Patrícia Leite de Godoi Adachi Ricardo

Proteínas e polimorfismos de genes de reparo de DNA na fotocarcinogênese em lábio

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Área de concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins

São Paulo
2009

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Ricardo, Patricia Leite de Godoi Adachi
Proteínas e polimorfismos de genes de reparo de DNA na fotocarcinogênese em lábio / Patricia Leite de Godoi Adachi Ricardo; orientador Marília Trierveiler Martins. -- São Paulo, 2009.
85p. : fig., tab.; graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Carcinoma epidermóide de lábio – Fotocarcinogênese em lábio 2. Queilite actínica – Fotocarcinogênese em lábio 3. Patologia bucal

CDD 617.63
BLACK D65

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ricardo, PLGA. Proteínas e polimorfismos de genes de reparo de DNA na fotocarcinogênese em lábio [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo ...../...../2009

Banca Examinadora

1)Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a)._____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3)Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a)._____

Titulação: _____

Julgamento: _____Assinatura:_____

5) Prof(a). Dr(a)._____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Rafael,

Nada em minha vida teria a mesma graça, o mesmo brilho e a mesma importância sem você.

Obrigada por seu apoio, paciência e amor.

Aos meus pais,

Aos quais sou grata não apenas por me apoiarem na minha trajetória acadêmica, mas por possibilitarem a minha existência.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins**, por aceitar me orientar e assim possibilitar meu doutorado, este trabalho e tantas experiências importantes em minha vida acadêmica. E ainda pelo seu exemplo de competência e dedicação à profissão.

Aos colaboradores deste trabalho, **Prof. Dr. Celso Lemos Jr, Profa. Dra. Mônica Andrade Lotufo, Dra. Maria Ângela Martins Mimura, Profa. Dra. Silvia Vanesa Lourenço e Prof. Dr. Marcelo Menta S. Nico**, por possibilitarem a coleta de material e entrevista dos pacientes.

À **Profa. Dra. Maria Luiza M. Arantes Frigerio** do projeto "Envelhecer Sorrindo" por gentilmente me conceder a oportunidade de coletar material e entrevistar os pacientes do projeto que fizeram parte do grupo controle.

A todos os **pacientes** que aceitaram participar deste projeto.

A todos os **amigos, professores e outros voluntários** que contribuíram entrando para o grupo controle.

A todos os amigos que contribuíram com a coleta do grupo controle (kit amigo), pela inestimável ajuda:

- **Alexandra Fontes da Costa**
- **Aluana Dal Vechio**

- **Ana Cláudia Luiz**
- **Camila Rodini**
- **Erika Martins Pereira**
- **Fabio Luiz Coracin**
- **Fernanda Giudice**
- **Henrique Cesar Purchio Brucoli**
- **Juliana Lucena Schussel**
- **Laura Pinhel**
- **Maria Fátima Guarizo Klingbeil**
- **Marina de Deus Moura de Lima**
- **Renata Acay**

Aos meus queridos amigos **Paulo Sérgio Silva Santos** e **Helder Pontes** e ao estimado **Prof. Dr. Élio Hitoshi Shinohara**, pelos casos clínicos que publicamos juntos, pela amizade e consideração.

Aos todos os meus queridos amigos da “Pato Bucal”, pela amizade, apoio e companheirismo; em especial à **Alexandra Fontes da Costa**, **Alexandre Meireles Borba, Arthur Rodriguez Gonzalez Cortes, Fabiana Martins e Martins, Felipe Perozzo Daltoé, Juliana Lucena Schussel, Lourdes Vanesa Chacon Hurtado, Nathalie Rezende, Paulo Henrique Brás e Thaís Acquafreda**. A convivência com vocês tornou muito mais leves, agradáveis e até mesmo divertidos os dias na pós-graduação.

Às queridas amigas **Camila Rodini e Flávia Caló** pelo convívio agradável que sempre tivemos no *lab* (e fora dele também), pela amizade e consideração.

Aos amigos que fiz e com os quais tive a grata oportunidade de conviver durante as clínicas de Estomatologia Clínica: **Gabriela Artico e Ophir Ribeiro Jr.**

Às meninas da “Iniciação”: **Gabriela Sanchez e Renata Caramez** (que agora já são mestrandas!), **Laura Pinhel e Lílian Perez**.

À **Taís Costa**, bolsista TT3 do nosso projeto, agradeço antecipadamente pelo trabalho laboratorial que será essencial para a conclusão do projeto.

À minha **tia Lurdinha** por me ajudar na coleta do grupo controle e que foi idealizadora do kit amigo.

As secretárias, **Zilda Ramos Alves, Néia Barbosa dos Santos e Nair Maria Pereira** por todo o apoio, consideração e paciência.

À **Elisa dos Santos** pela ajuda no laboratório e por seu constante bom humor.

À **Beatriz Costa** pela convivência agradável e pelos cafezinhos tão necessários depois do almoço...

A todos os **professores e funcionários** da disciplina de Patologia Bucal.

À FAPESP que está financiando o projeto (processo 08/54606-9) do qual esta tese é parte integrante.

À CAPES que me concedeu a bolsa de estudos possibilitando minha dedicação integral à pós-graduação.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu amiguxo **Fábio Luiz Coracin**,

pela amizade sincera, companheirismo, por poder contar com sua ajuda todas as vezes que precisei e também por todas as situações hilárias que passamos juntos.

Ricardo PLGA. Proteínas e polimorfismos de genes de reparo de DNA na fotocarcinogênese em lábio [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

O carcinoma epidermóide de lábio (CEL) e a queilite actínica (QA) são condições que atingem o vermelhão do lábio e são causadas pela exposição crônica e excessiva à radiação ultravioleta (UV) do sol. A absorção da radiação UV produz dois tipos predominantes de danos ao DNA, os dímeros de pirimidina-ciclobutanos (CPD) e os fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PP). Se não forem reparadas estas lesões induzidas por UV podem dar lugar a mutações em seqüências de DNA. Essas mutações compreendem a transição C→T e CC→ TT em seqüências dipirimidínicas, conhecidas como mutações com “assinatura” UV. CPDs e 6-4PPs são primariamente reparadas por um sistema de reparo de DNA chamado reparo por excisão de nucleotídeo (NER). Polimorfismos presentes em genes do NER podem gerar maior susceptibilidade ao desenvolvimento de vários tipos de câncer, incluindo o câncer de pele. O presente trabalho teve por objetivos: realizar levantamento epidemiológico de pacientes com QA e CEL bem como avaliar seus hábitos de exposição solar; verificar se os polimorfismos genéticos XPD (Asp312Asn) e XPD (Lys751Gln) estão relacionados com risco para o desenvolvimento de QA e verificar a expressão imunoistoquímica das proteínas XPC, XPF e dos CPDs em CEL e QA. Os hábitos de exposição solar e os dados epidemiológicos foram coletados através de um questionário aplicado a 84 pacientes com diagnóstico prévio de QA, 6 pacientes com diagnóstico de CEL e 63 indivíduos sem lesões. As reações de

imunoistoquímica foram realizadas em 38 casos de QA distribuídos nos diferentes graus de displasia epitelial, 9 casos de CEL e 7 casos sem alterações no epitélio. O estudo dos polimorfismos contou com 41 indivíduos no grupo controle e 63 no grupo QA, dos quais o DNA foi extraído a partir de amostras de raspado bucal. Através da entrevista, obtiveram-se informações condizentes com as da literatura internacional além de dados inéditos sobre hábitos de exposição solar de pacientes com QA. A análise dos genótipos mostrou que indivíduos que têm o genótipo AG no códon 312 do gene XPD apresentam maior risco de desenvolvimento de QA. O fato de ter residido em área rural e exercido atividades profissionais ao ar livre também estavam associados ao desenvolvimento da QA. Os achados da análise imunoistoquímica, nos permitem sugerir que a eficiência do NER está prejudicada na QA e que, portanto este sistema de reparo é importante para o desenvolvimento da fotocarcinogênese em lábio. Além disso, os casos que mostram acúmulo de CPD associado à ausência de XPC e XPF são provavelmente, os mais propensos a sofrerem transformação maligna, já que CPDs não reparados podem levar ao aparecimento de mutações no DNA.

