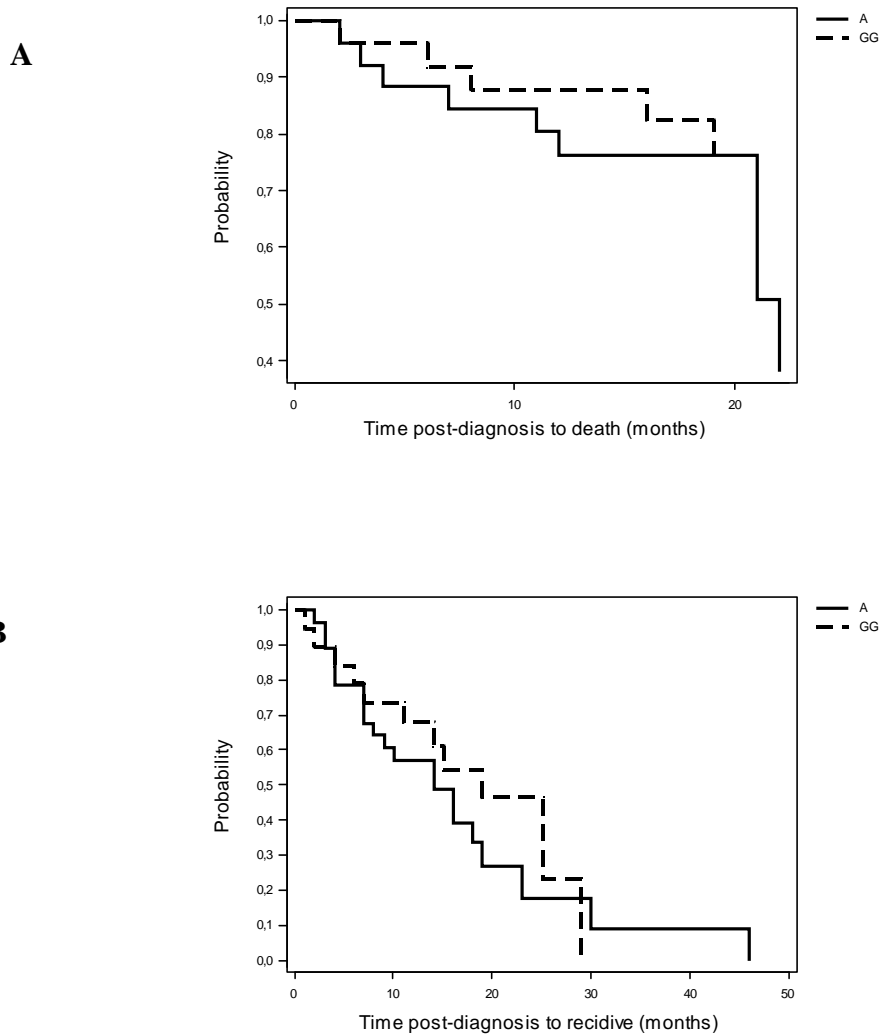


Figure 1: Kaplan–Meier curves for the overall survival (A) and relapse time (B) for patients according to the -1154G/A *VEGF* polymorphism.

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

Archives of Medical Research

[Contact us](#) [Help](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Username: mariangela_t
 Role: Author

EES Version: 5.0

Submissions Being Processed for Author Mariangela Torreglosa Ruiz, Master

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Vascular endothelial growth factor genetic variability and head and neck cancer in a Brazilian population	15 Sep 2008	15 Sep 2008	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)

[Help](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms and Conditions](#)

© 2006 - 2007 Elsevier BV.

From: archmedres_editor@terra.com.mx
To: mariangela_t@hotmail.com
Date: Mon, 15 Sep 2008 18:03:01 +0100
Subject: Submission Confirmation

Dear Master Mariangela Torreglosa Ruiz,

Your submission entitled "Vascular endothelial growth factor genetic variability and head and neck cancer in a Brazilian population" has been received by Archives of Medical Research.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/arcmed/>.

Your username is: *****

Your password is: *****

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Archives of Medical Research

ARTIGO V

Artigo V: Resultados sobre a análise do polimorfismo do gene *KISS-1* a ser submetido para publicação em periódico internacional.

Título: Polymorphism of *KISS-1* gene in Brazilian head and neck cancer patients

Polymorphism of the *KiSS-1* gene in Brazilian head and neck cancer patients

Abstract

Head and neck cancer is responsible for a high mortality rate, with a frequency of around 481, 000 new cases annually. Metastasis is a major cause of death in cancer patients. The head and neck squamous cell carcinoma remains locoregional for a long time, with visceral metastases developing only in a late stage of the disease. The *KiSS-1* metastasis-suppressor gene (*KiSS-1*) product (metastin, kisspeptin) is reported to act after binding with what has been identified as the natural ligand of a G-protein coupled receptor (hOT7T175, human GPR54 gene). After this binding the gene product inhibits chemotaxis, invasion, and metastasis of cells. **Objectives:** To evaluate the Q36R (transition from base A to G) polymorphism of *KiSS-1* in patients with head and neck cancer and to compare the results with healthy individuals. Another aim is to analyze the presence of this polymorphism in respect to different clinical features of head and neck cancer. **Subjects and Methods:** Gender, age, smoking and alcohol intake were analyzed in 252 patients with head and neck cancer, and in 522 individuals without any history of neoplasia. The molecular analysis of these individuals was made after extraction of genomic DNA using the SSCP-PCR technique. **Results:** This study did not reveal any significant differences in genotype frequencies between healthy individuals and patients with head and neck cancer or with the clinical parameters. **Conclusion:** The results do not show a relation between the polymorphism and head and neck cancer.

Key words: Head and Neck Cancer, *KiSS-1*, Polymorphism

INTRODUCTION

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) remains a significant cause of morbidity and mortality, with approximately 481,000 new cases reported annually worldwide and 320,000 deaths, thus giving a mortality rate of about 50% (1). In Brazil, the occurrence of this disease was estimated at 14,160 new cases for 2008; about 3.03% of all neoplasias in the country (2).

The majority of human cancers lead to death during the organic phase of metastatization. Metastasis involves a multistep process including detachment of cancer cells from a primary cancer, invasion of surrounding tissue, spread to the circulation, re-invasion and proliferation in distant organs. Head and neck squamous cell carcinoma, on the other hand, stays locoregional for a long time with visceral metastases developing only in a late stage of the disease (3).

The KiSS-1 metastasis-suppressor gene (*KiSS-1*) was identified by Lee et al. in 1996 (4) and consists of three exons, of which only part of the second and third exons are finally translated into a 145-amino acid protein with a putative signal sequence, from which three forms of kisspeptins containing 54, 14, and 13 amino acids are derived. The function of the *KiSS-1* product (metastin, kisspeptin) is reported to act after binding with what has been identified as the natural ligand of a G-protein coupled receptor (hOT7T175, human *GPR54* gene). After this binding the gene product inhibits chemotaxis, invasion, and metastasis of cells (5,6).

The expression of *KiSS-1* has been evaluated in several types of tumor and a decrease was observed in bladder (7), breast (8,9), esophageal (10), gastric (11), ovarian (12) and pancreatic (13) cancers, malignant melanoma (14-16), uveal melanoma (17) and osteosarcoma (18). Other studies have shown an increase of expression in

hepatocellular (19, 20) and papillary thyroid (21) carcinomas. A significant reduction in *KiSS-1* expression has been reported in tumors with high metastatic potential (10, 11, 18, 21, 22).

The Human Cancer Genome Project (HCGP) supported by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) - Ludwig Institute for Cancer Research described the Q36R polymorphism of *KiSS-1* (NT_004487.18). This project identified human non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) and an A to G transition in *KiSS-1* was validated in a DNA panel of 150 Brazilian individuals (23), thereby demonstrating the importance of studies that evaluate molecular markers for the disease, such as genomic SNPs.

The objectives of the present study were to evaluate the Q36R (transition from base A to G) polymorphism of *KiSS-1* in patients with head and neck cancer and to compare the results with healthy individuals. Additionally, the study analyzed the presence of polymorphisms of this gene with different clinical features of head and neck cancer.

SUBJECTS AND METHODS

All participants gave written informed consent for their inclusion in the study. The study protocol was approved by the National Ethics Committee (CONEP). A total of 243 patients (35 women and 208 men) who were diagnosed as having head and neck cancer were investigated (average age 58.17; range, 36-86 years). Diagnosis was made from pathological specimens either from total excision or biopsy. All tumor cell types were squamous cell carcinoma and the primary anatomic sites included the oral cavity (n = 97: 39.9%); pharynx (n = 65: 26.75%) and larynx (n = 81: 33.3%). A control group

was drawn up of 522 (168 women and 354 men) apparently healthy volunteers who had no history of familial cancer with an average age of 49.89 years (range, 18-90 years).

The frequencies of smoking and alcohol intake in the head and neck cancer group patients were 89.7% and 77.7%, respectively. In the control group, the frequencies were 49.8% and 48.7%, respectively. These variables were adjusted in the logistic regression for the polymorphism analyses.

The patients were staged according to the tumor-node-metastasis (TNM) classification of the International Union against Cancer (24,25). DNA was isolated from leukocytes obtained from peripheral blood according to the method described by Miller et al. (26).

Polymorphism was determined by polymerase chain reaction (PCR) with upstream and downstream primers flanking the target sequence (forward: 5' CGAGCTTCCAAAAGGTCAAG 3', and reverse: 5' CAGTAGCAGCTGGCTTCCTC 3'). Amplified fragments were subjected to single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis (27). The aberrant SSCP mobility patterns were verified and the DNA samples were automatically sequenced on an ABI 377 PRISM DNA Sequencer (Applied Biosystems) using big dye terminator as instructed by the manufacturer.

Statistical analysis

Demographic and lifestyle data were assessed by descriptive statistics and compared using Fisher's Exact Test.

Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) was tested separately for cases and controls for the polymorphism and the Pearson χ^2 -test was used to compare groups.

Fisher's Exact Test was used for the statistical analysis of the allele and genotype distributions of this polymorphism. A p-value of less than or equal to 0.05 was considered statistically significant for all analysis.

Multiple logistic regression models were used to determine the effect on the variables in head and neck squamous cell carcinoma. The model included age (reference: < 52 years old - mean of the groups), gender (reference: female), smoking habits (reference: non-smokers) and drinking habits (reference: non-drinkers). Results are shown as odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% IC).

The clinicopathological features were analyzed by multiple logistic regression. Tumor classification was divided into low T (T1,T2) and high T (T3,T4) classification categories. N classification was dichotomized into negative involvement of lymph nodes (N0) and positive involvement (N1, N2, N3). Stage grouping was divided into early stage (Stage I or II) and advanced stage (Stage III or IV) categories. The analysis of M classification was not performed since all patients were classified as M0.

The Kaplan-Meier method was used to examine the survival rates and time of disease recurrence. Log-rank test was used to assess the differences considering the different genotypes.

The computer-assisted statistical analyses were carried out using Minitab for Windows (Release 12.22) and the Stats Direct Statistical (version 1.617) programs. The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested by chi-square using the *BioEstat* program.

RESULTS

Demographic data and lifestyle factors

Table 1 shows the distribution of demographic and lifestyle variables of patients and controls. Statistically significant differences were observed between the patients and controls for the all variables.

KiSS-1 genotype

The genotype distribution of the studied polymorphisms did not deviate from the Hardy-Weinberg Equilibrium in both head and neck cancer ($X^2 = 0.3670$; $p = 0.54$) and control ($X^2 = 0.2551$; $p = 0.61$) individuals.

Allele and genotypic frequencies of the Q36R polymorphism of *KISS-1* were determined for all participants (Table 2). No statistically significant differences were observed for the alleles ($p=0.55$) and genotype frequency ($p = 0.62$) between cases and controls in the univariate analysis. In addition, multivariate logistic regression analysis did not demonstrate any association between variant genotypes and the risk for head and neck cancer (OR: 0.97; CI 95% 0.61-1.54; $p = 0.8897$).

The potential interaction between *KiSS-1* genotypes and exposure to risk factors for head and neck cancer are shown in Table 3 with the results of multiple logistic regression demonstrating that the lower frequency of G allele together with low alcohol intake has a significant difference between head and neck cancer and control individuals (OR: 0.35 CI 95% 0.14 – 0.88; $p = 0.0257$), indicating an association (protective effect) between these two factors and risk for head and neck cancer. Other potential associations did not present with significant differences.

The association of the clinicopathological features of head and neck cancer patients with *KiSS-1* genotypes is shown in the Table 4. An analysis of primary tumor

sites shows a possible interaction between the presence of the Q36R polymorphism and pharyngeal cancer. The analyses of tumor extension, lymph node involvement and aggressiveness according to the genotype frequencies did not identify statistical differences. The analysis of the metastasis classification was not performed since only one patient was classified as M1.

The overall survival analysis represented by the Kaplan-Meier survival curve (Figure 1) did not reveal any significant association with the *KiSS-1* genotypes ($p = 0.65$). Moreover, there was no association between the time to disease recurrence and genotypes ($p = 0.17$).

DISCUSSION

The present study confirms the well-known fact that the development of head and neck cancer is strongly associated with lifestyle factors, such as alcohol intake and smoking (28-30). We also report a significant association between age and gender with this disease as previously described (31, 32).

There are several studies on human melanoma, breast carcinoma cells and in others types of tumor that have reported *KiSS-1* as a novel metastasis suppressor gene (5, 7, 9-11, 13-16, 33).

The association between polymorphisms of *KiSS-1* and head and neck cancer has not been reported previously. The study of Luan et al. in 2007 (34) was the first to analyze polymorphisms of this gene and its relationship with central precocious puberty.

The Q36R polymorphism of *KiSS-1* was described using the ORESTES approach (35) during the Human Cancer Genome Project (HCGP) supported by the São

Paulo State Research Foundation (FAPESP)/Ludwig Institute for Cancer Research. This SNP was subsequently validated in a set 150 DNA samples (23) with a frequency of 8%.

In this study, no significant differences in the allele and genotype distribution of the polymorphism were identified between patients with head and neck cancer and controls using univariate and multiple logistic regression analysis.

The potential interaction between *KISS-1* genotypes and exposure to risk factors for head and neck cancer demonstrated an inverse relationship between the presence of the Q36R polymorphism and non-drinkers (OR: 0.35; CI 95%: 0.14 - 0.88; $p = 0.0257$). The analysis of clinicopathological features shows a possible association between laryngeal cancer and the Q36R polymorphism (OR: 2.50; CI 95%: 1.23 - 5.08; $p = 0.0116$) and suggest a tissue-specific role of polymorphism. This may explain the differences in biological behavior of head and neck cancer in various anatomical locations (3). This study did not demonstrate an association between the Q36R polymorphism and other clinicopathological features including extension of tumor, lymph node involvement and tumor aggressiveness, survival or recurrence of disease.

Various studies have correlated *KISS-1* expression and clinical features of tumors. A lower expression was associated with lymph node metastasis in breast (36), esophageal (10) and thyroid (37) cancers, and with the progression, prognosis and survival in patients with melanoma (22), gastric (11), hepatocellular (19, 20) and ovarian (12) carcinomas. There are no studies on its expression in head and neck squamous cell carcinoma.

The Q36R polymorphism of *KiSS-1* results in a non-synonymous substitution with the exchange of A → G resulting in the substitution of Glutamine for Arginine in the kisspeptin protein, but the significance of this alteration remains unclear.