Palavras-Chave: fotocarcinogênese – reparo de DNA – queilite actínica – carcinoma de lábio – polimorfismo

Ricardo PLGA. Proteins and polymorfism of DNA repair genes in lip photocarcinogenesis [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP;2009.

ABSTRACT

Lip squamous cell carcinoma (LSCC) and actinic cheilitis (AC) are both conditions affecting the vermilion border of the lip which are caused by chronic and excessive exposure to the ultraviolet (UV) radiation in sunlight. Absorption of UV radiation produces two predominant types of DNA damage, cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4PP). If not repaired, UV-induced DNA lesions can lead to mutations in the DNA sequences. These mutations are in the form of C-T and CC-TT transitions in dipyrimidine sequences, known as UV 'signature' mutations. CPDs and 6-4 PPs are primarily repaired by a DNA repair system called nucleotide excision repair (NER). Polymorphisms present in NER genes are related to the risk of developing varied types of cancer, including skin cancer. The objectives of the present study were: to carry out epidemiological data of patients with AC and LSCC as well as to evaluate their habits of solar exposure; to verify if genetic polymorphisms XPD (Asp312Asn) and XPD (Lys751Gln) are related to the risk of developing AC and to analyze the immunoexpression of XPC and XPF proteins and CPDs in LSCC and AC. Solar exposure habits and epidemiological data were collected through an interview survey, which was administered to 84 patients with prior diagnosis of AC, 6 patients with LSCC diagnosis and 63 individuals without injuries. Immunohistochemmical reactions were carried out on 38 cases of AC

distributed into the different degrees of epithelial dysplasia, 9 cases of CEL and 7 cases without epithelium alterations. The polymorphisms analysis was performed with 41 individuals in control group and 63 in AC group, from which the DNA was extracted from buccal scraped samples. The survey provided information that is on agreement with those in international literature besides unpublished data about solar exposure habits of AC patients. The analysis of the genotypes showed that individuals with the AG genotype in the codon 312 of the XPD gene, present higher risk to AC. Rural residence and outdoor working were also associated to the development of AC. Immunohistochemical findings suggest that in AC, there is a deficiency in NER; therefore, this DNA repair system is important to the lip photocarcinogenesis development. Furthermore, the cases which show CPD accumulation associated with XPC and XPF absence are probably, more prone to undergo malignant changes, since not repaired CPDs may lead to mutations in DNA.

Key words: photocarcinogenesis – DNA repair – actinic cheilitis – lip squamous cell carcinoma – polymorphism

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO 13

2 REVISÃO DE LITERATURA 15

3 PROPOSIÇÃO 25

4 MATERIAL E MÉTODOS 26

4.1 Pacientes e amostras 26

4.2 Microscopia de luz 27

4.3 Extração do DNA 28

4.4 Análise dos SNPs 28

4.5 Técnica de imunoistoquímica 31

4.6 Análise dos dados 33

5 RESULTADOS 35

5.1 Dados epidemiológicos 35

5.2 SNPs 44

5.3 Análise morfológica 47

5.4 Imunoistoquímica 47

6 DISCUSSÃO 58

7 CONCLUSÕES 69

REFERÊNCIAS 70

ANEXOS 81

1 INTRODUÇÃO

O câncer de lábio é uma das neoplasias mais freqüentes em cabeça e pescoço, sendo que o carcinoma epidermóide é o tipo histológico que responde por quase a totalidade dos casos nesse sítio.

O carcinoma epidermóide de lábio (CEL) pode desenvolver-se a partir de uma lesão pré-existente sabidamente causada pela exposição ao sol, a queilite actínica (QA).

A relação entre câncer de lábio e a radiação ultravioleta do sol (UV), particularmente em pessoas de pele clara, já foi estabelecida e tem sido amplamente considerada a principal causa de câncer de lábio.

A radiação UV é capaz de induzir a formação de lesões no DNA, conhecidas como de dímeros de pirimidina-ciclobutanos (CPD) e fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PP). Essas lesões podem dar lugar a mutações específicas que compreendem a transição C→T e CC→ TT em seqüências dipirimidínicas se não forem reparadas.

A eliminação destas lesões é realizada por um conjunto de proteínas que constituem o chamado sistema de reparo de DNA por excisão de nucleotídeo. Os genes que codificam estas proteínas são conhecidos como XP, assim como suas proteínas. Polimorfismos presentes nestes genes podem gerar maior susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasias malignas.

Estudos de polimorfismos presentes nestes genes, bem como de suas proteínas têm sido realizados em uma ampla variedade de neoplasias, mas nenhum estudo foi realizado em relação ao CEL ou QA.

Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo estudar a expressão imunoistoquímica de algumas proteínas XP e de dímeros de pirimidina em lesões de QA e CEL, além da relação de polimorfismos nestes genes com a presença dessas lesões.

Este trabalho foi realizado em colaboração com quatro diferentes centros: Disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da USP, Disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade Ibirapuera, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP – Divisão de Dermatologia e Centro de Especialidades Odontológicas (CEO) Flávio Gianotti.

Para a realização do estudo de polimorfismos foram selecionados casos provenientes dos centros colaboradores que tiveram diagnóstico prévio de QA e de CEL e como grupo controle, indivíduos que não apresentassem sinais clínicos e/ou histológicos dessas lesões nem qualquer outro tipo de neoplasia de boca.

Para as reações de biologia molecular, o DNA foi extraído a partir de amostras de raspado bucal. O DNA extraído foi amplificado por PCR, utilizando-se os pares de iniciadores adequados, digerido com enzima de restrição e analisado em gel de poliacrilamida.

Os casos submetidos à técnica de imunoistoquímica foram provenientes de material de biópsia previamente fixados e emblocados em parafina pertencentes ao acervo da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da USP.

Há poucos trabalhos na literatura dedicados a estabelecer os mecanismos envolvidos na etiologia da QA e do CEL. Neste sentido, acreditamos que a presente pesquisa poderá contribuir de forma significativa para o avanço de conhecimentos científicos na área de fotocarcinogênese em lábio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide de lábio

O câncer de lábio é a neoplasia mais freqüente em cabeça e pescoço depois das lesões de pele não-melanomas[1] e corresponde de 20 a 30% de todos os cânceres de boca[2,3,4]. O carcinoma epidermóide é o tipo histológico que responde por quase a totalidade dos casos nesse sítio[5].

A população mais atingida inclui pessoas de pele clara com pouca capacidade de bronzeamento e que apresentam eritema após a exposição solar[5], principalmente homens nas 7ª e 8ª décadas de vida[4,5,6].

A forma de apresentação clínica é variável. Lesões precoces podem apresentar-se como placas firmes e elevadas, como áreas de espessamento da mucosa com superfície verrucosa ou ainda como áreas eritroplásicas aparecendo como placas vermelhas com bordas irregulares. Lesões maiores tendem a apresentar uma área central necrótica produzindo uma ulceração irregular[7].

Comparado aos demais carcinomas epidermóides da cavidade oral, o carcinoma epidermóide de lábio (CEL) tem uma etiopatogenia distinta. O lábio inferior é considerado um sítio de alta exposição à luz solar e a relação entre câncer de lábio e radiação ultravioleta (UV) do sol, particularmente em pessoas de pele clara, já foi estabelecida e tem sido amplamente considerada sua principal causa[8,9,10]. Neste sentido, a etiopatogenia do câncer de lábio parece ser comparável a das neoplasias cutâneas relacionadas ao sol[5].

No entanto, seu comportamento não segue o padrão descrito para estas lesões. Um terço dos pacientes com CEL devem desenvolver outro CEL primário dentro de 5 anos[7]. Além disso, metástases são observadas em torno de 3 a 29% dos casos, tendem a ocorrer para os linfonodos submentonianos e submaxilares mas geralmente estão associadas com lesões maiores que 3 mm[7,11,12,13,14]. Esta taxa varia de acordo com o grau de diferenciação histopatológico. Segundo Quaedvlieg et al.[12], as lesões que sofrem metástases apresentam menor diferenciação, invasão de eosinófilos e plasmócitos e são classificados no mínimo em nível II de Clark. Metástases à distância são muito raras, mas já foram relatadas para pulmões, fígado e ossos[15].

Por outro lado, comparado ao carcinoma intra-oral seu prognóstico é significativamente mais favorável[16,17]. O índice de cura esperado é de 90% para lesões com menos de 2 cm. O índice de sobrevida é maior que a média dos carcinomas da cavidade oral, ocorrendo mortes em 5-10% dos casos[4,17]. Porém recidivas podem ocorrer em 5-20% dos casos.

Outros fatores além da radiação solar, que parecem estar implicados no desenvolvimento do CEL incluem fumo, imunossupressão e imunodeficiência, infecções virais e predisposição genética. Entretanto a via patogênica definitiva ainda não foi estabelecida[5,18,19].

O tratamento preconizado é a excisão cirúrgica associada ou não à radioterapia[13]. O esvaziamento cervical pode ser realizado quando há suspeita de linfonodos metastáticos[4,18]. Possíveis seqüelas do tratamento incluem a diminuição da abertura bucal e da elasticidade do lábio e xerostomia quando é feita a radioterapia[4].

2.2 Queilite actínica

Por definição queilite actínica (QA) se refere a uma condição do vermelhão do lábio que reúne características clínicas e histopatológicas causadas pela exposição crônica ao sol[20] e é análoga à queratose actínica da pele, podendo sofrer transformação maligna em 10-20% dos casos [21].

Segundo Main & Pavone[22] todos os casos de carcinoma de lábio desenvolvem-se virtualmente a partir de uma lesão de QA pré-existente, não havendo aspectos clínicos claros que permitam distinguir um carcinoma em estágio inicial da QA.

Esta patologia está intimamente relacionada a indivíduos que trabalham ao ar livre e expostos muito tempo à luz solar. Atinge predominantemente indivíduos do sexo masculino de pele clara e com idade entre 40 e 80 anos[23,24,25].

Assim como no CEL, o lábio inferior é o mais atingido, por sua localização, que o torna mais exposto e por possuir epitélio mais delgado que o lábio superior[26]. Um estudo realizado com 374 pacientes brasileiros revelou ocorrência de QA no lábio superior em apenas 4% dos casos[3].

Os achados clínicos incluem lábios ressecados com rachaduras e discreto aumento de volume difuso, áreas esbranquiçadas de espessura e extensão variadas, intercaladas por áreas eritematosas podendo ser tanto bem quanto mal definidas[17]. Geralmente alguns aspectos clínicos como áreas endurecidas, úlceras, placas brancas e perda de nitidez do limite entre lábio e pele são relacionados com o pior prognóstico[22]. A existência de úlcera que não cicatriza é um indicador de

transformação maligna[27]. Sintomas como sensação de queimação e coceira podem estar presentes[22,28].

As características histopatológicas da QA incluem, no epitélio, o aumento da camada de queratina (hiperqueratose ou hiperparaqueratose), aumento ou atrofia da camada espinhosa e presença de displasia. No tecido conjuntivo subjacente observa-se a degeneração basofílica das fibras elásticas e colágenas (elastose solar) e infiltrado inflamatório mononuclear de intensidade variada[23,28,29]. As atipias que se instalam no epitélio são importantes achados histopatológicos que variam desde o grau leve ao severo. Não é incomum que lesões clinicamente diagnosticadas como QA sejam diagnosticadas como carcinoma *in situ* ou mesmo invasivo, no exame histopatológico[22,27].

O caráter difuso das lesões torna difícil predizer qual área exibiria características histopatológicas mais significativas para a realização de biópsia. A indicação de biópsia está geralmente associada a áreas que exibem alterações mais marcantes, como a presença de ulcerações[30]. No entanto, nem sempre as características clínicas são compatíveis com os achados histopatológicos. Este fato leva alguns autores a preconizar a realização de múltiplas biopsias em um mesmo paciente ou a vermelhectomia. Porém, esta conduta levanta questionamentos éticos[28].

O tratamento para a QA varia desde a vermelhectomia[2] para as lesões com atipia severa até o tratamento com laser de CO2[31], 5-fluoracil e crioterapia[32].

2.3 Fotocarcinogênese *versus* genes e proteínas XP

Os aspectos moleculares do desenvolvimento das QAs e dos CELs não foram amplamente estudados na literatura e nenhum modelo específico de carcinogênese foi proposto. Sendo assim, descreveremos a seguir o modelo de fotocarcinogênese descrito para as lesões de pele por acreditarmos que seja este o que mais se aproxima do CEL.

A radiação UV é dividida, conforme o comprimento de onda, em UVA (320-400nm), UVB (290-320nm) e UVC (200-290nm). A radiação UVC é completamente absorvida pela camada de ozônio na atmosfera terrestre e, portanto, não tem relevância na fotocarcinogênese. Porém, a camada de ozônio não absorve a radiação UVA e somente parte dos raios UVB são absorvidos. Sendo assim, as radiações UVA e UVB podem causar efeitos deletérios na vida terrestre, causando inflamação, eritema, queimaduras, imunossupressão pós-inflamatória e danos ao DNA, que eventualmente podem levar ao câncer[33,34,35].

O tipo de lesão causada pela radiação UV depende do seu comprimento de onda. Enquanto a UVB é capaz de atuar diretamente no DNA, os efeitos deletérios da UVA acontecem através da geração de espécies reativas de oxigênio[36]. Essas moléculas produzem ligações cruzadas de DNA - proteína, quebras de fita única e alterações de bases no DNA[34].

As principais lesões no DNA causadas pela UVB são a formação de dímeros de pirimidina-ciclobutanos (CPD) e fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PP)[37,38,39]. Estas duas lesões são formadas exclusivamente em resíduos de pirimidina, que constituem regiões altamente susceptíveis para mutações e lesões

no DNA e podem dar lugar a mutações específicas que compreendem a transição C→T e CC→ TT nas seqüências dipirimidínicas[35,40]. Este tipo de mutação é conhecido como a marca registrada da mutagênese induzida por UV[33,41,42].

O sistema de reparo de DNA é o mais importante fator de proteção às células contra a carcinogênese causada por fatores ambientais[43]. Os principais sistemas de reparo de DNA incluem a reversão direta do dano ao DNA, reparo por quebra de fita dupla via recombinação homóloga e não homóloga e a excisão do dano ao DNA. Nesse último, três principais mecanismos podem ser distinguidos: o reparo do mau pareamento, reparo por excisão de base e reparo por excisão de nucleotídeo (NER)[44]. Os dois últimos são os mais relevantes na eliminação de danos induzidos por UV, sendo o reparo por excisão de base capaz de eliminar danos induzidos por UVA e a via do reparo por excisão de nucleotídeo a principal envolvida no reparo de aductos induzidos por carcinógenos ambientais, incluindo dímeros de pirimidina ciclobutanos (CPD) e (6-4) fotoprodutos (6-4PP) [44].

Mutações em genes que controlam estas vias são capazes de conduzir à carcinogênese. Indivíduos que carregam mutações na linhagem germinativa de genes envolvidos no reparo por excisão de nucleotídeo, por exemplo, são portadores de uma síndrome chamada xerodermia pigmentosa (XP) que dentre outras manifestações leva a uma predisposição ao câncer de pele [41].