This study is the first that correlates the Q36R polymorphism with head and neck cancer and may open the possibility of future investigations of this polymorphism in different types of tumors and the analysis of the expression of this gene in head and neck cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank all those participating in this study, the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for their support; Prof. Adília M. Pires Sciarra for her help in writing the text, Prof. Dr. José Antônio Cordeiro and Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy for their help in statistical analysis, Ana Livia Silva Galbiatti for technical assistance and FAMERP/FUNFARME.

REFERENCES:

1. Perez-Ordoñez B, Beauchemin M, Jordan RCK. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 59: 445-453, 2006.
2. Home Page: Instituto Nacional do Câncer. [accessed in Nov 2005] Available at <http://www.inca.gov.br>
3. Timar J, Csuka O, Remenar E, Repassy G, Kasler M. Progression of head and neck squamous cell cancer. *Cancer Metastasis Rev* 24: 107–127, 2005
4. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Insitute* 88:1731-1737, 1996.
5. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, et al. Metastasis suppressor gene *KiSS-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411:613–617, 2001.
6. Makri A, Pissimissis N, Lembessis P, Polychronakos C, Koutsilieris M. The kisspeptin (KiSS-1)/GPR54 system in cancer biology. [Epub ahead of print]
7. Sanchez-Carbayo M, Capodiecì P, Cordon-Cardo C. Tumor suppressor role of *KiSS-1* in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome. *Am J Pathol* 162: 609-617, 2003.
8. Lee JH, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, *KiSS-1*. *Cancer Res* 57: 2384–2387, 1997.
9. Mitchell DC, Abdelrahim M, Weng J, Stafford LJ, Safe S, Bar-Eli M, et al. Regulation of *KiSS-1* metastasis suppressor gene expression in breast cancer cells by

direct interaction of transcription factors activator protein-2alpha and specificity protein-1. *J Biol Chem* 281: 51-58, 2006.

10. Ikeguchi M, Yamaguchi K, Kaibara N. Clinical significance of the loss of *KiSS-1* and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:1379-1378, 2004.

11. Dhar DK, Naora H, Kubota H, Maruyama R, Yoshimura H, Tonomoto Y, et al. Downregulation of *KiSS-1* expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 10: 868-872, 2004.

12. Hata K, Dhar DK, Watanabe Y, Nakai H, Hoshiai H. Expression of metastin and a G-protein-coupled receptor (AXOR12) in epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer* 43: 1452 –1459, 2007.

13. Masui T, Doi R, Mori T, Toyoda E, Koizumi M, Kami K, et al. Metastin and its variant forms suppress migration of pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 315:85-92, 2004.

14. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, et al. *KiSS-1*, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88:1731-1737, 1996.

15. Shirasaki F, Takata M, Hatta N, Takehara K. Loss of expression of the metastasis suppressor gene *KiSS1* during melanoma progression and its association with LOH of chromosome 6q16.3-q23. *Cancer Res* 61:7422-5, 2001.

16. Hesling C, D'Incan M, Mansard S, Franck F, Corbin-Duval A, Chevenet C et al. In vivo and in situ modulation of the expression of genes involved in metastasis and angiogenesis in a patient treated with topical imiquimod for melanoma skin metastases. *Br J Dermatol* 150:761-767, 2004.

17. Martins CM, Fernandes BF, Anteckka E, Di Cesare S, Mansure JJ, Marshall JC, Burnier MN Jr. Expression of the metastasis suppressor gene *KiSS1* in uveal melanoma. *Eye* 22:707-711, 2008.
18. Sanchez-Carbayo M, Belbin TJ, Scotlandi K, Prystowsky M, Baldini N, Childs G, Cordon-Cardo C. Expression profiling of osteosarcoma cells transfected with *MDR1* and *NEO* genes: regulation of cell adhesion, apoptosis, and tumor suppression-related genes. *Lab Invest* 83:507-517, 2003.
19. Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis for *KiSS-1* and orphan G-protein-coupled receptor (*hOT7T175*) gene expression in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 129:531-535, 2003.
20. Schmid K, Wang X, Haitel A, Sieghart W, Peck-Radosavljevic M, Bodingbauer M, et al. *KiSS-1* overexpression as an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Virchows Arch* 450:143-149, 2007.
21. Ringel MD, Hardy E, Bernet VJ et al. Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2399, 2002.
22. Shirasaki F, Takata M, Hatta N, Takehara K. Loss of expression of the metastasis suppressor gene *KiSS1* during melanoma progression and its association with LOH of chromosome 6q16.3-q23. *Cancer Res* 61:7422-7425, 2001.
23. Brentani H, Caballero OL, Camargo AA, da Silva AM, da Silva WAJr, Dias Neto E, et al. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13418-13423, 2003.

24. Greene FLPD, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M. AJCC Cancer Staging Manual 6 ed. Springer, NY, USA 2002.
25. Instituto Nacional do Câncer. UICC- União Internacional Contra o Câncer, 2002 – TNM – Classificação de Tumores Malignos 6^a. Edição. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA 2004.
26. Miller SA, DykesDD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells *Nucleic Acids Res* 16:1215, 1988.
27. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2766-2770, 1989.
28. Hashibe M , Brennan P, Benhamou S , Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 99: 777 – 789, 2007.
29. Boffetta P, Hecht S, Gray N, Gupta P, Straif K. Smokeless tobacco and cancer. *Lancet Oncol* 9: 667–675, 2008.
30. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 371:1695- 1709, 2008.
31. Goldstein DP, Irish JC. Head and neck squamous cell carcinoma in the young patient. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 13:207-211, 2005.
32. Argiris A, Karamouzis MV, David Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *J Lancet* 371: 1695-1709, 2008.

33. Lee, JH Welch, DR. Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int J Cancer* 71: 1035–1044, 1997.
34. Luan X, Zhou Y, Wang W, Yu H, Li P, Gan X, Wei D, Xiao J. Association study of the polymorphisms in the KiSS1 gene with central precocious puberty in Chinese girls. *Eur J Endocrinol* 157: 113-118, 2007.
35. Dias Neto E, Correa RG, Verjovski-Almeida S, Briones MRS, Nagai MA, Silva Jr, WA et al. Shotgun sequencing of human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci* 97: 3491-3496, 2000.

Table 1: Distribution of characteristics in case and control individuals

Variable	Cases (n = 252)	Controls (n = 522)	p
Gender (%)			< 0.0001
Male	217 (86.11)	354 (67.82)	
Female	35 (13.89)	168 (32.18)	
Mean age in years (SD)	58 (9.64)	50 (15.35)	< 0.0001
Smokers (%)	226 (89.62)	260 (49.80)	< 0.0001
Drinkers (%)	196 (77.78)	254 (48.65)	< 0.0001

Table 2. Distribution of the Q36R polymorphism of *KISS-1* in head and neck cancer patients and controls

Genotype	Patients n (%)	Controls n (%)	p
			0.62
AA	211 (83.73)	426 (81.61)	
AG	40 (15.87)	90 (17.24)	
GG	1 (0.39)	6 (1.15)	
Allele			0.55
A Allele	0.92	0.90	
G Allele	0.08	0.10	

Table 3: Odds Ratio of head and neck cancer related to the genotypes of *KiSS-1* polymorphisms by gender, age, smoking and drinking habits

Characteristics	AA (Cases/Controls)	OR (95% CI)*	AG and GG (Cases/Controls)	OR (95% CI)	p
Gender					
Female	6/131	1.00 (ref)	29/37	0.76 (0.30 - 1.96)	0.57
Male	182/295	1.00 (ref)	35/59	1.06 (0.62- 1.82)	0.83
Age					
< 52	49/275	1.00 (ref)	13/58	1.11 (0.54 -2.28)	0.77
> 52	162/151	1.00 (ref)	28/38	0.84 (0.46 - 1.53)	0.56
Smoking					
Non-smokers	24/210	1.00 (ref)	02/52	0.30 (0.07-1.33)	0.11
Smokers	187/216	1.00 (ref)	39/44	1.18 (0.70 - 1.98)	0.53
Drinking habits					
Non-use of alcohol	49/213	1.00 (ref)	07/55	0.35 (0.14 - 0.88)	0.03
Use of alcohol	162/213	1.00 (ref)	34/41	1.50 (0.83 - 2.71)	0.18

*Adjusted for age, gender, and smoking and drinking habits.

Table 4: Clinicopathological features and the *KiSS-1* polymorphisms

Variables	AA Genotype	OR (95% CI)	AG and GG Genotype	OR (95% CI)*	p
Sites of tumor					
Oral cavity	86	1.00 (ref)	11	0.51(0.24 - 1.08)	0.0777
Pharynx	48	1.00 (ref)	17	2.50 (1.23 - 5.08)	0.0116
Larynx	69	1.00 (ref)	12	0.86 (0.41 -1.79)	0.6818
Tumor extension					
T1/T2	75	1.00 (ref)	16	1.00 (ref)	
T3/T4	109	1.00 (ref)	24	1.05 (0.52 - 2.08)	0.8985
N involvement					
No	107	1.00 (ref)	26	1.00 (ref)	
Yes	83	1.00 (ref)	15	0.70 (0.34-1.43)	0.3277
Stage					
I/II	58	1.00 (ref)	13	1.00 (ref)	
III/IV	120	1.00 (ref)	24	0.82 (0.38-1.75)	0.6008

* Adjusted for age, gender, and smoking and drinking habits.

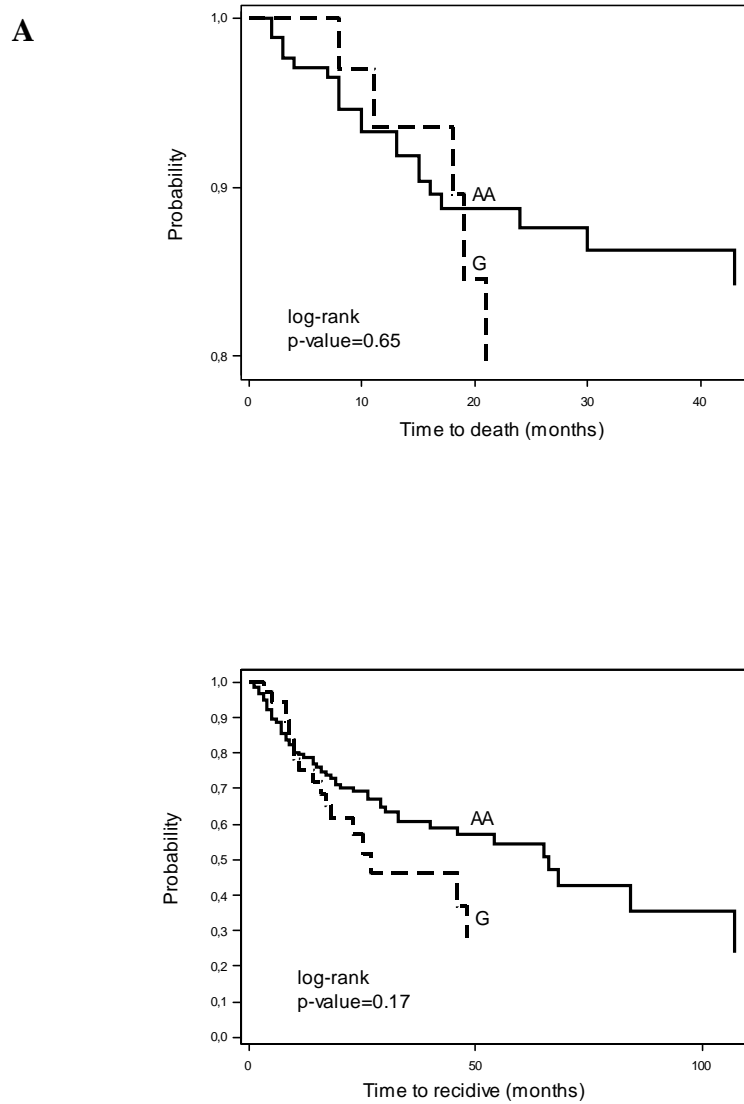


Figure 1: Kaplan–Meier curves for the overall survival (A) and relapse time (B) for patients according to the Q36R *KiSS-1* polymorphism

ARTIGO VI

Artigo VI: Resultados sobre a análise dos polimorfismos gerados no projeto Genoma Humano do Câncer a ser traduzido e submetido para publicação em periódico internacional.

Título: Validação de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) do Projeto Genoma Humano do Câncer em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

Validação de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) do Projeto Genoma Humano do Câncer em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

Resumo

Introdução: O câncer de cabeça e pescoço é responsável por uma alta incidência de óbitos. O tabagismo e o etilismo são os principais fatores etiológicos desta doença. Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) constituem a variação mais comum do genoma humano e estão associados à base molecular do câncer. **Objetivo:** avaliar a frequência de SNPs não sinônimos nos genes *KiSS-1* (A/G), *NINJI* (A/C), *TAXIBP1* (T/A) e *LAD1* (A/G) gerados no Projeto Genoma Humano do Câncer em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e comparar suas frequências em uma população controle. **Metodologia:** Foram analisados os dados epidemiológicos como sexo, idade, etnia, tabagismo e etilismo de 656 indivíduos (243 pacientes com câncer de cabeça e pescoço e 413 indivíduos sem história de neoplasia). A análise molecular foi realizada com DNA genômico, extraído a partir de sangue periférico e foram utilizadas as técnicas de PCR-SSCP (gene *KiSS-1*), PCR-RFLP (genes *NINJI* e *TAXIBP1*) e sequenciamento automático (gene *LAD-1*). **Resultados:** A análise dos dados epidemiológicos mostrou predominância de pacientes do sexo masculino (86%), tabagistas (89,71%) e etilistas (77,37%). O sítio anatômico primário mais frequente foi a cavidade oral (37,45 %). Na análise das frequências genotípicas não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes. Na análise dos parâmetros clínicos, para o sítio anatômico primário do tumor, foi encontrada uma frequência aumentada do alelo polimórfico na laringe (OR = 2,32; IC 95% 1,12 – 4,82; p = 0,02) para o gene *KiSS-1*; uma frequência aumentada do polimorfismo do gene *NINJI* em

cavidade oral (OR = 1,86; IC 95% 1,05 -3,30; p = 0,03) e diminuída na laringe (OR = 0,40 IC 95% 0,22-0,74; p =0,003). Para o gene *TAX1BP1* foi encontrado um aumento do polimorfismo na cavidade oral (OR =2,25; IC 95% 1,20-4,21; p =0,01). Em relação ao estadiamento do tumor, há uma frequência menor do polimorfismo do gene *LADI* em tumores com estádios III e IV (OR = 0,39 IC 95% 0,18-0,83; p = 0,01).

Conclusões: Os resultados não mostram relação entre os polimorfismos estudados e o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. Há evidências de associação entre o polimorfismo do gene *KISS-1* e a presença do câncer na laringe, entre os polimorfismos dos genes *NINJI* e *TAX1BP1* e cavidade oral e o alelo G do gene *LADI* confere menor agressividade.