O reparo por excisão de nucleotídeo é um sistema de múltiplas etapas nas quais pelo menos 20-30 proteínas estão envolvidas [44,45]. Essas etapas consistem primeiramente no reconhecimento da lesão, demarcação, e incisão da fita de DNA em ambos os lados da lesão. Em seguida, o oligonucleotídeo contendo a lesão é removido e a lacuna deixada é preenchida por um oligonucleotídeo recém-sintetizado utilizando a fita complementar como molde [44,46].

Há sete genes considerados críticos neste processo, conhecidos como genes XP (XPA a XPG) [44,46,47]. As proteínas codificadas por eles atuam em todas as etapas do processo. As proteínas XPC e XPA atuam em fases precoces de reconhecimento, verificação da lesão e recrutamento do outras proteínas [44,45]. XPE/DDB2 também atua nesta primeira fase e parece reconhecer mais especificamente os fotoprodutos [48]. As proteínas XPB e XPD possuem atividade helicase 3'-5' e 5'-3' respectivamente, e participam de um complexo conhecido como TFIIH que é responsável pela abertura da dupla hélice na região da lesão. XPG e XPF são duas helicases responsáveis pelos cortes na fita de DNA abaixo e acima da lesão, gerando um oligonucleotídeo de 27-29 nucleotídeos de tamanho [44,46,47].

Duas subvias distintas foram descritas para o reparo por excisão de nucleotídeo: o reparo genômico global — que pode eliminar danos ao DNA de qualquer localização dentro do genoma — e o reparo associado à transcrição, que é mais rápido e remove lesões localizadas em genes transcricionalmente ativos [44,49]. Ambas as vias diferem apenas nos passos iniciais de reconhecimento da lesão, sendo a proteína XPC a única a atuar exclusivamente no reparo genômico global [50].

Se por um lado defeitos graves no sistema de reparo por excisão de nucleotídeo levam ao desenvolvimento de algumas síndromes humanas tais como a já citada xerodermia pigmentosa e também a tricodistrofia e a síndrome de Cokayne[43], por outro lado, é extremamente plausível que pequenas variações na seqüência de bases constituintes desses genes, conhecidas como polimorfismos, estejam presentes na população em geral e que estas variações no sistema de reparo gerem maior susceptibilidade ao desenvolvimento de cânceres. De fato, um grande número de variações nas seqüências de genes XP foi encontrado na população em geral [51].

O significado desses polimorfismos ainda não foi totalmente elucidado, mas algumas destas variantes podem afetar a capacidade de reparar erros no DNA e estudos genéticos indicam uma forte associação entre vários polimorfismos em genes XP e o desenvolvimento de neoplasias [51,52, 53].

Dentre os polimorfismos dos genes XP destacam-se dois no gene XPD, por serem os mais freqüentemente encontrados na população e já terem sido relacionados com a fotocarcinogênese. Estes polimorfismos estão localizados nos códons 312 (exon 10) e 751 (exon 23) e são chamados polimorfismos de nucleotídeo único ou SNPs (do inglês, *single nucleotide polymorphisms*).

Há vários trabalhos na literatura relacionando a presença destes SNPs em XPD, tanto com a capacidade de reparo de DNA quanto para o risco de desenvolvimento de câncer de pele melanoma e não-melanoma[54,55,56,57,58,59,60,61,62], no entanto, os resultados por eles obtidos são controversos[34].

Nos resultados encontrados por Vogel et al. (2001)[58] em indivíduos com carcinoma basocelular e com história familiar para câncer de pele não melanoma, o alelo A do éxon 10 (códon 312) foi associado a maior risco, para o desenvolvimento do câncer. Resultados condizentes foram obtidos no trabalho realizado por Hemminki e et al. (2001)[59] no qual indivíduos com 50 anos ou mais que apresentavam os genótipos AA no éxon 10 e CC no éxon 23 apresentavam capacidade de reparo diminuída. Por outro lado, Dybdhal (1999)[57] sugeriu que o genótipo AA no éxon 23 estivesse associado a maior risco para carcinoma basocelular.

Em relação aos melanomas e carcinomas epidermóides de pele, a presença do aminoácido Asn no códon 312 e do Gln no códon 751 foram inversamente associadas a maior risco para estas duas lesões[60]. Millikan et al. (2006)[54] afirmaram

existir risco aumentado para melanoma em indivíduos que apresentam o alelo A no códon 312 associado ao C no códon 751. Em outro estudo, indivíduos com câncer de pele não-melanoma e que têm o alelo variante C tiveram maior propensão a desenvolverem um segundo tumor primário [61].

Além dos estudos sobre polimorfismos, existem ainda vários trabalhos abordando a expressão dos genes XP relacionada à carcinogênese de órgãos internos. Destacam-se as neoplasias de fígado[63,64], bexiga[65] e carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, incluindo o de cavidade oral[66,67], nas quais já foi observada uma reduzida expressão de XPC. Em carcinomas de não pequenas células do pulmão a baixa expressão de XPC foi relacionada a um pobre prognóstico[68]. Em contrapartida, a resistência aos quimioterápicos nestas neoplasias vem sendo atribuída pelo menos em parte, à super expressão de XPF[69].

Apesar de haverem muitos trabalhos a respeito da expressão dos genes XP em neoplasias, estudos sobre a expressão das proteínas XP são raros na literatura[70,71]. Em um dos poucos trabalhos encontrados a expressão de proteínas XP foi estudada em linfócitos cultivados a partir do sangue de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. O estudo demonstrou que nestes casos as proteínas XPC e XPF apresentaram uma expressão 25% menor que no grupo controle e a baixa expressão da proteína XPF foi considerada um fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide[70].

De modo geral, a relação entre níveis de expressão de proteínas e de RNAm nem sempre é diretamente proporcional. Um exemplo que ilustra esta situação foi demonstrado no trabalho de McGurck et al. (2006)[72], no qual os autores demonstraram que os baixos níveis de proteína XPF usualmente presentes em neoplasias de testículo não são condizentes com os níveis de RNAm quantificados

em linhagens celulares destas neoplasias. Neste caso, portanto, mecanismos de regulação transcricionais devem estar envolvidos no controle da expressão desta proteína.

É possível que situação semelhante ocorra com outras proteínas XP em diversas outras lesões. Deste modo, a literatura é carente de mais estudos que considerem a expressão de proteínas XP nas diferentes neoplasias.

3 PROPOSIÇÃO

- Realizar um levantamento epidemiológico e pesquisar hábitos de exposição solar de pacientes com queilite actínica e carcinoma epidermóide
- Verificar se os polimorfismos genéticos XPD (Asp312Asn) e XPD (Lys751Gln) estão relacionados com risco para o desenvolvimento de queilite actínica.
- Verificar a expressão imunoistoquímica das proteínas XPC, XPF e dos dímeros de pirimidina em carcinomas epidermóides de lábio e queilites actínicas de diferentes graus de displasia epitelial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da USP sob parecer número 134/07 (Anexo A).

4.1 Pacientes e amostras

Foram entrevistados 84 pacientes diagnosticados com queilite actínica (QA) e 6 com carcinoma epidermóide de lábio (CEL) de quatro diferentes centros: Disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da USP, Disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade Ibirapuera, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP – Divisão de Dermatologia e Centro de Especialidades Odontológica (CEO) Flávio Gianotti. Como grupo controle, foram estudados 63 indivíduos que não apresentam QA ou CEL nem qualquer outro tipo de neoplasia de boca.

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B), os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa, responderam a um questionário (Anexo C) no qual foram coletados dados sobre idade, sexo, cor da pele, profissão, hábitos de fumar e de ingestão de bebidas alcoólicas e freqüência de exposição ao sol. Também foi realizada a coleta de amostras de raspados de mucosa jugal dos dois grupos para extração de DNA.