INTRODUÇÃO

Carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço são neoplasias muito agressivas com uma estimativa de incidência anual de 481.100 casos no mundo e 320.000 mortes ao ano.¹ Dois terços desta doença ocorre em países em desenvolvimento com uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 50%.^{2,3} No Brasil, a incidência de câncer da cavidade oral, sítio mais representativo da doença, representa cerca de 3% de todos as neoplasias, segundo o Instituto Nacional do Câncer há a estimativa de 14.160 novos casos o ano de 2008.⁴

O tabagismo e o etilismo são os principais fatores de risco estabelecidos para câncer de cabeça e pescoço.⁵⁻¹⁰ Variações geográficas ou regionais na prevalência do câncer de cabeça e pescoço indicam que o estilo de vida sociocultural de uma população pode desempenhar um papel importante na carcinogênese da mucosa desse sítio anatômico.^{11,12}

O desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço é resultado tanto da interação de fatores ambientais quanto da herança genética, portanto, multifatorial.^{13,14} Marcadores moleculares são utilizados para avaliar a suscetibilidade dos indivíduos para o desenvolvimento de neoplasias e dentre eles estão os polimorfismos de sítios únicos (SNPs), que são variações comuns que ocorrem em cerca de 1.000 pares de bases com frequência acima de 1% na população humana. Um número cada vez maior dessas alterações de base única está sendo associadas às bases moleculares de doenças envolvendo um componente genético, como o câncer, ou como um fator de risco para doenças adquiridas.¹⁵⁻¹⁹

No Projeto Genoma Humano do Câncer (FAPESP/Instituto Ludwig - Brasil) que gerou aproximadamente um milhão de seqüências derivadas de amostras tumorais e

de tecidos normais, utilizando a técnica ORESTES a qual gera seqüências predominantemente da região codificadora central dos genes, foram identificados cerca de 237 SNPs, e um total de 20 não-sinônimos.^{20, 21} Esses SNPs estão localizados em regiões codificadoras dos genes possuindo, portanto, o potencial de gerar proteínas alteradas, como conseqüência de variações nos aminoácidos dos produtos protéicos dos genes.^{20,22} Dentre eles, podem ser citados os polimorfismos não sinônimos A→G no gene *KiSS-1 metastasis-suppressor (KiSS-1)* (gln36arg), A→C no gene *NINJURINI (NINJI)* (asn110ala), T → A de *TAXIBP1 (Human T-cell leukemia virus type I)* (leu306ile), e o polimorfismo A→G no gene *LADININ-1 (LADI)* (lys 323glu).^{22,23}

De maneira geral, estes genes possuem funções importantes relacionadas com a carcinogênese, tais como supressão de metástase (*KiSS-1*)^{24,25}, adesão celular (*NINJI*)²⁶, participação na transdução de sinas, transcrição de genes virais e celulares (*TAXIBP1*)²⁷ e ancoragem (*LADI*).²⁸

Não há estudos com estes polimorfismos e câncer e a associação entre estes polimorfismos e câncer de cabeça e pescoço não foi estudada até o momento, o que reforça a importância de estudos para avaliar estes marcadores moleculares nesta doença. Considerando a relevância deste assunto, o objetivo deste estudo é avaliar a frequência dos polimorfismos dos genes acima citados em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e também avaliar a distribuição destes genótipos de acordo com as características clínico-patológicas do câncer de cabeça e pescoço.

Material e Métodos

Todas as amostras foram obtidas após aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e consentimento livre e esclarecido de todos os participantes. O diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço foi feito por estudos patológicos após excisão total ou biópsia e todos os tumores foram classificados como carcinoma de células escamosas. Os pacientes foram provenientes dos Serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço de São Paulo, Brasil (capital e região noroeste). Os indivíduos sem história de neoplasia (controles) foram doadores saudáveis de banco de sangue.

Foram avaliados 656 indivíduos (243 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, e 413 controles). O perfil sociodemográfico (gênero, idade) e a exposição a fatores de risco (tabagismo e etilismo) dos pacientes e dos controles foram analisados. Indivíduos que consomem cerca de 100 cigarros durante toda a vida foram considerados tabagistas e aqueles que bebem mais que quatro drinques por semana, etilista.^{29,30}

Os tumores foram classificados de acordo com os parâmetros da *Union International Control Cancer (IUCC)*, 2002 e *American Joint Committee for Cancer (AJCC)*, 2002.^{31,32}

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue periférico segundo a técnica de Miller *et al.*, 1988 com modificações.³³ As técnicas para análise molecular dos genes *KiSS-1*, *NINJ1*, *TAX1BP1* e *LAD1*. Foi utilizada a amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As seqüências de oligonucleotídeos *primers*, bem como as temperaturas de anelamento estão apresentadas na Tabela 1.

Para o gene *KiSS-1* foi utilizada a técnica de *Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)*³⁴, utilizando-se como controle de reação amostras previamente

seqüenciadas. Para o gene *NINJI*, os produtos de amplificação foram submetidos à digestão enzimática com a endonuclease de restrição (RFLP) *Hae III* e os indivíduos homozigotos (AA) apresentaram, no gel de eletroforese, apenas um fragmento de 212 pb, os heterozigotos (AC) apresentam dois fragmentos (212 pb e 176 pb) e os homozigotos (CC) apresentam um fragmento de 176 pb.

Na análise de *TAXIBPI*, os produtos de amplificação foram submetidos à digestão enzimática com a endonuclease de restrição (RFLP) *ApoI*. A presença do polimorfismo destrói o sítio de restrição, não ocorrendo o corte do amplificado de 264 pb. Na ausência do polimorfismo, o produto é digerido em dois fragmentos (um fragmento de 205 pb e outro fragmento de 59 pb).

Para a genotipagem de *LADI* foi realizado o seqüenciamento automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems Inc).

Análise Estatística

Os dados demográficos foram tabulados por estatística descritiva e comparados pelo Teste Exato de Fisher. O teste do qui-quadrado foi utilizado para a análise das distribuições alélicas e genotípicas destes polimorfismos e para o cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).

Os modelos de regressão logística múltipla foram utilizados para determinar o efeito das variáveis analisadas em câncer de cabeça e pescoço. O modelo incluiu idade (referência: < 50 anos, mediana dos dois grupos), gênero (referência: feminino), hábito tabagista (referência: não fumantes) e hábito etilista (referência: não etilistas). Para os parâmetros clínicos, a classificação T foi dividida em tumores com pequena extensão (T1,T2) e com grande extensão (T3, T4); a classificação N em comprometimento de

linfonodos negativo (N0), e positivo (N1, N2, N3) e os estádios em precoce (estádios I, II) e categoria avançada da doença (III e IV). Os resultados foram apresentados em odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95 % (IC 95%). O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p=0,05$).

O método de Kaplan-Meier foi aplicado para avaliar as diferentes taxas de sobrevida e recorrência da doença entre os diferentes genótipos e o teste Log-Rank para medir estas diferenças entre os genótipos. Para a análise de sobrevida foram considerados como ponto final da análise (*end point*) o período compreendido entre o diagnóstico da doença e o óbito, e para a análise da recorrência, o *end point* foi o diagnóstico de recidiva.

Foram utilizados os programas computacionais *Minitab for Windows* (Release 12.22) e *Stats Direct Statistical Software* (versão 1.617). O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi feito utilizando o programa BioEstat.

Resultados

As características dos grupos estudados estão apresentadas na Tabela 2. Foram observadas diferenças estatísticas em todas as variáveis estudadas.

Para os pacientes, os sítios anatômicos primários de tumores incluíram cavidade oral (37,45%), laringe (32,10 %), faringe (26,75%) e sítio primário não conhecido (3,70%).

A Tabela 3 apresenta a distribuição genotípica dos indivíduos estudados, na análise univariada não mostrando diferenças significantes entre pacientes e indivíduos controles, para as freqüências alélicas também não foram encontradas diferenças significantes.

A análise das freqüências genotípicas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg mostrou que para os genes *KiSS-1*, *NINJI* e *TAX1BP1* encontram-se em equilíbrio ($X^2 = 0,37$; $p = 0,54$; $X^2 = 0,21$; $p = 0,65$; e $X^2 = 2,75$; $p = 0,09$) para pacientes e ($X^2 = 0,009$; $p = 0,93$; $X^2 = 0,31$; $p = 0,58$; e $X^2 = 1,86$; $p = 0,17$ para os indivíduos controles). Para o gene *LADI* tanto as freqüências genotípica dos pacientes como as dos indivíduos do grupo controle não se encontram em equilíbrio ($X^2 = 8,94$; $p = 0,003$ e $X^2 = 39,02$; $p < 0,0001$).

Como não foi possível realizar o pareamento entre os dados demográficos e fator de risco entre pacientes e controles foi realizado o teste de regressão logística múltipla (Tabela 4) e não observou-se diferenças entre os grupos para os polimorfismos estudados.

A análise do número de alelos polimórficos por indivíduos (pacientes e controles) para os quatro *loci* polimórficos testados mostrou que mediana do número de alelos polimórficos não diferiu entre pacientes e controles e que a presença de mais de

um alelo polimórfico (mediana do número de alelos alterados para os dois grupos) não aumenta o risco de câncer de cabeça e pescoço (OR 1,31; IC 95% 1,61-2,83; $p = 0,49$) (Tabela 5).

O modelo de regressão múltipla para as características sociodemográficas (idade e gênero) e fatores de risco (tabagismo e etilismo) não mostrou diferenças estatísticas significantes entre os dois grupos. Também foi realizado o mesmo teste para verificar a interação das características estudadas e a presença de mais de um alelo polimórfico (valor da mediana do número de alelos nos dois grupos) e não foram observadas diferenças (Tabela 6).

Os dados da análise dos parâmetros clínicos e polimorfismos estão apresentados na Tabela 7. Em relação ao sítio anatômico primário do tumor, para o gene *KISS-1* foi encontrada uma frequência aumentada do alelo polimórfico na faringe (OR = 2,32; IC 95% 1,12 – 4,82; $p = 0,02$); uma frequência aumentada em cavidade oral (OR = 1,86; IC 95% 1,05 -3,30; $p = 0,03$) e diminuída na laringe (OR = 0,40 IC 95% 0,22-0,74; $p = 0,003$) para o polimorfismo do gene *NINJI*. Para o gene *TAX1BP1* foi encontrado um aumento do polimorfismo na cavidade oral (OR = 2,25; IC 95% 1,20-4,21; $p = 0,01$). Não foram observadas diferenças na distribuição dos polimorfismos para a extensão tumoral e para o comprometimento dos linfonodos. Em relação ao estadiamento do tumor, há uma frequência menor do polimorfismo do gene *LADI* em tumores com estádios III e IV (OR = 0,39 IC 95% 0,18-0,83; $p = 0,01$).

As curvas de Kaplan-Meier estão apresentadas na Figura 1, e não mostraram diferenças entre a presença de pelo menos um polimorfismo (mediana do grupo de pacientes) e a taxa de sobrevida ($p = 0,20$) e o tempo de recidiva da doença ($p = 0,23$).

Discussão

Confirmando os dados encontrados na literatura, nosso estudo demonstrou que o câncer de cabeça e pescoço é mais freqüente em pessoas do sexo masculino, tabagistas e acima de 40 anos de idade. O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço é uma doença freqüentemente observada entre a quinta e sétima década de vida.^{35, 36} É sabidamente conhecido que o risco para este tipo de câncer aumenta consideravelmente com a idade, independente do sexo.³⁷ Embora mais que 90% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço tenham idade superior a 45 anos, a incidência desta doença em indivíduos mais jovens vem aumentando, com maior ocorrência na cavidade oral. Os mecanismos etiológicos nesta faixa etária ainda não estão bem esclarecidos. Há relatos que infecções virais (vírus papiloma humano e vírus Epstei-Barr) possam contribuir para o desenvolvimento desta neoplasia³⁷, e também que pacientes jovens parecem exibir predisposição à instabilidade genética, mostrando uma alta freqüência de instabilidade de microssatélites.³⁸ Uma das hipóteses para explicar tais diferenças é que o câncer oral é prevalente em indivíduos com mais idade devido à redução dos mecanismos antioxidantes da saliva e/ou aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas ao nitrogênio (RNS), ocasionando alterações no DNA.³⁹

O câncer oral afeta principalmente os homens em uma relação de gênero em torno de 10: 1. Embora tenha ocorrido um aumento da incidência do câncer de cabeça e pescoço entre as mulheres nas últimas décadas, a literatura mostra que o sexo masculino ainda é o mais acometido por esse tipo de tumor^{40, 41}

Os nossos resultados mostram uma alta freqüência de pacientes com os hábitos tabagista e etilista o que está de acordo com os dados da literatura, nos quais estes dois fatores de risco estão bem estabelecidos para esta doença.⁵⁻¹⁰

Em relação à distribuição genotípica, o gene *LADI* não encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), uma das possíveis explicações é que este resultado pode ser decorrente da seleção aleatória dos indivíduos estudados, modelo de doença adotada e mudanças aleatórias nas freqüências genotípicas em decorrência de erros de amostragem (deriva genética).⁴²⁻⁴⁴ As demais freqüências genotípicas encontram-se em equilíbrio.

Não há na literatura a descrição das alterações dos genes estudados e seus respectivos efeitos. O gene *KiSS-1* foi identificado por Lee e colaboradores em 1994⁴⁵ e consiste de três éxons, dos quais somente os éxons 2 e 3 são traduzidos em uma proteína de 145 aminoácidos com uma suposta sequência sinal. A função do produto do gene *KiSS-1* (kisspeptina) é reportada por atuar depois da ligação com o receptor do ligante natural da proteína G (gene *GPR54*). Após essa ligação o produto gênico inibe a quimiotaxia, a invasão e metástase das células.^{24,25} O trabalho de Brentani et al., 2003²², relata uma freqüência de 8% para o polimorfismo G no gene *KiSSI*, tal freqüência foi similar em nosso estudo em pacientes com câncer de cabeça e pescoço outros polimorfismos no gene *KiSS-1* (região 5', éxon 2 e 3) foram avaliados apenas em puberdade precoce.⁴⁶

O polimorfismo do gene *NINJI* (ala110asp) foi estudado apenas em hanseníase, mas nenhuma associação foi observada.⁴⁷ Seu produto, uma molécula de adesão, foi isolado primeiramente em células de Schwann, após uma lesão do nervo. A proteína localiza-se na superfície celular de células de Schwann e neurônios e tem um

papel importante na regeneração neuronal. Além disso, se expressa em vários tecidos humanos originados de células epiteliais (por exemplo, fígados, rins, glândulas adrenais). Uma expressão aumentada deste gene foi observada em indivíduos com carcinoma hepatocelular⁴⁸ e em pacientes com leucemia linfoblástica aguda.⁴⁹

Para os demais genes os estudos são relacionados apenas à expressão gênica e, portanto, o papel destes polimorfismos em doenças humanas não é conhecido.

O gene *TAXIBP1* participa como co-fator na reação dos fatores de necrose tumoral que desempenha um papel central no crescimento e desenvolvimento celular, e imunidade adaptativa.⁵⁰ Sua proteína em expressão elevada interage com a proteína anti-apoptótica zinc finger A20, que inibe a apoptose induzida por TNF (fator de necrose tumoral).⁵¹ A análise de outros polimorfismos deste gene foi associada com artrite reumatóide⁵², sabe-se também que este gene possui expressão elevada em câncer de ovário.⁵³ A proteína do gene *LADININ-1 (LADI)* é um dos componentes dos filamentos de ancoragem, componente de base de membranas na junção derme-epiderme.²⁸

Foram encontradas diferenças entre as frequências genotípicas e o sítio anatômico primário de tumor. Em nosso estudo a frequência aumentada do polimorfismo na cavidade oral nos genes *NINJI* e *TAXIBP1* e na laringe para o gene *KISS-1* sugerem que os mesmos possam favorecer o desenvolvimento do tumor neste sítio específico. Na laringe foi observada uma menor frequência do polimorfismo do gene *NINJI*. Estes fatos podem ser explicados pelas diferenças no comportamento biológico do câncer de cabeça e pescoço nos diferentes sítios anatômicos.⁵⁴

Para o gene *LADI* os resultados revelam uma menor frequência do alelo polimórfico em tumores mais agressivos (estádios III e IV). Pouco é conhecido a

respeito do papel deste gene na carcinogênese, sua proteína é um dos componentes dos filamentos de ancoragem. Sabe-se também que a expressão deste gene é diminuída em câncer de pulmão⁵⁵ e elevada em câncer de ovário.⁵⁶ Nossos resultados demonstram que há uma menor frequência do alelo polimórfico em tumores com estágio avançado, portanto com caráter mais agressivo, sugerindo a participação deste polimorfismo na evolução clínica do câncer.