Para a análise dos SNPs, foram selecionados 60 pacientes para constituir o grupo QA e 41 para o grupo controle. Os grupos foram considerados pareados de acordo com a idade, sexo e cor da pele.

Para a análise imunoistoquímica foi utilizado material do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Universidade de São Paulo, que se encontrava fixado em formol e emblocado em parafina. Foram utilizados 38 casos de QA distribuídos nos diferentes graus de displasia epitelial (14 discreta, 13 moderada e 11 intensa) e 9 casos de CEL. O grupo controle consistiu em 7 casos selecionados dos arquivos que continham epitélio de vermelhão do lábio sem alterações, identificado como LN.

4.2 Microscopia de luz

Para análise morfológica dos casos selecionados, cortes de 5 µm estendidos sobre lâminas de vidro e corados pelo método da hematoxilina e eosina foram observados e graduados sob microscópio de luz, por 2 observadores calibrados e independentes. A graduação das lesões foi elaborada com base nos critérios propostos pela Organização Mundial da Saúde.

4.3 Extração do DNA

Para a extração de DNA as amostras foram obtidas por raspagem da mucosa oral dos pacientes. Após a coleta das células com colher coletora própria, estas foram colocadas em tubos para centrífuga (*eppendorfs)* no qual foi acrescentado tampão PBS 0,1M (pH 7,4). As amostras passaram por digestão enzimática com proteinase K (600 mAU/ml, Qiagen Inc., Hilden, Alemanha) em banho-maria a 56ºC e, a seguir, extração do DNA utilizando-se o QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), seguindo-se as especificações do fabricante.

4.4 Análise dos SNPs

A técnica utilizada para a verificação dos polimorfismos foi a RFLP- PCR. Os iniciadores e as enzimas de restrição foram selecionados com base na literatura e confirmados com a utilização do software Gene Tool versão 1.0 (BioTools Inc.) e consultas a duas ferramentas disponíveis *on-line*: Blast[73] e mapas de sítios para enzimas de restrição[74]. Na tabela 4.1 estão relacionados os iniciadores da PCR e as enzimas, bem como o tamanho do produto gerado pela PCR e após a digestão com as enzimas.

Tabela 4.1- Seqüência de bases dos iniciadores e enzimas de restrição para cada SNP

SNP	***Iniciadores***	***Produtos inteiros e digeridos***	***Enzima de restrição***
XPD(Asp312Asn)	CTGGCCCCTGTCTGACTTGT TCAGGAAGCCCAGGAAATG	326 186,74,63 252,74	*Hpy99I*
XPD(Lys751Gln)	GTTGGGGAAGTGCAGCAGCT TCTGGGTACCTGGTGGATAGC	337 201,73,63 264,73	*PstI*

4.4.1 reação de PCR

A PCR foi realizada em volume total de 25 µl contendo aproximadamente 100 ng de DNA genômico, 200 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada um dos iniciadores, 2,5 µl de tampão para PCR 10X (o tampão é composto de Tris -HCl 670 mM, pH 8,5; sulfato de amônio 166 mM; cloreto de magnésio 67 mM; albumina bovina sérica 1,7 mg/ml; β-mercaptoetanol 100 mM; e Triton X-100 a 1%) e 1,0 U *Taq* polimerase. A reação iniciou-se com a desnaturação do DNA pelo aquecimento a 94 ºC por 5 minuntos e depois foram realizados 35 ciclos de 94 ºC por 30 segundos, 56 ºC por 30 segundos e 72 ºC por 30 segundos, com extensão final a 72 ºC por 5 minutos.

4.4.2 purificação e digestão dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com a utilização do kit Invisorb (Invitek, Berlin, Alemanha), conforme instruções do fabricante.

A seguir os produtos foram digeridos com as enzimas de restrição já descritas, também de acordo com as instruções do fabricante. A incubação foi feita a 37 ℃ por 1 hora para a enzima *Hpy99I* e por 30 minutos com a *PstI*.

4.4.3 eletroforese

Após a digestão com as enzimas de restrição, um volume de 10 µl do produto de PCR sofreu eletroforese em gel de poliacrilamida de 20 cm X 16 cm X 1,5 mm a 10% usando-se como tampão de corrida TBE (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM, pH8,0). Após a eletroforese, os géis foram cuidadosamente removidos das placas de vidro e colocados em solução fixadora de álcool/ácido acético. Foram então embebidos em solução de nitrato de prata 1% por 20 minutos para evidenciação das bandas que foram então reveladas com solução de hidróxido de sódio e formaldeído. Todas essas etapas foram realizadas com o auxílio de uma plataforma misturadora para agitação constante. Depois de fixada a coloração em carbonato de sódio 1M, os géis foram colocados em embalagem plástica selada permitindo a manipulação segura e o armazenamento sem perda das características.

4.5 Técnica de imunoistoquímica

O estudo da expressão das proteínas XPC e XPF, bem como da expressão dos dímeros de pirimidina, foram realizados através da técnica de imunoistoquímica descrita a seguir.

Utilizou-se a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase e os cortes foram submetidos aos anticorpos anti-XPC e –XPF (Abcam- USA) e –CPD (MBL Japan)

Foram preparados, a partir do material emblocado em parafina, cortes de 3 µm, estendidos em lâminas de vidro silanizadas. Os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol e reidratados em cadeia descendente de etanóis, a partir de 3 passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95% e 85%. Após a reidratação, foi feita a remoção do pigmento formólico através de incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica, por 10 minutos.

Após lavagem em água destilada, as lâminas a serem incubadas com XPC e XPF receberam o tratamento de recuperação antigênica com solução de EDTA 1 mM acrescida de 0,05% de Tween 20, pH8,0 por 30 minutos em banho-maria a 95°C. Ao final do tratamento de recuperação antigênica, os cortes foram imediatamente lavados em água destilada e seguiram para a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual, realizada pela incubação em dois banhos de 15 minutos cada em solução 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol. Repetida a lavagem em água destilada, os cortes foram imersos em solução salina de TRIS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM), pH 7,6, fazendo-se três banhos de 5 minutos cada. Todas as etapas na seqüência foram precedidas por lavagens em solução tampão de TRIS pH 7,6.

Para as lâminas a serem incubadas com anti-CPD o bloqueio da peroxidase antecedeu o tratamento de recuperação antigênica que foi realizado com solução de tripsina a 0,05% por 5 minutos em temperatura ambiente. A seguir as lâminas foram ainda tratadas com uma solução desnaturante de hidróxido de sódio 70 mM em etanol 70% por 2 minutos a temperatura ambiente, seguidas de lavagens com Tris 100mM, etanol 70% e tampão PBS 0,1M (pH 7,2) acrescido de Tween20.

Os anticorpos primários foram diluídos em solução tampão de TRIS, pH 7,6, acrescida de albumina bovina a 1%, nas seguintes proporções: XPC 1:200, XPF 1:80 e CPD 1:2000. A incubação foi realizada por 18 horas a 4 ^{o}C.

Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi usado o kit LSAB plus (DAKO, Carpinteria, CA, Estados Unidos). As reações foram reveladas pela diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+, K3468) através de incubação por 10 minutos e, após lavagem em TRIS e água destilada, para remoção de excessos, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer.

A partir da incubação com o anticorpo secundário até a contracoloração os passos foram realizados automaticamente com o auxílio do Autostainer DAKO (DAKO).

Desidratação em série crescente de etanóis seguida de diafanização em xilol e montagem das lamínulas com resina Permount, concluíram o preparo dos cortes que seguiram para análise em microscopia de luz.

4.6 Análise dos dados

Para a análise dos SNPs, inicialmente o equilíbrio dos genótipos na população pesquisada foi avaliado com base na metodologia desenvolvida por Hardy – Weinberg.