Este estudo é o primeiro que analisa os polimorfismos não sinônimos A→G no gene *KiSS-1* metastasis-suppressor (*KiSS-1*) (gln36arg), A→C no gene (*NINJI*) (asn110ala), T→A de *TAXIBP1* (Human T-cell leukemia virus type I) (leu306ile), e o polimorfismo A→G no gene *LADI* (lys323glu).

Em conclusão não há associações entre os polimorfismos estudados e carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Há evidências de associação entre o polimorfismo do gene *KiSS-1* e a presença do câncer na laringe, entre os polimorfismos dos genes *NINJI* e *TAXIBP1* e cavidade oral e o alelo G do gene *LADI* confere menor agressividade.

Estes polimorfismos são marcadores de interesse para o estudo em câncer porque foram selecionados em uma biblioteca não enviesada (Projeto Genoma Humano do Câncer) e abre novas possibilidades para futuras investigações deste polimorfismo em diferentes tipos de cânceres. Estudos adicionais também podem avaliar a influência destes polimorfismos na expressão gênica e identificar associação destes com o desenvolvimento de carcinoma de cabeça e pescoço.

Referências Bibliográficas

1. Perez-Ordoñez B, Beauchemin M, Jordan RCK. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* **59**: 445-453, 2006.
2. Ragin CCR, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on a Human Papillomavirus. *J Den Res* 2007; **86**: 104-14.
3. Walker DM, Boey G, McDonald LA. The pathology of oral cancer. *Pathology* 2003; **35**: 376-83.
4. Instituto Nacional do Câncer. 2008; <http://www.inca.gov.br>. Acessado em 07/09/2008.
5. Ruiz MT, Pavarino-Bertelli EC, Maniglia JV, Ruback MJC, Goloni-Bertollo EM. Head and neck cancer epidemiology and biomarkers. *Arq Ciênc Saúde* 2006; **13**:34-9.
6. Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol Res Health* 2006; **29**:193-8.
7. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer* 2007; **110**:1429-35.
8. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2007; **99**: 777 – 89.

9. Boffetta P, Hecht S, Gray N, Gupta P, Straif K. Smokeless tobacco and cancer. *Lancet Oncol* 2008; **9**: 667–75.
10. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; **371**:1695- 1709.
11. Zain RB. Cultural and dietary risk factors os oral cancer and precancer – a brief overview. *Oral Oncol* 2001; **37**: 205-10.
12. McDowell JD. An overview of epidemiology and common risk factors for oral squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am.* 2006; **39**:277-94.
13. Pytynia KB, Grant JR, Etzel CJ, Roberts D, Wei Q, Sturgis EM. Matched analysis of survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck diagnosed before and after 40 years of age. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; **130**:869-73.
14. Agulnik M. Malignancies of the head and neck: the role for molecular targeted agents. *Expert Opin Ther Targets* 2007;**11**:207-17.
15. Garg K, Green P, Nickerson D. Identification of candidate coding region single nucleotide polymorphisms in 165 human genes using assembled expressed sequence tags. *Genome Res* 1999; **9**:1087-92.
16. Carlson CS. Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. *Nat Genet* 2003; **33**:518-21.
17. Sabeti PC, Reich DE, Higgins JM, Levine HZ, Richter DJ, Shaffner SF, et al. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature* 2002; **419**:832-7.
18. Gresham D, Dunham MJ, Botstein D. Comparing whole genomes using DNA microarrays. *Nat Rev Genet.* 2008; **9**:291-302.

19. Kruglyak L. The road to genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 2008; **9**:314-8.
20. de Souza SJ, Camargo AA, Briones MR, Costa FF, Nagai MA, Verjovski-Almeida S, et al.. Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**:12690-3.
21. Dias Neto E, Correa RG, Verjovski-Almeida S, Briones MRS, Nagai MA, Silva Jr, WA. Shotgun sequencing of human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci* 2000; **97**: 3491-6.
22. Brentani H, Caballero OL, Camargo AA, da Silva AM, da Silva WA Jr, Dias Neto E, et al. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 13418-23.
23. Costa MCR, Silva WA, Holanda AJ, Tojal I, Dias-Neto E, Guimarães, PEM. et al.. Identification of coding single nucleotide polymorphisms (cSNPs) in gene expressed in tumoral cells using the HCGP-ORESTES database. *Am J Hum Gen* 2001; **69**:540.
24. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, et al. Metastasis suppressor gene *KiSS-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **411**:613–617, 2001.
25. Makri A, Pissimissis N, Lembessis P, Polychronakos C, Koutsilieris M. The kisspeptin (KiSS-1)/GPR54 system in cancer biology. [Epub ahead of print].
26. Araki T, Milbrandt J. Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. *Neuron* 1996; **17**: 353–61.

27. Gachon F, Peleraux A, Thebault S, Dick J, Lemasson I, Devaux C, Mesnard JM. CREB-2, a cellular CRE-dependent transcription repressor, functions in association with Tax as an activator of the human T-cell leukemia virus type 1 promoter. *J Virol* 1998; **72**: 8332-7.
28. Motoki K, Megahed M, Laforgia S, Uitto J. Cloning and chromosomal mapping of mouse laminin, a novel basement membrane zone component. *Genomics* 1997; **39**: 323-30.
29. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang M-J, Jen J, Sidransky D. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000; **60**:3155-9.
30. Kjaerheim K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancer: a prospective study of 10,900 Norwegian men. *Cancer Causes Controls* 1998; **9**: 99-108.
31. Greene FLPD, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M. *AJCC Cancer Staging Manual* 6 ed. Springer, NY, USA 2002.
32. Instituto Nacional do Câncer. UICC- União Internacional Contra o Câncer, 2002 – TNM – Classificação de Tumores Malignos 6ª. Edição. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA 2004.
33. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells *Nucleic Acids Res* 1988; **16**:1215.
34. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:2766-70, 1989.

35. Marchioni DML, Fisberg RM, Góis Filho JF, Kowalski LP, Carvalho MB, Abrahão M et al. Fatores dietéticos e câncer oral: estudo caso-controle na Região Metropolitana de São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Publ* 2007; **23**: 553-64.
36. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004; **10**:766–72.
37. Goldstein DP, Irish JC. Head and neck squamous cell carcinoma in the young patient. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; **13**:207—11.
38. Wang Y, Irish J, MacMillan C, Brown D, Xuan Y, Boyington C, et al. High frequency of microsatellite instability in young patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma: lack of involvement of the mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2. *Int J Cancer*. 2001; **93**:353-60.
39. Hershkovich O, Shafat I, Nagler RM. Age-related changes in salivary antioxidant profile: possible implications for oral cancer. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007; **62**:361-6.
40. de Carvalho MB, Lenzi J, Lehn CN, Fava AS, Amar A, Kanda JL et al. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino. *Rev Ass Med Brasil* 2001; **47**: 208-14.
41. Stewart BW, Kleihues P. *World cancer report*. Lyon: IARC Press; 2003.
42. Xu J, Turner A, Little J, Bleecker ER, Meyers DA. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Hum Genet* 2002; **111**:573-4.

43. Llorca J, Prieto-Salceda D, Combarros O, Dierssen-Sotos T, Berciano J. Competing risks of death and Hardy-Weinberg equilibrium in case-control studies of gene-disease association. *Gac Sanit* 2005; **19**:321-4.
44. Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* 2005; **76**:967-86.
45. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Insitute* 1996; **88**:1731-7.
46. Luan X, Zhou Y, Wang W, Yu H, Li P, Gan X, Wei D, Xiao J. Association study of the polymorphisms in the KiSS1 gene with central precocious puberty in Chinese girls. *Eur J Endocrinol* **157**: 113-118, 2007.
47. Cardoso CC, Martinez AN, Guimarães PEM, Mendes CT, Pacheco AG, Oliveira RB, et al. Ninjurin 1 asp110ala single nucleotide polymorphism is associated with protection in leprosy nerve damage. *J Neuroimmunol* 2007; **190**: 131–8.
48. Kim JW, Moon AR, Kim JH, Yoon SY, Oh GT, Choe YK, et al. Up-regulation of ninjurin expression in human hepatocellular carcinoma associated with cirrhosis and chronic viral hepatitis. *Mol Cells* 2001; **11**:151-7.
49. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, Neale GA, Mihara K, Pui CH, et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001; **97**:2115-20.
50. Shembade N, Harhaj NS, Liebl DJ, Harhaj EW. Essential role for TAX1BP1 in the termination of TNF- α , IL-1- and LPS-mediated NF- κ B and JNK signaling. *The EMBO J* 2007; **26**: 3910–22.

51. Shembade N, Harhaj NS, Yamamoto M, Akira S, Harhaj EW. The human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein requires the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 for NF-kappaB activation. *J Virol* 2007; **81**:13735-42.
52. Dieguez-Gonzalez R, Akar S, Calaza M, Perez-Pampin E, Costas J, Torres M, et al. Genetic variation in the NF{kappa}B pathway in relation to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008 Apr 23. [Epub ahead of print]
53. L'Espérance S, Popa I, Bachvarova M, Plante M, Patten N, Wu L, et al. Gene expression profiling of paired ovarian tumors obtained prior to and following adjuvant chemotherapy: molecular signatures of chemoresistant tumors. *Int J Oncol.* 2006; **29**:5-
54. Timar, J Csuka O, Remenar E, Repassy G, Kasler M. Progression of head and neck squamous cell cancer. *Cancer Metastasis Rev* **24**: 107–127, 2005.
55. Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaesler Z, Pacyna-Gengelbach M, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 13784-9.
56. Santin AD, Zhan F, Bellone S, Palmieri M, Cane S, Bignotti E et al. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int J Cancer* 2004; **112**:14-25.

Tabela 1. Seqüência de oligonucleotídeos *primers* e temperaturas de anelamento (Ta) das Reações em Cadeia da Polimerase.

Gene	Seqüência de <i>primer sense</i>	Seqüência de <i>primer antisense</i>	Ta
<i>KiSS-1</i>	5' GAGCTTCCAAAAGGTCAAG 3'	5' AGTAGCAGCTGGCTTCCTC 3'	57°
<i>NIN1</i>	5'CTCTGGGCGACAAAACATCC 3'	5' CCTCGCGCCCCATCTCC 3'	62°
<i>TAX1BP1</i>	5'ACCTGGGTCTCCTAAATCCT 3'	5' AGCCTGCCAATCTCTTCTT 3'	57°
<i>LAD1</i>	5'GAAGGAGGCTGGTGTCTGAG 3'	5'CACTGCCAACCTGGAGTG T 3'	63°

Tabela 2. Distribuição dos dados demográficos dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço e indivíduos do grupo controle.

Variável	Pacientes	Controles	p
	n (%)	n (%)	
Gênero			< 0.0001
Masculino	209 (86)	294 (71.19)	
Feminino	34 (14)	119 (28.81)	
Média de idade ± DP*	58 ± 9,58	48 ±13,85	< 0.0001
Consumo de cigarro	218 (89,71)	207 (50,12)	< 0.0001
Consumo de álcool	188 (77,37)	192 (46,49)	< 0.0001

*DP = Desvio padrão

Tabela 3. Frequência gênica na análise univariada.

Genótipo	Pacientes	Controles	p
	n (%)	n (%)	
<i>KISS-1</i>			0,56
AA	203 (83,54)	334 (80,87)	
AG	39 (16,05)	75 (18,16)	
GG	01(0,41)	04 (0,97)	
<i>NINJI</i>			0,12
AA	149 (61,32)	284 (68,77)	
AC	81 (33,33)	115 (27,84)	
CC	13 (5,35)	14 (3,39)	
<i>TAXIBPI</i>			0,84
TT	187 (76,95)	322 (77,97)	
TA	49 (20,17)	82 (19,85)	
AA	07 (2,88)	09 (2,18)	
<i>LADI</i>			0,27
AA	67 (27,57)	118 (28,57)	
AG	98 (40,33)	142 (34,38)	
GG	78 (32,10)	153 (37,05)	

Tabela 4. Frequências genótípicas dos polimorfismos dos genes *KiSS-1*, *NINJI*, *TAX1BP1*, *LAD1*.

Genótipo	Pacientes n (%)	Controles n (%)	OR (IC 95%)*	p
<i>KiSS-1</i>				
AA	203 (83,54)	334 (80,87)	Referência	
AG e GG	40 (16,46)	79 (19,13)	0,85 (0,52-1,39)	0,5092
<i>NINJI</i>				
AA	149 (61,32)	284 (68,77)	Referência	
AC e CC	94 (38,68)	129 (31,23)	1,16 (0,78 – 1,73)	0,4639
<i>TAX1BP1</i>				
TT	187 (76,95)	322 (77,97)	Referência	
TA + AA	56 (23,05)	91 (22,03)	0,92 (0,58-1,45)	0,7195
<i>LAD1</i>				
AA	67 (27,57)	118 (28,57)	Referência	0,861
AG e GG	176 (72,43)	295 (71,43)	1,04 (0,68-1,59)	

*Ajustado para idade, gênero e hábitos tabagista e etilista

Tabela 5. Número de alelos polimórficos entre pacientes e controles.

Número de alelos alterados	Pacientes n (%)	Controles n (%)
0	25 (10,33)	58 (14,08)
1	98 (40,50)	163 (39,56)
2	93 (38,43)	149 (36,17)
3	27 (11,15)	39 (9,47)
4	0	03 (0,73)

Tabela 6. Distribuição dos dados demográficos, fatores de risco e genótipos dos polimorfismos estudados em odds ratio (OR) para o câncer de cabeça e pescoço.

Variáveis	Odds OR (IC 95%)*				
	Gene <i>KISS-1</i>	Gene <i>NINJ</i>	Gene <i>TAX1BP1</i>	Gene <i>LAD1</i>	Mais de um alelo polimórfico
Gênero					
Masculino	0,99 (0,74 – 1,32)	1,45 (0,93-2,26)	0,99 (0,59-1,64)	1,11 (0,68-1,79)	1,47 (0,61-3,52)
Idade					
> 50	0,69 (0,38 – 1,28)	1,07 (0,66-1,76)	0,92 (0,52-1,63)	0,93 (0,54-1,58)	1,53 (0,58-4,02)
Consumo de cigarro					
Sim	1,02 (0,59-1,78)	1,09 (0,70-1,70)	0,92 (0,56-1,51)	1,07 (0,66-1,71)	1,22 (0,51-2,91)
Consumo de álcool					
Sim	1,40 (0,74-2,65)	1,03 (0,63-1,69)	0,76 (0,44-1,31)	1,06 (0,62-1,80)	1,19 (0,46-3,10)

*Ajustado para idade, gênero, consumo de cigarro e álcool

Tabela 7. Características clínico-patológicas e polimorfismos estudados.

Característica Clínica	Odds Ratio (IC 95%)			
	Gene <i>KISS-1</i>	Gene <i>NINJ</i>	Gene <i>TAX1BP1</i>	Gene <i>LADI</i>
Sítio primário de tumor				
Cavidade oral	1,36 (0,72-2,60); 0,34	1,86 (1,05 -3,30); 0,03	2,25 (1,20-4,21); 0,01	1,79 (0,91-3,50); 0,09
Faringe	2,32 (1,12 – 4,82); 0,02	1,27 (0,68-2,35); 0,45	0,49 (0,22-1,09); 0,08	0,77 (0,40-1,46); 0,42
Laringe	0,82 (0,38-1,77); 0,62	0,40 (0,22-0,74); 0,003	0,77 (0,39-1,52); 0,45	0,96 (0,51-1,78); 0,89
Extensão do tumor				
T1/T2	1,0 (ref)	1,0 (ref)	1,0 (ref)	1,0 (ref)
T3/T4	1,10 (0,54-2,26); 0,79	1,09 (0,61-1,91); 0,78	1,17 (0,61-2,24); 0,78	0,54 (0,29-1,02); 0,06
Comprometimento dos linfonodos				
N0	1,0 (ref)	1,0 (ref)	1,0 (ref)	1,0 (ref)
N+	0,66 (0,31-1,40); 0,27	1,48 (0,83-2,63); 0,19	0,64 (0,32-1,27); 0,20	0,68 (0,37-1,27); 0,23
Estadiamento				
I/II	1,0 (ref)	1,0 (ref)	1,0 (ref)	1,0 (ref)
III/IV	0,69 (0,31-1,55); 0,37	1,22 (0,65-2,31); 0,53	0,92 (0,45-1,86); 0,81	0,39 (0,18-0,83); 0,01

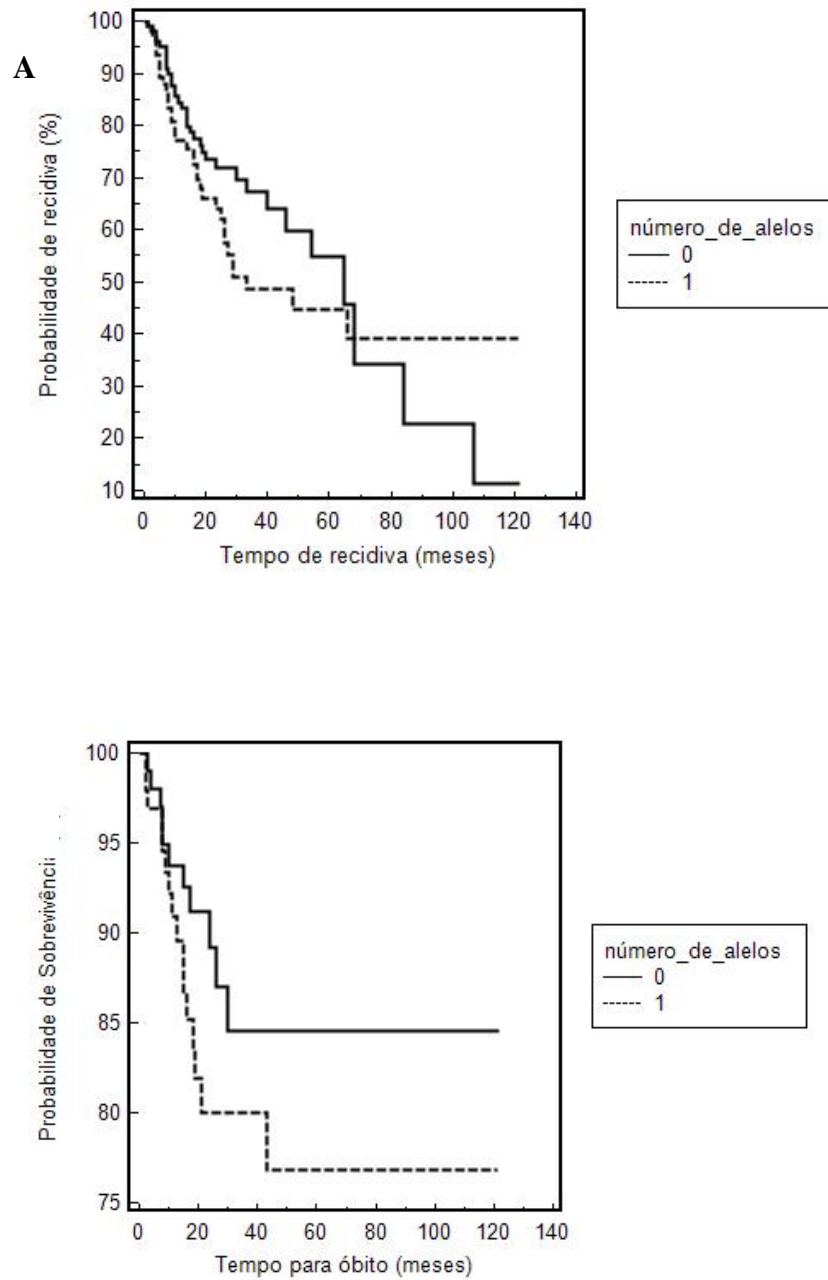


Figura 1. Curvas de Kaplan–Meier para tempo de óbito (A) e tempo de recidiva da doença (B). O grupo 0 representa até 1 alelo alterado e o grupo 1 os genótipos com mais de um alelo alterado.

CONCLUSÕES

III. CONCLUSÕES

1. No Serviço Ambulatorial de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base de São José do Rio Preto, o câncer de cabeça e pescoço é mais freqüente em homens, com média de idade de 61 anos, e com hábitos tabagista e etilista. O sítio anatômico primário mais representativo é a cavidade oral, e o tipo histológico predominante é o carcinoma espinocelular.
2. O genótipo *MTR* A2756G está associado ao câncer de cabeça e pescoço, enquanto as freqüências genótípicas dos polimorfismos dos genes *VEGF*, , *KiSS-1*, *NINJI*, *TAXIBP1* e *LADI* não diferenciaram entre pacientes e controles.
3. Não há evidências de associação entre os polimorfismos *MTR*, *VEGF*, , *KiSS-1*, *NINJI*, *TAXIBP1* e *LADI* com os hábitos tabagista, etilista, gênero e idade.
4. Há evidências de associação entre o polimorfismo do gene *KiSS-1* e a presença do câncer na laringe, entre os polimorfismos dos genes *NINJI* e *TAXIBP1* e cavidade oral. Em relação à extensão tumoral o alelo A polimórfico do gene *VEGF* parece conferir proteção para a evolução clínica do tumor e o alelo G do gene *LADI* confere menor agressividade.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lee KJ. Essential Otolaryngology-Head & Neck Surgery. 8nd ed. New York: McGraw-Hill; 2003.
2. Döbrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer and Metastasis Rev* 2005; 24: 9-17.
3. Ragin CCR, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on a Human Papillomavirus. *J Den Res* 2007; 86: 104-14.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.
5. Perez-Ordoñez, B, Beauchemin M, Jordan RCK. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 2006; 59: 445-53.
6. Walker DM, Boey G, Mcdonald LA. The pathology of oral cancer. *Pathology* 2003; 35: 376-83.
7. Ruiz MT, Pavarino-Bertelli EC, Maniglia JV, Ruback MJC, Goloni-Bertollo EM. Head and neck cancer epidemiology and biomarkers. *Arq Ciênc Saúde* 2006; 13:34-9.
8. Wusch-Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol* 2002; 38:737-46.

9. Marchioni DML, Fisberg RM, Góis Filho JF, Kowalski LP, Carvalho MB, Abrahão M et al. Fatores dietéticos e câncer oral: estudo caso-controle na Região Metropolitana de São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Publ* 2007; 23: 553-64.
10. Instituto Nacional do Câncer. 2008; <http://www.inca.gov.br>. Acessado em 07/09/2008.
11. Wunsch Filho, V. The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil. *Sao Paulo Med J* 2004; 122(5):188-94.
12. Alvarenga, LM, Ruiz, MT, Pavarino-Bertelli EC, Ruback MJC, Maniglia, JV, Goloni-Bertollo EM. Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2008; 74:68-73.
13. Zain RB. Cultural and dietary risk factors os oral cancer and precancer – a brief overview. *Oral Oncol* 2001; 37: 205-10.
14. McDowell JD. An overview of epidemiology and common risk factors for oral squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am* 2006; 39:277-94.
15. Sarini J, Fournier C, Lefebvre J-L, Bonafos G, Van JT, Coche-Dequéant B. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Elderly Patients. A Long-term Retrospective Review of 273 Cases. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127:1089-92.
16. Goldstein DP, Irish JC. Head and neck squamous cell carcinoma in the young patient. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 13:207—11.

17. Hershkovich O, Shafat I, Nagler RM. Age-related changes in salivary antioxidant profile: possible implications for oral cancer. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007; 62:361-6.
18. Wang Y, Irish J, MacMillan C, Brown D, Xuan Y, Boyington C, et al. High frequency of microsatellite instability in young patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma: lack of involvement of the mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2. *Int J Cancer*. 2001; 93:353-60.
19. de Carvalho MB, Lenzi J, Lehn CN, Fava AS, Amar A, Kanda JL et al. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino. *Rev Ass Med Brasil* 2001; 47: 208-14.
20. Stewart BW, Kleihues P. *World cancer report*. Lyon: IARC Press; 2003.
21. Durazzo MD, Araújo CEN, Brandão Neto JS, Potenza AS, Costa P, Takeda F et al. Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: increasing incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastases. *Clinics* 2005;60:293-8.
22. Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol Res Health* 2006; 29:193-8.
23. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer* 2007; 110:1429-35.

24. Hashibe M , Brennan P, Benhamou S , Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 777 – 89.
25. Boffetta P, Hecht S, Gray N, Gupta P, Straif K. Smokeless tobacco and cancer. *Lancet Oncol* 2008; 9: 667–75.
26. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; 371:1695- 1709.
27. Licitra L, Rossini C, Bossi P, Locati LD. Advances in the changing patterns of aetiology of head and neck cancers. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 14:95–9.
28. Nagler R, Dayan D. The dual role of saliva in oral carcinogenesis. *Oncology* 2006;71:10–7.
29. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 2006; 7:149-56.
30. Warnakulasuriya S, Parkkila S, Nagao T, Preedy VR, Pasanen M, Koivisto H et al. Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia (pre-cancer) and cancer. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 157–65.
31. Lee YC, Boffetta P, Sturgis EM, Wei Q, Zhang ZF, Muscat J, et al. Involuntary smoking and head and neck cancer risk: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17:1974-81.

32. Wiseman SM, Swede H, Stoler DL, Anderson GR, Rigual NR, Hicks WL Jr, et al. Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers and nondrinkers: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcomes. *Ann Surg Oncol*. 2003;10:551-7.
33. Lo AKF, Lo KW, Tsoz SW, Wongz HL, Hui JWY, To KF, et al. Epstein-Barr virus infection alters cellular signal cascades in human nasopharyngeal epithelial cells. *Neoplasia* 2006; 8: 173 – 80.
34. Yap Y-Y, Hassan S, Chan M, Choo PK, Ravichandran M. Epstein-Barr virus DNA detection in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 136: 986-91.
35. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:465-75.
36. Psyrrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 5: 24-31.
37. Guha N, Boffetta P, Wünsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, Curado MP, et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol* 2007;166:1159–73.
38. Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 2006; 124:823–35.
39. Abnet CC, Qiao Y-L, Dawsey SM, Dong Z-W, Taylor PR, Mark SD. Tooth loss is associated with increased risk of total death and death from upper

- gastrointestinal cancer, heart disease, and stroke in a Chinese population-based cohort. *Int J Epidemiol* 2005;34:467–74.
40. Vaezi MF, Sepi M, Qadeer MA, Lopez R, Colabianchi N. Laryngeal cancer and gastroesophageal reflux disease: a case-control study. *Am J Med* 2006; 119:768-76.
41. Qadeer MA, Colabianchi N, Strome M, Vaezi MF. Gastroesophageal reflux and laryngeal cancer: causation or association? A critical review. *Am J Otolaryngol* 2006; 27:119– 28.
42. Galli J, Cammarota G, Volante M, De Corso E, Almadori G, Paludetti G. Laryngeal carcinoma and laryngo-pharyngeal reflux disease. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2006; 26:260-3.
43. Franceschi S, Levi F, Conti E, Talamini R, Negri E, Maso LD, et al. Energy intake and dietary pattern in cancer of the oral cavity and pharynx. *Cancer Causes and Control* 1999; 10: 439-44.
44. Petridou E, Zavras AI, Lefatzis D, Dessypris N, Laskaris G, Dokianakis G, et al. The role of diet and specific micronutrients in the etiology of oral carcinoma. *Cancer* 2002; 94:2981-8.
45. Rodriguez T, Altieric A, Chatenoudc L, Gallusc S, Bosettic C, Negric E. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol* 2004; 40: 207–13.
46. Suzuki T, Wakai K, Matsuo K, Hirose K, Ito H, Kuriki K. Effect of dietary antioxidants and risk of oral, pharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma according to smoking and drinking habits. *Cancer Sci* 2006; 97: 760–7.

47. Pytynia KB, Grant JR, Etzel CJ, Roberts D, Wei Q, Sturgis EM. Matched analysis of survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck diagnosed before and after 40 years of age. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130:869-73.
48. Agulnik M. Malignancies of the head and neck: the role for molecular targeted agents. *Expert Opin Ther Targets* 2007;11:207-17.
49. Garg K, Green P, Nickerson D. Identification of candidate coding region single nucleotide polymorphisms in 165 human genes using assembled expressed sequence tags. *Genome Res* 1999; 9:1087-92.
50. Carlson CS. Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. *Nat Genet* 2003; 33:518-21.
51. Sabeti PC, Reich DE, Higgins JM, Levine HZ, Richter DJ, Shaffner SF, et al. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature* 2002; 419:832-7.
52. Gresham D, Dunham MJ, Botstein D. Comparing whole genomes using DNA microarrays. *Nat Rev Genet.* 2008; 9:291-302.
53. Kruglyak L. The road to genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 2008; 9:314-8.
54. Kang S, Kim JW, Kang GH, Park NH, Song YS, Kang SB, et al. Polymorphism in folate- and methionine-metabolizing enzyme and aberrant CpG island hypermethylation in uterine cervical cancer. *Gyn Oncol* 2005; 96:173-80.
55. Zhang Z, Shi Q, Liu Z, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of Methionine Synthase and Methionine Synthase Reductase and Risk of Squamous

- Cell Carcinoma of the Head and Neck: a Case-Control Analysis. *Cancer Epidemiol Biom & Prev* 2005; 14: 1188-93.
56. Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, et al. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res* 2002; 62:4519-24.
57. Ott N, Geddert H, Sarbia M. Polymorphisms in methionine synthase (A2756G) and cystathionine beta-synthase (844ins68) and susceptibility to carcinomas of the upper gastrointestinal tract. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134:405-10.
58. Kotsopoulos J, Zhang WW, Zhang S, McCready D, Trudeau M, Zhang P, Sun P, Narod SA. Polymorphisms in folate metabolizing enzymes and transport proteins and the risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008.
59. Mohammadi M, Ollier WE, Hutchinson IV. A functional association study of VEGF gene promoter polymorphisms with VEGF expression by stimulated pbm cells. *Hum Immunol* 2003;64:S125.
60. Shahbazi M, Fryer AA, PravicaV, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:260 - 4.
61. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, et al. A common polymorphism in the 5' – untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51:1635-9.
62. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 795-803.