A avaliação do pareamento dos casos e controles foi feito com base na estatística Qui-quadrado de Pearson. As médias das idades por grupo foram comparadas com base na técnica de Análise de Variância – ANOVA- usando a estatística F-Fischer,

Para avaliação da associação dos marcadores com a QA, foram ajustados Modelos de Regressão Logística Multinomiais considerando o grupo (caso=1/controle=0) como variável resposta; como variáveis explicativas (independentes) foram avaliadas as características: sexo, cor dos olhos, cor da pele, cor do cabelo e idade. Os dois SNPs foram consideradas como variáveis explicativas no modelo.

Partindo do modelo saturado (com todas as variáveis presentes), foi-se retirando uma a uma e ajustando novamente o modelo para assim obter-se um modelo final com apenas variáveis com contribuição significativa para explicar a variável resposta status da QA.

Para avaliação dos fatores de exposição e demais variáveis, um novo modelo, partindo do ajustado na fase anterior foi construído, nele foram incorporadas todas essas variáveis de exposição além de fumo e bebida.

O processo de ajuste foi o mesmo, a partir do modelo saturado foram retiradas variáveis com explicação não significativa, uma a uma, até que ao final

somente as variáveis com contribuição significativa estivessem presentes no modelo.

Na imunoistoquímica a análise foi semi-quantitativa e foram notadas a presença e a distribuição das proteínas ao longo do epitélio da lesão. Conforme a quantidade de células positivas para os marcadores os cortes receberam os escores “1” (até 10% das células positivas), “2” (entre 10 e 50%) ou “3” (mais de 50% das células positivas). Os achados foram relacionados aos diferentes graus de displasia epitelial encontrados histopatologicamente.

A avaliação dos dados de imunoistoquímica foi feita com base na análise de tabelas de contingência. A estatística Qui-quadrado foi empregada nas análises de associação entre duas variáveis.

Foi utilizado um escore de positividade para avaliação da estrutura de dependência entre os anticorpos nos grupos. Um Modelo Linear Geral com Medidas Repetidas (3 anticorpos na mesma pessoa) foi empregado para comparação das médias e avaliação da interação entre os anticorpos e os grupos LN, QA e CEL. Para avaliar essa estrutura de dependência entre os anticorpos nos grupos utilizamos os Coeficientes de Correlação de Sperman.

O nível de significância usado no estudo foi de 5% sendo que para todos os testes foi obtido o nível descritivo do mesmo (p).

5 RESULTADOS

5.1 Dados epidemiológicos

A população estudada em cada um dos três grupos foi caracterizada através de entrevista realizada com a utilização do questionário descrito no anexo B.

A distribuição de idade, sexo e outras características fenotípicas relevantes estão apresentadas na tabela 5.1.

Tabela 5.1- Características fenotípicas

	Grupo QA n=84 (%)	*Grupo controle n=63 (%)*	*Grupo Carcinoma n=6 (%)*
Sexo			
Masculino	55 (65%)	43 (68%)	4 (67%)
Feminino	29 (35%)	20 (32%)	2 (33%)
Distribuição de idade			
31-40	1 (1%)	0	0
41-50	10 (12%)	6 (9%)	0
51-60	17 (20%)	18(29%)	2(33%)
61-70	26 (31%)	23(37%)	3(50%)
71-80	26 (31%)	13(21%)	1(17%)
>80	4(5%)	3(4%)	0
Cor da pele			
Branca	76(91%)	54(86%)	6(100%)
Morena	6(7%)	7(11%)	0
Vitiligo	1(1%)	2(3%)	0
Albino	1(1%)	0	0
Cor dos olhos			
Azuis/verdes	37(44%)	17(27%)	3(50%)
Castanhos claros	25(30%)	26(41%)	2(33%)
Castanhos escuros	22(26%)	20(32%)	1(17%)
Cor dos cabelos			
Castanhos	66(79%)	57(91%)	6(100%)
Loiros	13(15%)	4(6%)	0
Negros	3(4%)	2(3%)	0
Ruivos	2(2%)	0	0

A média de idade foi de 64 anos nos grupos controle e QA e 65 anos no grupo carcinoma. A distribuição em faixa etária segundo o sexo pode ser observada nos gráfico 5.1, 5.2 e 5.3.

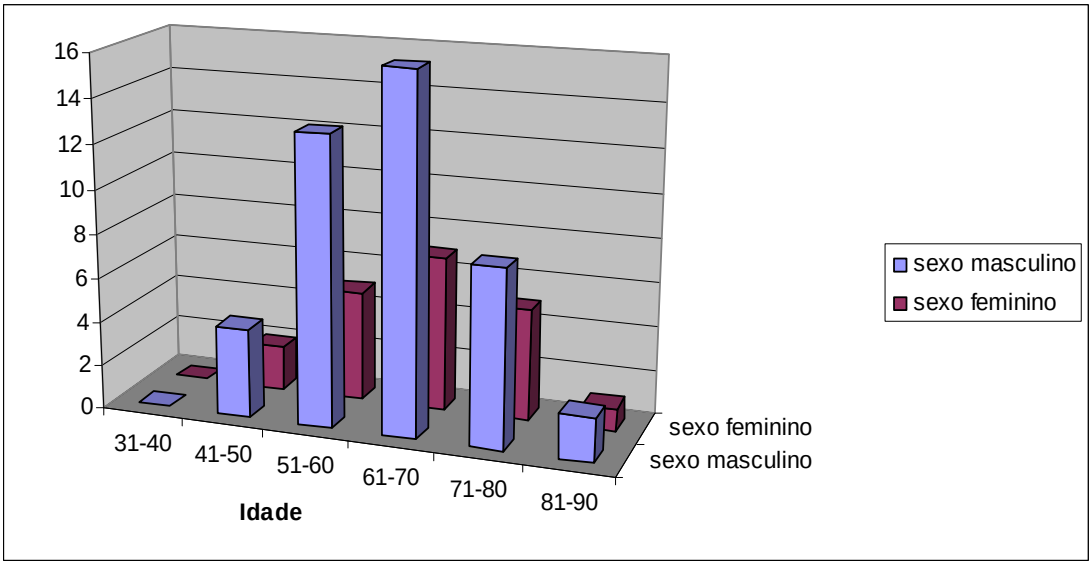


Gráfico 5.1- Distribuição da idade segundo o sexo no grupo controle

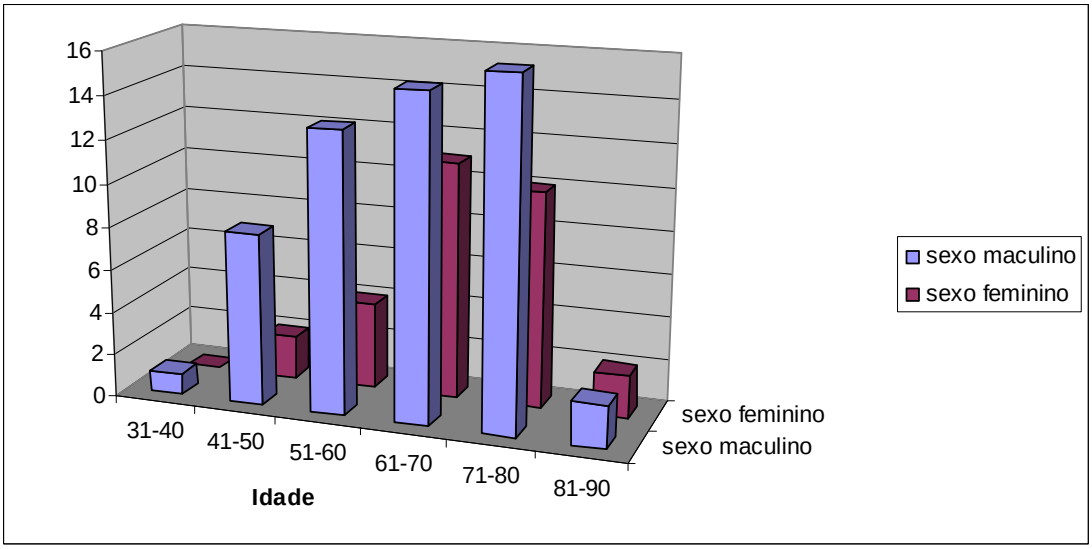


Gráfico 5.2- Distribuição da idade segundo o sexo no grupo QA

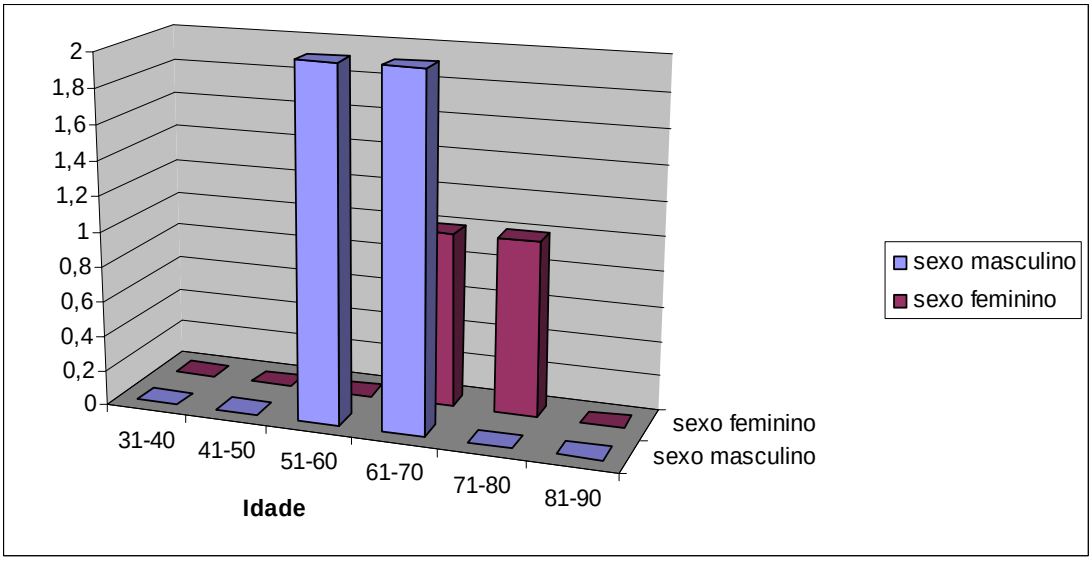


Gráfico 5.3- Distribuição da idade segundo o sexo no grupo carcinoma

Em relação ao nível de escolaridade a maioria dos pacientes do grupo QA, (45/84) havia cursado incompletamente o ensino fundamental, 15 o fundamental completo, 12 o ensino médio completo e 2 o médio incompleto. Somente 4 tinham ensino superior. No grupo carcinoma havia 2 analfabetos, 2 possuíam ensino fundamental incompleto, 1 o fundamental completo e 1 o ensino médio. No grupo controle, 22 dos entrevistados tinham ensino fundamental incompleto, 6 o fundamental completo, 13 o médio completo, 4 o médio incompleto,13 o superior completo e 5 pós-graduação.

Atualmente 80/84 pacientes do grupo QA residem em área urbana (95%), 2 no litoral e 2 em área rural. No entanto, a maioria destes pacientes, 52 (62%), já residiu em área rural no passado. No grupo carcinoma todos os pacientes residiam atualmente em área urbana e 4 deles (67%) já haviam morado em área rural no passado. No grupo controle todos, exceto uma pessoa que residia no litoral há 7

anos, residiam atualmente em área urbana, mas 21 pessoas (33%) já haviam morado em área rural.

Das profissões exercidas pelos entrevistados do grupo QA, atualmente ou no passado, 57% envolviam trabalho ao ar livre. As mais citadas foram: trabalhador rural (29%), pedreiro (5%), motorista/taxista (9%). No grupo carcinoma 4 pessoas (67%) exerciam atividades profissionais ao ar livre antes de se aposentarem: trabalhador rural (3) e feirante (1). No grupo controle 12 entrevistados (17%), exerceram ou ainda exercem atividades profissionais ao ar livre. As profissões citadas foram trabalho rural (5), motorista/taxista (3), pedreiro (1), veterinário em zona rural (1), limpador de vidros (1) e analista ambiental (1). Esta última uma atividade foi iniciada recentemente, após o entrevistado aposentar-se.

Em relação aos hábitos de exposição solar a maioria dos entrevistados nos três grupos havia ficado exposta ao sol por longos períodos na infância e/ou adolescência sem a utilização de medidas protetoras: 78 (93%) no grupo QA, 6 (100%) no grupo carcinoma e 46 (73%) no grupo controle. Porém a maioria não mais se expunha atualmente: 55 (65%) no grupo QA, 5 (83%) no grupo carcinoma e 42 (67%) no grupo controle.

Alterações causadas pelo sol também na pele apareceram com freqüência em todos os grupos. No grupo QA a maior parte relatou a presença de manchas (68%), seguidas de câncer de pele (8%), nenhum problema (20%) e outros problemas (4%). No grupo carcinoma, manchas na pele, câncer de pele e nenhum problema apareceram com 33% de freqüência cada um. No grupo controle, 31 entrevistados (49%) relataram manchas na pele, 27 (43%) nenhum problema, 4 (6%) câncer de pele, e 1 (2%) outros problemas

Grande parte dos pacientes dos grupos QA e carcinoma apresentaram o hábito de usar filtro solar (62% e 83%, respectivamente), porém, recentemente adquirido, há menos de 4 anos em média. No grupo controle 34 (54%) usam filtro solar.

Dados detalhados dos hábitos de exposição solar estão apresentados nos gráficos 5.4 a 5.8 e nas tabelas 5.2 a 5.5.