63. Howell WM, Bateman AC, Turner SJ, Collins A, Theaker JM. Influence of vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms on tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immun* 2002; 3:229-32.
64. Kim EJ, Jeong P, Quan C, Kim J, Bae SC, Yoon SJ, et al. Genotypes of TNF- α , VEGF, hOGG1, GSTM1, and GSTT1: useful determinants for clinical outcome of bladder cancer. *Urology* 2005; 65:70-5.
65. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004;46:293-8.
66. Lee SJ, Lee SY, Jeon H-S, Park SH, Jang JS, Lee GL, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:571-5.
67. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res* 2002; 62:3369-72.
68. Sfar S, Hassen E, Saad H, Mosbah F, Chouchane L. Association of VEGF genetic polymorphisms with prostate carcinoma risk and clinical outcome. *Cytokine* 2006; 35:21-8.
69. Kim JG, Sohn SK, Chae YS, Cho YY, Bae H-I, Yan G, Park JY, Lee M-H, Chung HY, Yu W. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with gastric cancer. *Ann Oncol* 2007; 18: 1030-6.

70. Lu H, Shu X-O, Cui Y, Kataoka N, Wen W, Cai Q et al. Association of genetic polymorphisms in the VEGF gene with breast cancer survival. *Cancer Res* 2005; 65: 5015-9.
71. Jin Q, Hemminki K, Enquist K, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in relation to breast cancer development and prognosis. *Clin Cancer Res* 2005;11: 3647 -53.
72. Hsiao PJ, Lu MY, Chiang FY, Shin SJ, Tai YD, Juo SH. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in thyroid cancer. *J Endocrinol* 2007; 195:265-70.
73. Ku K-T, Wan L, Peng H-C, Tsai M-H, Tsai C-H, Tsai F-J. Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for oral cancer. *Oral Oncol* 2005; 41: 497–502.
74. Yapijakis C, Vairaktaris E, Vassiliou S, Vylliotis A, Nkenke E, Nixon AM, Derka S, Spyridonidou S, Vorriss E, Neukam F, Patsouris E. The low VEGF production allele of the +936C/T polymorphism is strongly associated with increased risk for oral cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133:787–91.
75. Ünal ZN, Ünal M, Bagdatoglu OT, Polat G, Atik U. Genetic polymorphism of VEGF-1154 (A/G) in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Med Res* 2008; 39: 209-11.
76. Cheng CY, Chang CS, Liu CJ, Kao SY. Vascular endothelial growth factor 936 C/T polymorphism is associated with vascular invasion in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106:79-84.

77. Souza SJ, Camargo AA, Briones MR, Costa FF, Nagai MA, Verjovski-Almeida S, et al.. Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:12690-3.
78. Dias Neto E, Correa RG, Verjovski-Almeida S, Briones MRS, Nagai MA, Silva Jr, WA. Shotgun sequencing of human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 3491-6.
79. Brentani H, Caballero OL, Camargo AA, da Silva AM, da Silva WAJr, Dias Neto E, et al. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 13418-23.
80. Costa MCR, Silva WA, Holanda AJ, Tojal I, Dias-Neto E, Guimarães, PEM. et al.. Identification of coding single nucleotide polymorphisms (cSNPs) in gene expressed in tumoral cells using the HCGP-ORESTES database. *Am J Hum Gen* 2001; 69:540.
81. Harms JF, Welch DR, Miele ME. KISS1 metastasis suppression and emergent pathways. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20:11–8.
82. Stark AM, Tongers K, Maass N, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Reduced metastasis-suppressor gene mRNA-expression in breast cancer brain metastases. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131:191-8.
83. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Li W, Charytonowicz E, Belbin TJ, et al. Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am J Pathol* 2003; 163: 505–16.

84. Ikeguchi M, Yamaguchi K, Kaibara N. Clinical Significance of the Loss of KiSS-1 and orphan G-Protein–Coupled receptor (hOT7T175) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Research* 2004;10:1379–83.
85. Dhar DK, Naora H, Kubota H, Maruyama R, Yoshimura H, Tonomoto Y, et al. Downregulation of KISS-1 expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 10: 868-72.
86. Kim JW, Moon AR, Kim JH, Yoon SY, Oh GT, Choe YK, et al. Up-regulation of ninjurin expression in human hepatocellular carcinoma associated with cirrhosis and chronic viral hepatitis. *Mol Cells* 2001; 11:151-7.
87. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, Neale GA, Mihara K, Pui CH, et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001; 97:2115-20.
88. Shembade N, Harhaj NS, Liebl DJ, Harhaj EW. Essential role for TAX1BP1 in the termination of TNF- α , IL-1- and LPS-mediated NF- κ B and JNK signaling. *The EMBO J* 2007; 26: 3910–22.
89. Shembade N, Harhaj NS, Yamamoto M, Akira S, Harhaj EW. The human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein requires the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 for NF- κ B activation. *J Virol* 2007; 81:13735-42.
90. Dieguez-Gonzalez R, Akar S, Calaza M, Perez-Pampin E, Costas J, Torres M, et al. Genetic variation in the NF- κ B pathway in relation to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008 Apr 23. [Epub ahead of print]
91. L'Espérance S, Popa I, Bachvarova M, Plante M, Patten N, Wu L, et al. Gene expression profiling of paired ovarian tumors obtained prior to and following

adjuvant chemotherapy: molecular signatures of chemoresistant tumors. *Int J Oncol.* 2006; 29:5-24.

92. Motoki K, Megahed M, Laforgia S, Uitto J. Cloning and chromosomal mapping of mouse ladinin, a novel basement membrane zone component. *Genomics* 1997; 39: 323-30.

APÊNDICE

CASUÍSTICA E MÉTODO

a) Caracterização da amostra para a análise molecular

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (parecer 5566/2005) e do Conselho Nacional de Saúde – CONEP (parecer 178/98 - Processo 25000.018584/98-13), foram incluídos na pesquisa 805 indivíduos (254 pacientes com câncer de cabeça e pescoço e 551 indivíduos sem história de neoplasia). (Anexo I e II).

Fizeram parte do estudo indivíduos adultos independentemente do sexo, idade e cor da pele que concordaram em participar após os esclarecimentos necessários e a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os pacientes foram procedentes do Hospital Arnaldo Vieira de Carvalho de São Paulo e do Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base, hospital de Ensino da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e foram incluídos no estudo após exame patológico. Os indivíduos sem história de neoplasia foram provenientes do Hemocentro e de ambulatórios de outras especialidades médicas do Hospital de Base (HB).

b) Análise dos dados demográficos e clínicos

As variáveis analisadas incluíram idade, sexo, hábitos tabagista e etilista. Informações sobre o tabagismo e etilismo foram limitadas quanto ao uso ou não de tabaco e álcool. Foram considerados tabagistas indivíduos que consomem cerca de 100 cigarros durante toda a vida e etilistas aqueles que bebem mais que quatro drinques por semana. ^(1,2) Os dados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados sociodemográficos dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço e indivíduos controles.

Variáveis	Pacientes	Controles
	n (%)	n (%)
Nº de indivíduos	254	551
Idade	58	50
Uso de tabaco	227 (89,37)	277 (50,27)
Uso de álcool	198 (77,95)	269 (48,82)
Sexo		
Sexo masculino	218 (85,83)	377 (68,42)
Sexo feminino	36 (14,17)	174 (31,58)

c) Sítios primários de tumor

Os tumores foram classificados quanto à localização anatômica em cavidade oral, faringe e laringe, de acordo com Lee, 2003. ⁽³⁾. Os dados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição entre os casos por sítio primário de ocorrência do tumor.

Sítio anatômico primário	n (%)
Cavidade oral	97 (38,19)
Laringe	82 (32,28)
Faringe (orofaringe, nasofaringe e hipofaringe)	66 (25,98)
Sítio primário não conhecido	09 (3,55)

d) Classificação dos tumores malignos (TNM)

Os tumores foram classificados de acordo com os parâmetros da *Union International Control Cancer (IUCC)*, 2002 ⁽⁴⁾ e *American Joint Committee for Cancer (AJCC)*, 2002 ⁽⁹⁶⁾ em três critérios: tamanho do tumor (T), presença de linfonodos regionais comprometidos (N) e presença de metástase à distância (M). Foram obtidos os TNM dos 236 casos analisados (Tabelas 3 e 4). Nesta análise, foram excluídos os tumores com sítio primário não conhecido devido ao pequeno número de amostras, em relação à presença de metástase (M) apenas um paciente foi classificado como M1.

Para os tumores de cavidade oral e faringe, o T varia de Tx (não é possível avaliar), T0 (não há evidências de tumor primário), Tis (carcinoma in situ), T1 (tumor menor que 2 cm), T2 (tumor entre 2 e 4 cm), T3 (tumor maior que 4cm) e T4 (tumor invadindo estruturas adjacentes que depende da localização primária dele para a classificação). Com relação à presença de linfonodos (N) os tumores são classificados em Nx (os linfonodos regionais não podem ser avaliados), N0 (ausência de metástase em linfonodos regionais), N1 (metástase em um único linfonodo homolateral menor que 3cm), N2 a, b, c (metástase em um único linfonodo homolateral de 3 a 6 cm ou em

linfonodos homolaterais múltiplos menores que 6cm ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais menores que 6 cm) e N3 (metástase em linfonodos maiores que 6 cm). Já o M pode ser classificado em Mx (a presença de metástase à distância não pode ser avaliada), M0 (ausência de metástase à distância) e M1 (presença de metástase à distância).

Para os tumores de laringe a categoria T (referente à extensão do tumor) varia de T1 a T4, com classificações diferentes para supraglote, glote e subglote. Para supraglote a categoria T varia de T1 (uma sub-localização anatômica e mobilidade normal), T2 (mucosa de mais de uma sub-localização adjacente da supraglote ou da glote, ou de região adjacente fora da supraglote; sem fixação), T3 (Fixação da corda, ou invasão da área pós-cricóide, tecidos pré-epiglóticos, espaço paraglótico, erosão da cartilagem tireóide) e T4 (Toda a cartilagem tireóide; traquéia, partes moles do pescoço: músculos profundos/extrínsecos da língua, alça muscular tireóide e esôfago e espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais, artéria carótida). Para a glote varia de T1 (limitado à(s) corda(s) vocal(is), mobilidade normal a uma corda ou ambas as cordas), T2 (supraglote, subglote, mobilidade de corda vocal diminuída), T3 (fixação da corda, espaço paraglótico, erosão de cartilagem tireóide), T4 (toda a cartilagem tireóide; traquéia; partes moles do pescoço: músculos profundos/extrínsecos da língua, alça muscular; tireóide e esôfago e espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais, artéria carótida).

Na Tabela 5 estão apresentados os dados relativos ao estadiamento dos tumores.

Tabela 3. Distribuição dos sítios anatômicos primários do tumor em relação ao TNM (categoria T).

Sítio primário do tumor	T1	T2	T3	T4	Tx
Cavidade oral	19	18	14	37	00
Laringe	16	14	16	28	02
Faringe	03	21	14	25	00

Tabela 4. Distribuição dos sítios anatômicos primários do tumor em relação ao TNM (categoria N).

Sítio primário do tumor	N0	N+	Nx
Cavidade oral	55	33	00
Laringe	50	25	01
Faringe	29	33	01

Tabela 5. Distribuição dos sítios anatômicos primários do tumor em relação ao estágio.

Sítio primário de tumor	I	II	III	IVA	IVB
Cavidade Oral	17	14	13	45	00
Faringe	02	12	11	32	02
Laringe	14	13	11	28	03

METODOLOGIA

a) Análise Molecular

1. Extração de DNA genômico a partir de sangue periférico

O DNA foi obtido por meio da técnica segundo Miller et al. (1988), ⁽⁶⁾ com modificações descrita a seguir.

a.1) Isolamento de leucócitos:

Uma amostra de 5 mL de sangue periférico foi colhida em um tubo *vacutainer*, contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e homogeneizada em seguida. Com auxílio de uma pipeta estéril, a amostra foi colocada em um tubo de centrifuga de 15 mL contendo a mesma quantidade de Ficoll-Paque Plus (Amersham BiosciencesTM). O material foi, então, centrifugado por 30 minutos a 1.500 rpm, para formação de três camadas distintas: hemáceas ao fundo do tubo, *ficoll* na camada intermediária e plasma na superfície do tubo. O plasma foi aspirado e descartado com uma pipeta Pasteur. Em seguida, a camada de leucócitos foi aspirada e transferida para um novo tubo. Aos leucócitos isolados, foi adicionada solução tampão (PBS) até atingir 15 mL. O tubo contendo os leucócitos foi invertido cuidadosamente e centrifugado por 12 minutos a 1.200 rpm. Após centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de leucócitos ressuspendido. Novamente, o tubo recebeu PBS e foi centrifugado como anteriormente. Ao final do processo, o *pellet* foi ressuspendido em 0,5 mL de PBS.

a.2) Extração de DNA genômico:

Aos leucócitos isolados, foram adicionados 3 mL de tampão de lise (TrisHCl 10mM, NaCl 400mM, Na₂EDTA 2mM); 200 µL de SDS (Sodium dodecyl sulfate) 10%; 50µL de proteinase K (20mg/mL). Em seguida, o tubo foi incubado por 16 horas a

37°C, para a digestão protéica. Após incubação, acrescentou-se 1 mL de NaCl 6 M e o tubo foi agitado no vórtex até a solução formar espuma. O material permaneceu em gelo por 15 minutos, foi novamente agitado e, então, centrifugado por 15 minutos a 2.000 rpm. Após centrifugação, o tubo recebeu 10 mL de etanol 100% gelado e foi invertido cuidadosamente para a precipitação do DNA. O DNA precipitado foi lavado em etanol 70% e mantido em temperatura ambiente para secar. Posteriormente, foi ressuscitado em água Mili-Q autoclavada e armazenado a 20°C para posterior amplificação. As amostras de DNA obtidas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro CARY no comprimento de onda de 260 nm para determinação da concentração e grau de pureza no laboratório de Bioquímica do Prof. Dr. Gustavo Bonilha na UNESP de São José do Rio Preto.

b. Análise molecular dos polimorfismos

b.1) Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a análise molecular dos polimorfismos foi utilizada a amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As seqüências dos oligonucleotídeos *primers*, bem como as temperaturas de anelamento estão apresentadas na Tabela 6.

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 20 µL, utilizando-se 50 ng de DNA genômico, 0,3 mM de *primer sense*, 0,3 mM de *primer antisense*, 200 mM dNTP, 1X tampão de reação, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 U de Taq polimerase. A amplificação por PCR foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento apresentada na Tabela 6 por 30 segundos e extensão das

cadeias a 72°C por 30 segundos. Uma etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos.

Tabela 6. Seqüência de oligonucleotídeos *primers* e temperaturas de anelamento (Ta) das Reações em Cadeia da Polimerase.

Gene	Seqüência de <i>primer sense</i>	Seqüência de <i>primer antisense</i>	Ta
<i>MTR</i>	5' CCAGGGTGCCAGGTATACAG 3'	5'GCCTTTTACACTCCTCAAAACC3	57°
<i>KiSS-1</i>	5' GAGCTTCCAAAAGGTCAAG 3'	5' AGTAGCAGCTGGCTTCCTC 3'	57°
<i>NINJ1</i>	5'CTCTGGGCGACAAAACATCC 3'	5' CCTCGCGCCCCATCTCC 3'	62°
<i>TAX1BP1</i>	5'ACCTGGGTCTCCTAAATCCT 3'	5' AGCCTGCCAATCTCTTCTT 3'	57°
<i>LAD1</i>	5'GAAGGAGGCTGGTGTCTGAG 3'	5'CACTGCCAACCTGGAGTG T 3'	63°

b.2) Análise molecular do polimorfismo A2756G do gene MTR

Os produtos amplificados de 498 pares de bases (pb) foram visualizados em gel de agarose 1,5%, após eletroforese a 120 Volts, por 50 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio (concentração final de 0,5 mg/ml) e observado em luz ultravioleta.

Os produtos de PCR serão submetidos à digestão enzimática, utilizando-se a enzima *Hae III*. Os produtos de PCR e de restrição enzimática foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE (Tris-EDTA-Borato), e identificados sob luz UV após coloração com brometo de etídeo (Figura 1).

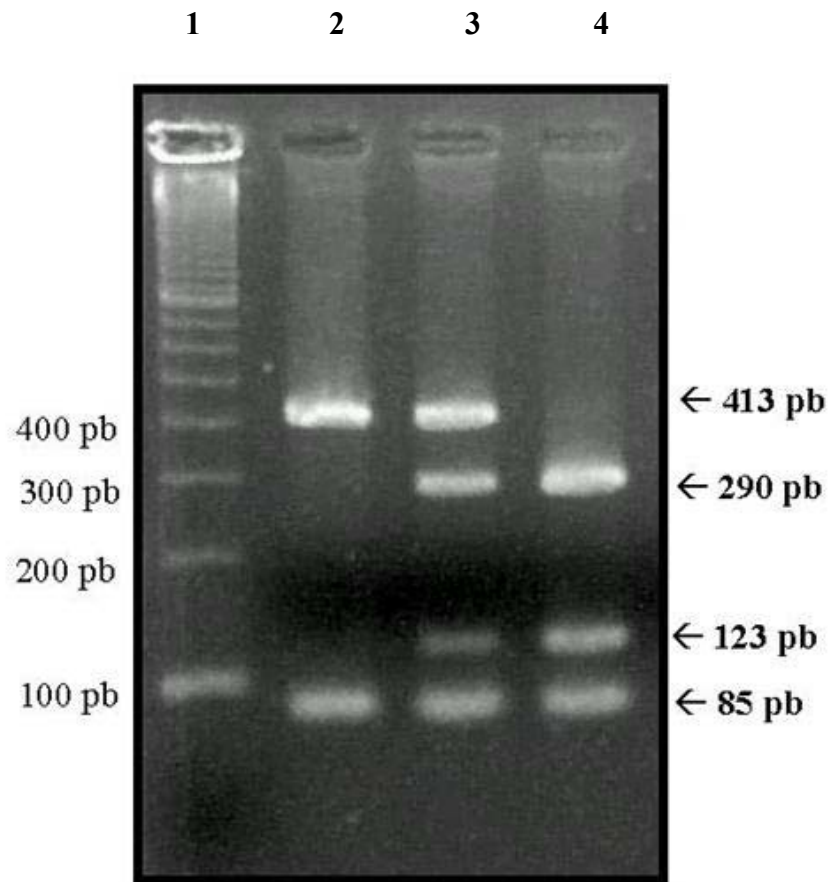


Figura 1. Digestão com a enzima *Hae III* do produto de PCR do gene *MTR* os genótipos estudados (Linha 2, homocigoto AA, linha 3 heterocigoto AG e linha 4 homocigoto GG) Na primeira linha do gel, pode-se observar o marcador de peso molecular e ao lado da foto o tamanho de cada um destes fragmentos.

b.3) Análise molecular do polimorfismo -1154 G/A do gene *VEGF*

A análise para o gene *VEGF* foi realizada pelo método de discriminação alélica pelo de PCR em Tempo Real (aparelho ABI PRISM 7500 *Sequence Detection Systems* - *Applied Biosystems*) usando o sistema de sondas fluorogênicas 5' com sondas *Taqman Minor Groove Binder* (MGB). Para os genótipos selvagens foi utilizada a marcação FAM e para os mutantes a marcação VIC. O volume final de cada reação foi de 5 µL, consistindo de 1,5 µL de *Taqman Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*), 0,2 mM de cada *primer*, 0,2 mM de cada sonda *Taqman* e 5 ng de DNA genômico. A amplificação do PCR foi realizada com uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos com 92°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os sinais fluorescentes foram medidos a 60°C. Os *primers* e sondas para o polimorfismo G -1154 A foram feitos pela *Applied Biosystems* (ID - C_1647379-10).

Para a análise foi utilizado o software SDS versão 2.0 para analisar a fluorescência emitida em tempo real e o final da reação de PCR (endpoint read) (Figura 2).

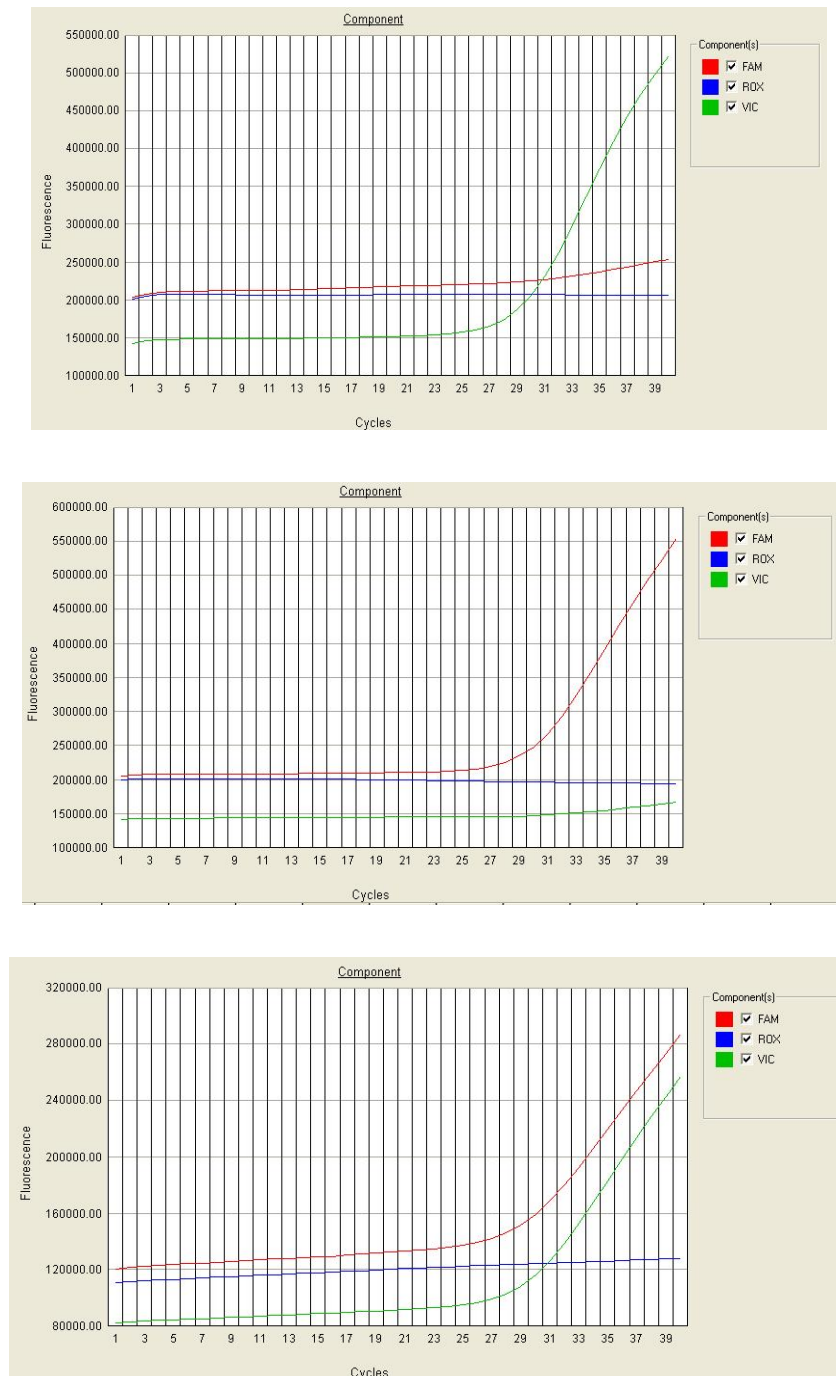


Figura 2. Curvas da discriminação alélica produzidas pela análise no software SDS. O eixo X representa o número de ciclos de amplificação e o eixo y, o valor da fluorescência. (A) Exemplo de um homocigoto (GG); (B) Exemplo de um homocigoto (AA); (C) Exemplo de um heterocigoto (GA).

b.4) Análise molecular do polimorfismo G→A do gene *KiSS-1*

Os produtos amplificados de 194 pares de bases (pb) foram visualizados em gel de agarose 1,5%, após eletroforese a 120 Volts, por 50 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio (concentração final de 0,5 mg/ml) e observado em luz ultravioleta.

b.4.1) Análise de polimorfismo conformacional de fita simples do DNA (do inglês: *Single Strand Conformation Polymorphism*)

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida na concentração de 7,5% para a identificação dos padrões de migração eletroforética, segundo técnica descrita por Orita e colaboradores em 1989, com modificações. ⁽⁷⁾

O conteúdo total da reação de PCR (10 mL) foi misturado com 10 mL do tampão de corrida (95% formamida, 5 mM NaOH, 0,1% de azul de bromofenol e 0,1 mL de xileno cianol). As amostras foram desnaturadas a 95°C por 10 minutos, resfriadas imediatamente em gelo e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5 %. A corrida eletroforética foi realizada a 180 Volts durante 3 horas em temperatura ambiente, na presença do tampão 0,5X TBE (0,04 M Tris, 1 M ácido bórico, 0,5M EDTA pH 8,0). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com nitrato de prata. Brevemente, o gel foi colocado em solução fixadora (30 mL de etanol, 2,25 mL de ácido acético, 267 mL de água ultra-pura) por 10 minutos, em seguida, foi corado com uma solução de nitrato de prata a 0,2%, durante 10 minutos. A revelação do gel foi realizada com solução de hidróxido de sódio e formaldeído (4,5 gramas de hidróxido de sódio, 400 mL de formaldeído, 150 mL de água ultra-pura) por um período de 5 a 7

minutos. Para bloquear a revelação utilizou-se solução fixadora descrita anteriormente. O gel foi envolvido em papel celofane e mantido em temperatura ambiente (Figura 3).

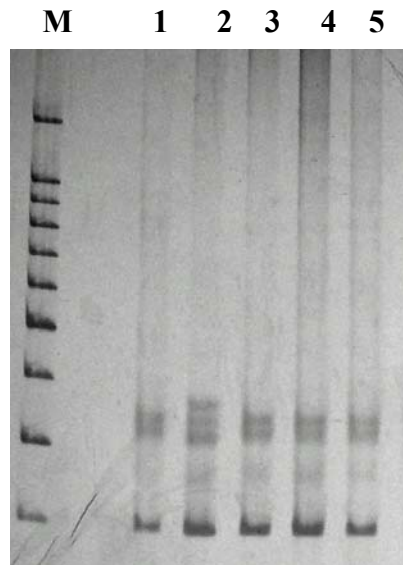


Figura 3. Gel de poliacrilamida 7.5% apresentando os padrões de migração eletroforética dos produtos de amplificação do gene *KiSS-1* após a técnica de SSCP (Coluna M: marcador de peso molecular 100 pb; colunas 1, 3, 4 e 5: padrão usual - genótipo AA e coluna 2: padrão não usual – genótipo AG).

b.4.2) Seqüenciamento automático do gene *KiSS-1*

Após a análise pela técnica de SSCP, os diferentes padrões de migração eletroforética observados foram submetidos ao seqüenciamento automático. Aproximadamente 19,6 ng/ μ L (em uma proporção de ng/ μ L) do produto de amplificação do gene *KiSS-1* foi submetido a uma reação de amplificação para o

seqüenciamento das cadeias *sense* e *antisense*. Foram utilizados 2 μL de *Big Dye Terminator* e 1 μL de cada *primer* em reações separadas.

A reação de amplificação para seqüenciamento compreendeu uma primeira etapa de 2 segundos a 96°C para desnaturação da cadeia de DNA e 25 ciclos de 10 segundos a 96°C , 5 segundos para anelamento dos *primers* em temperatura de 50°C e 4 minutos a 60°C para extensão das cadeias.

As amostras amplificadas foram precipitadas com 100 μL de etanol absoluto gelado, 5 μL de acetato de potássio (KOAc) 3M e 30 μL de água, homogeneizadas aproximadamente 30 vezes por inversão e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugadas por 30 minutos a 3200 rpm a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, receberam 200 μL de etanol 70% e centrifugadas por 5 minutos a 3200 rpm a 4°C . O sobrenadante foi descartado e foi realizada nova adição de etanol 70% e centrifugação. A placa foi, então, invertida, centrifugada por 3 minutos a 720 rpm e seca em estufa a 37°C por uma hora.

Após a precipitação, as amostras receberam 1,5 μL de tampão de corrida (formamida e azul dextran) e foram homogeneizadas aproximadamente 25 vezes, desnaturadas por 2 minutos a 95°C e mantidas no gelo até o momento de aplicação no gel de poliacrilamida 5% do seqüenciador ABI Prism, do Laboratório de Genética Humana, da UNESP- São José do Rio Preto.

b.5. Análise molecular do polimorfismo A→C do gene *NINJI*

b.5.1) Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP)

O produto de amplificação de 342 pb foi submetido à restrição enzimática com a enzima de restrição *Hae III*, segundo as instruções do fabricante, para a detecção do polimorfismo A→C. A digestão enzimática gera um fragmento de 212 pb derivado do alelo A, e fragmentos de 176 pb e 36 pb na presença do alelo C. Fragmentos menores também são gerados e não são visualizados no gel.

Os indivíduos homozigotos (AA) apresentaram, no gel de eletroforese, apenas um fragmento de 212 pb, os heterozigotos (AC) apresentam dois fragmentos (212 pb e 176 pb) e os homozigotos (CC) apresentam um fragmento de 176 pb (Figura 4).

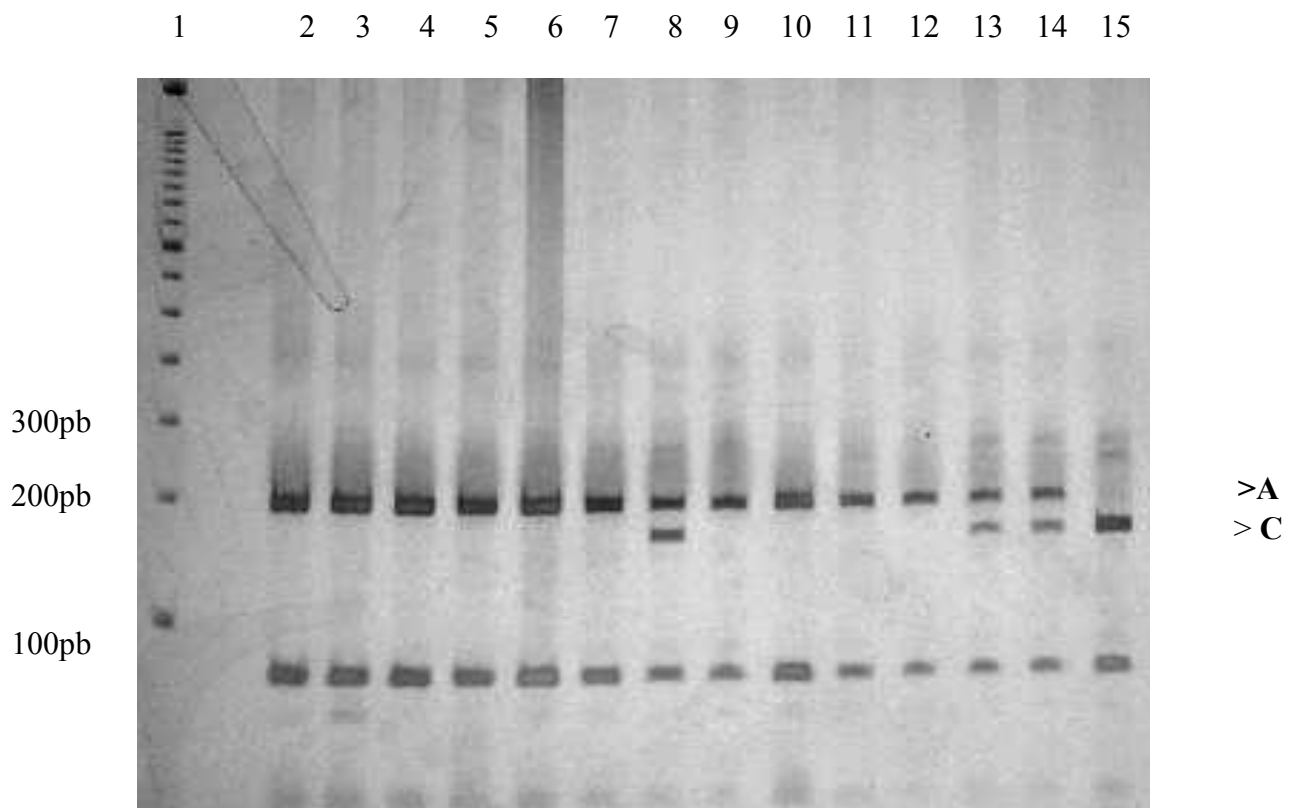


Figura 4. Digestão com a enzima *Hae III* do produto de PCR do gene *NINJ 1* mostrando os dois alelos observados (A com 212 pb e C com 176 pb) e os três diferentes genótipos (Linhas 8, 13, 14 heterozigotos AC; linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 homozigotos AA e linha 15 homozigoto CC). Na primeira linha do gel, pode-se observar o marcador de peso molecular e ao lado da foto o tamanho de cada um destes fragmentos.

b.5) Análise molecular do polimorfismo T→A do gene *TAX1BP1***b.5.1) Polimorfismo de comprimento de restrição (PCR-RFLP)**

Para a análise do polimorfismo, o produto amplificado do gene *TAX1BP1* foi digerido com a enzima de restrição *Apo I*. A presença do polimorfismo destrói o sítio de restrição, não ocorrendo o corte do amplificado de 264 pb. Na ausência do polimorfismo, o produto é digerido em dois fragmentos (um fragmento de 205 pb e outro fragmento de 59 pb) (Figura 5).

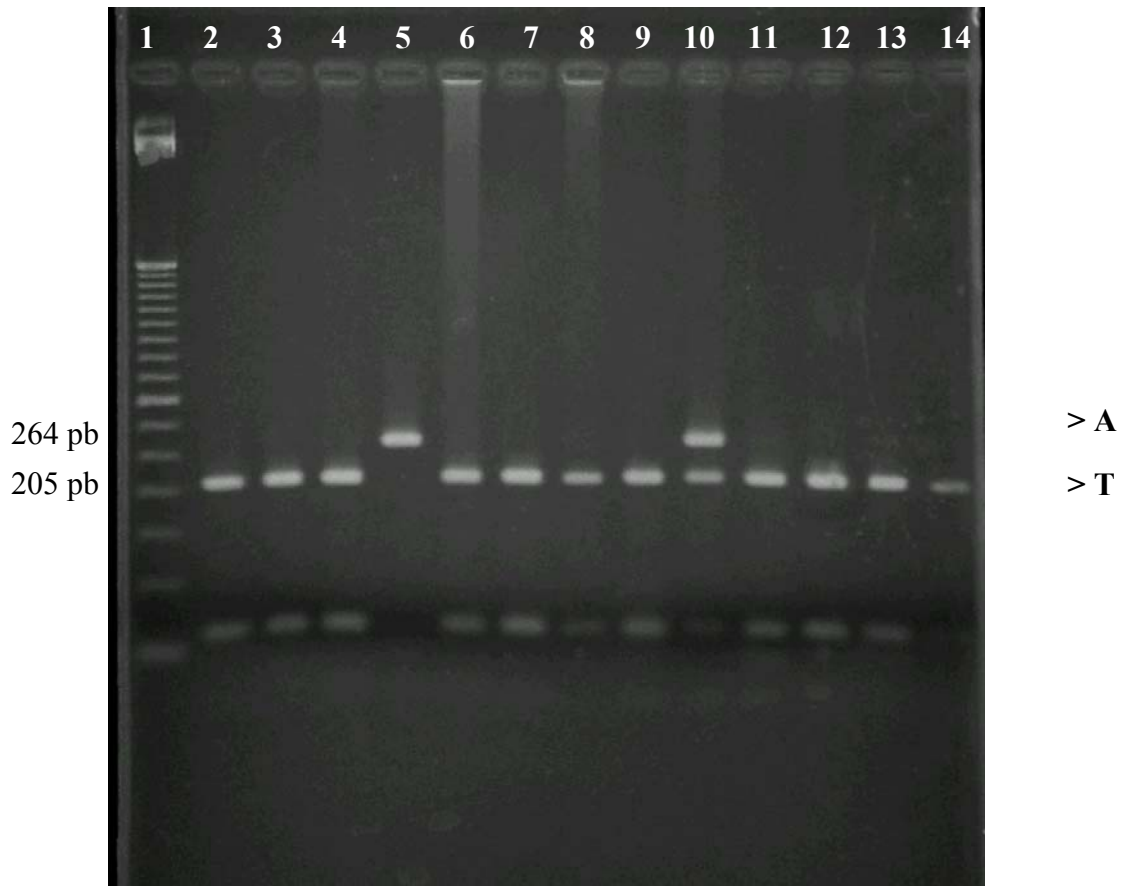


Figura 5. Gel de eletroforese após digestão com a enzima *Apo I* do produto de PCR do gene *TAX1BP1* mostrando os dois alelos observados (A com 264 pb e T com 205 pb) e os três diferentes genótipos (Linha 10, heterozigoto TA; linhas 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14 homozigotos TT e linha 5 homozigoto AA). Na primeira linha do gel, pode-se observar o marcador de peso molecular e ao lado da foto o tamanho de cada um destes fragmentos.

b. 6). Análise molecular do polimorfismo A - G do gene *LADI***b.6.1) Seqüenciamento automático**

O seqüenciamento automático destas amostras foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Élide Benquique Ojopi do Laboratório de Neurociências LIM-27 do Departamento de Psiquiatria da Universidade de São Paulo – USP.

A reação de seqüenciamento foi realizada com o kit BigDye® Terminator (*Applied Biosystems Inc*), segundo as instruções do fabricante.

Em um tubo de 0,2 mL contendo 5 µL de água ultra-pura autoclavada, 2 µL de tampão *Save Money* (1 mL cloreto de magnésio 50 mM; 2 mL de Tris-HCl 1 M; 7mL de água ultra-pura), 1 µL de pré-mix (kit *Big Dye*TM), foi adicionado 1µL de *primer sense* a 3,2 M e 1µL do produto purificado. A reação foi realizada evitando-se a iluminação direta, pois o reagente pré-mix possui os dNTPs marcados com fluorescência que degrada quando exposto à luz. A reação foi colada no termociclador para realização de 36 ciclos com 3 minutos de desnaturação inicial a 95°C, 30 segundos a 95°C para desnaturação, 20 segundos a 55°C para anelamento do *primer* e 4 minutos a 60°C para extensão das cadeias.

Após a reação de PCR com o kit de seqüenciamento, foi adicionado 80 µL de isopropanol 75%. O material foi homogeneizado em vórtex e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a incubação, o material foi centrifugado por 45 minutos a 3.200 rcf e o sobrenadante foi desprezado. Foi adicionado 1500 µL de etanol 70% sobre o pellet formado e, então, o material foi centrifugado por 15 minutos a 3.200 rcf.

O sobrenadante foi desprezado e o material foi colocado por 15 minutos em estufa de secagem a 37°C. O material foi, então, envolvido em papel alumínio e acondicionado em freezer -20°C para ser ressuscitado em 10 µL de formamida no momento do seqüenciamento. A análise foi realizada a partir dos cromatogramas reproduzidos pelo seqüenciador automático (Figura 5).

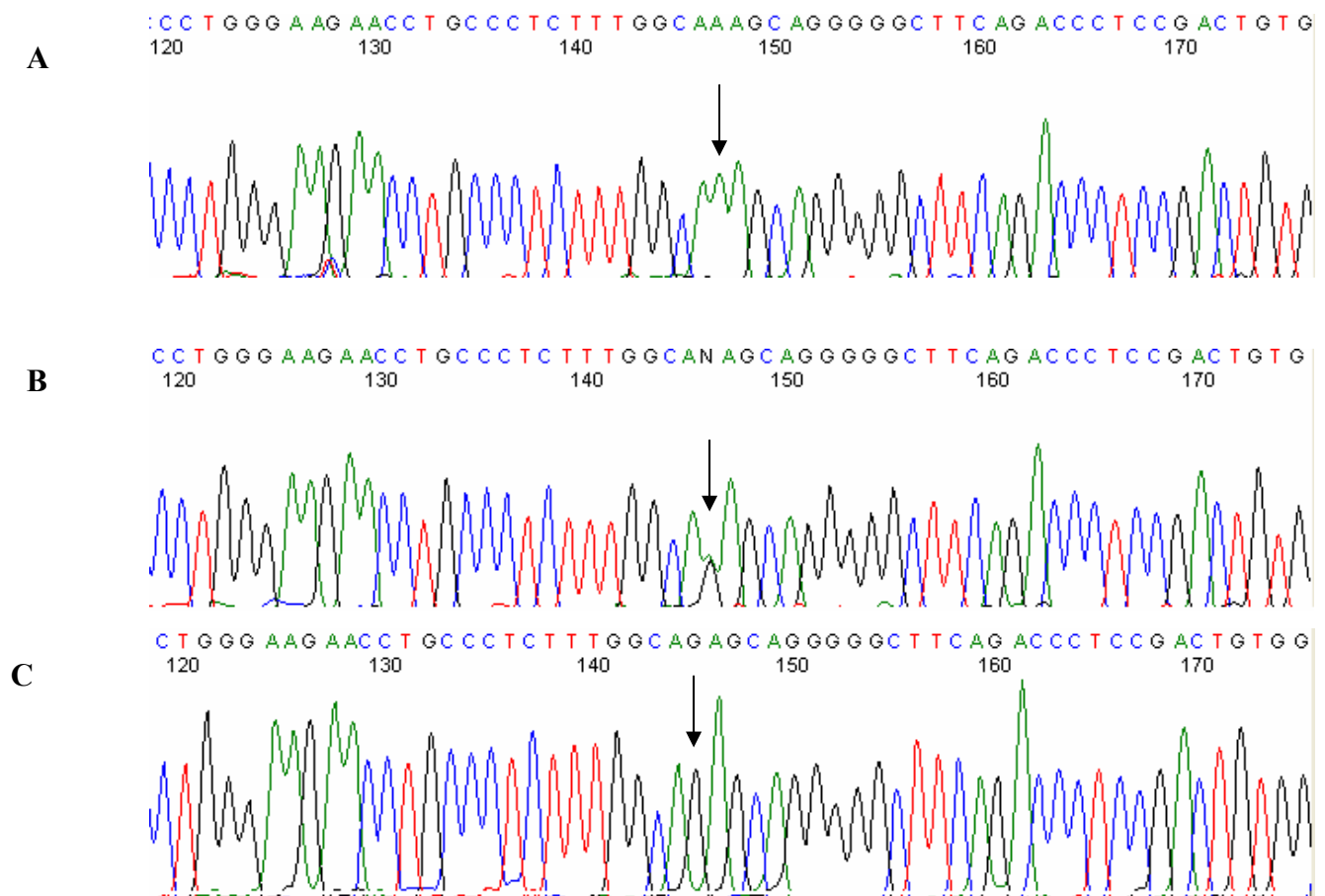


Figura 6. Cromatogramas apresentando o seqüenciamento automático do gene *LADININ*, as setas indicam o local analisado A: homozigoto AA; B: heterozigoto AG e C: homozigoto GG.

c) Análise estatística

Para a análise estatística, foram realizadas a análise utilizando-se os programas computacionais Minitab/Windows - Versão 12.22, GraphPad InStat – versão 3.0, Bio Estat versão 3.0 e Stats Directs versão 16.17.

Os dados demográficos foram tabulados por estatística descritiva e comparados pelo Teste Exato de Fisher. Este teste também foi utilizado para as análises estatísticas da distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi realizado pelo teste do qui-quadrado.

Os modelos de regressão logística múltipla foram utilizados para determinar o efeito das variáveis analisadas em câncer de cabeça e pescoço. Os modelos incluíram idade (referência: < mediana entre os dois grupos), gênero (referência: feminino), hábito tabagista (referência: não fumantes) e hábito etilista (referência: não etilistas).

As características clínico-patológicas também foram analisadas por regressão logística múltipla. A classificação T foi dividida em tumores com pequena extensão (T1,T2) e com grande extensão (T3, T4). A classificação N foi dicotomizada em comprometimento de linfonodos negativo (N0), e positivo (N1, N2, N3). Os estádios foram divididos em precoce (estádios I, II) e categoria avançada da doença (III e IV).

Os resultados foram apresentados em odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC – 95%). O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p=0,05$).

O método de Kaplan-Meier foi aplicado para avaliar as diferentes taxas de sobrevida e recorrência da doença entre os diferentes genótipos e o teste Log-Rank para medir estas diferenças entre os genótipos. Para a análise de sobrevida foram considerados como ponto final da análise (*end point*) o período compreendido entre o

diagnóstico da doença e o óbito, e para a análise da recorrência, o *end point* foi o diagnóstico de recidiva.

Referências citadas:

1. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang M-J, Jen J, Sidransky D. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000; 60:3155-9.
2. Kjaerheim K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancer: a prospective study of 10,900 Norwegian men. *Cancer Causes Controls* 1998; 9: 99-108.
3. Lee KJ. *Essential Otolaryngology-Head & Neck Surgery*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2003.
4. Instituto Nacional do Câncer. UICC- União Internacional Contra o Câncer, 2002 – TNM – Classificação de Tumores Malignos 6ª. Ed. Rio de Janeiro: INCA 2004.
5. Greene FLPD, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M. *AJCC Cancer Staging Manual*. 6 ed. New York: Springer, 2002.
6. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
7. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2766-70.

ANEXOS



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n° 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n° 74.179 de 14/06/74)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto tomou ciência e aprovou a ampliação da metodologia datada de 11 de novembro de 2005, referente ao protocolo n.º 5566/2005 sob a responsabilidade de Maurício José Cabral Ruback, com o título "Câncer de cabeça e pescoço: um levantamento epidemiológico do Hospital de Base/FAMERP de São José do Rio Preto".

São José do Rio Preto, 19 de dezembro de 2005.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. P. Cipullo', is positioned above the typed name.

Prof. Dr. José Paulo Cipullo
Vice- Coordenador do CEP/FAMERP



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 425/99

Processo nº 25000.024346/99-92 Registro CONEP = 669
Projeto de Pesquisa: "Investigação de biomarcadores em tumores de cabeça e pescoço".
Pesquisador Responsável: Profª. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva
Instituição: IBILCE / UNESP
Área Temática Especial: Genética humana.

Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 317/98, relativo ao projeto supracitado, considerou-se que:

- a) Foram atendidas as solicitações do referido parecer;
- b) O projeto atende aos requisitos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- c) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição acima.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado.

Brasília, 12 de agosto de 1999.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP-MS