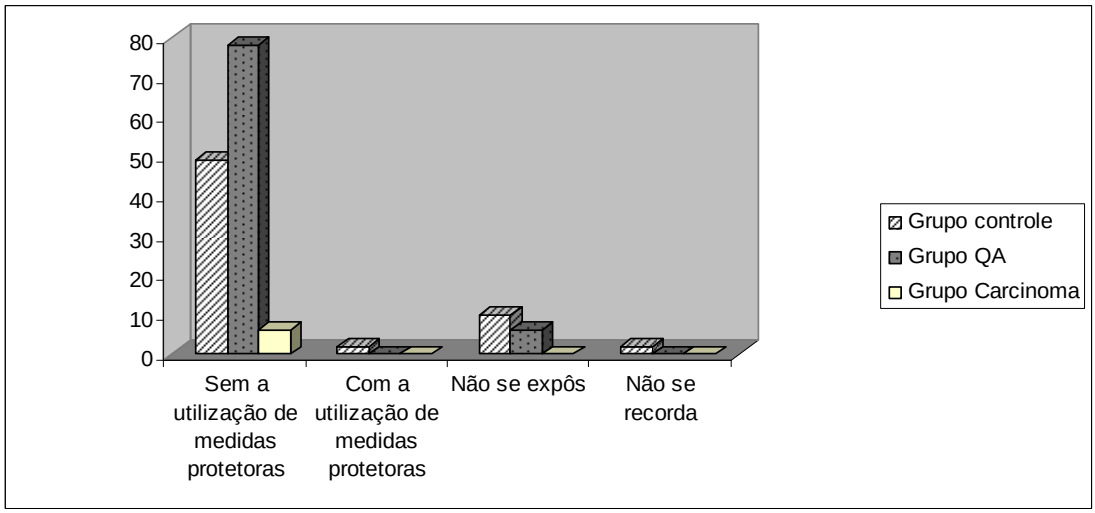


Gráfico 5.4- Exposição crônica ao sol na infância e/ou adolescência

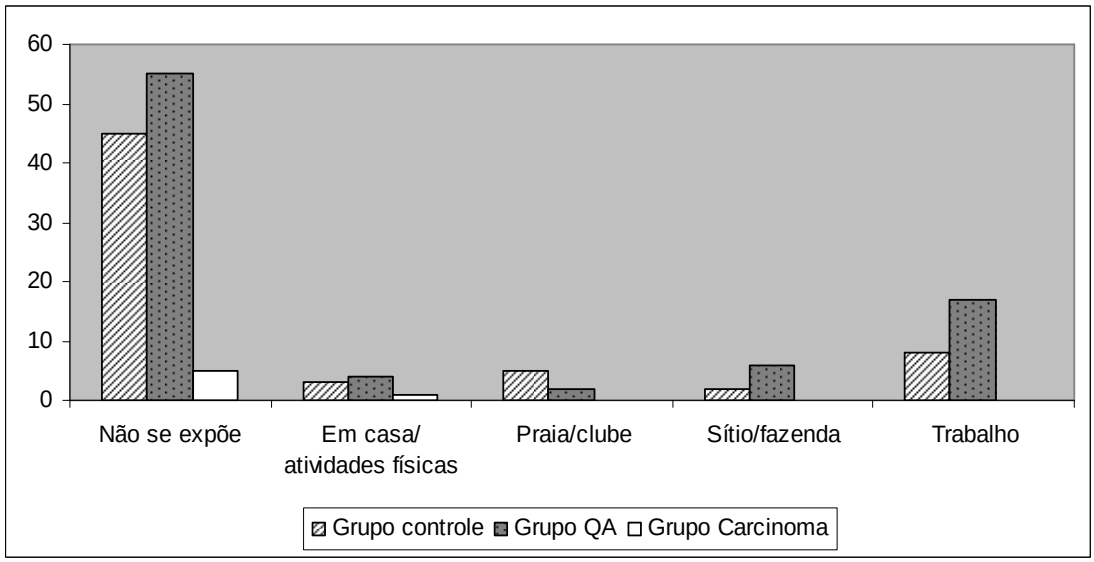


Gráfico 5.5- Locais atuais de exposição solar

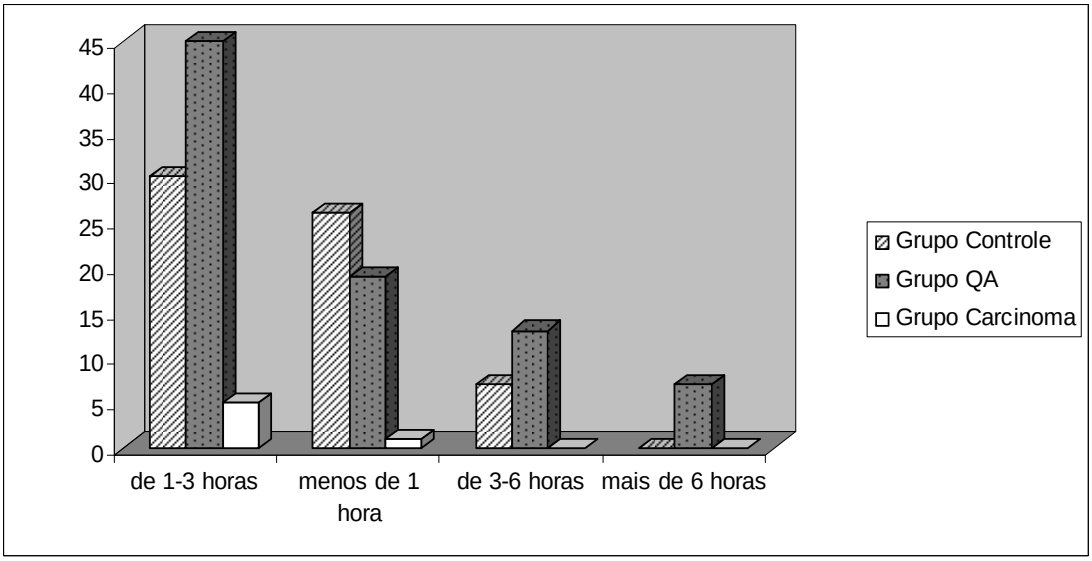


Gráfico 5.6- Horas/dia de exposição ao sol.

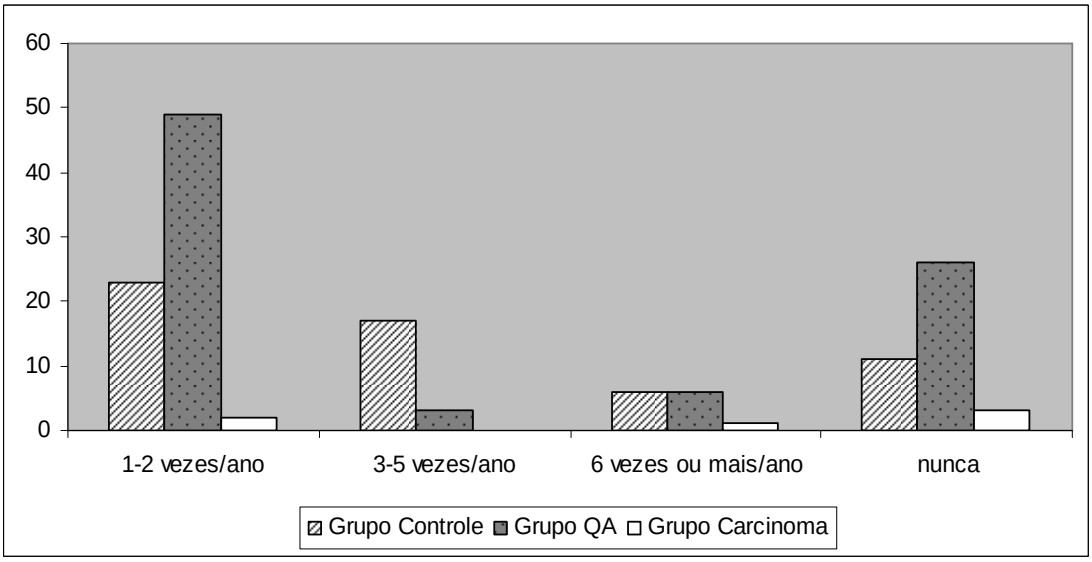


Gráfico 5.7- Freqüência de banhos de sol

Tabela 5.2- Reação da pele após exposição solar sem proteção

	Grupo Controle	*Grupo QA*	*Grupo Carcinoma*
Sempre se queima, nunca se bronzeia	10	15	0
Sempre se queima, eventualmente se bronzeia	15	49	5
Às vezes se queima, sempre se bronzeia	31	14	0
Nunca se queima, sempre se bronzeia	3	4	0
Não sabe	4	2	1

Tabela 5.3- Freqüência de uso do filtro solar no grupo QA

	Labial	*Loção*	*Labial e loção*	*Total*
Em qualquer época do ano	10	6	23	39
Somente no verão	0	3	4	7
Somente quando toma banho de sol	2	3	1	6
Nunca				32

Tabela 5.4- Freqüência de uso do filtro solar no grupo controle

	Labial	*Loção*	*Labial e loção*	*Total*
Em qualquer época do ano	0	9	1	10
Somente no verão	0	5	0	5
Somente quando toma banho de sol	0	17	2	19
Nunca				29

Tabela 5.5- Freqüência de uso do filtro solar no grupo carcinoma

	Labial	*Loção*	*Labial e loção*	*Total*
Em qualquer época do ano	2	1	2	5
Somente no verão	0	0	0	0
Somente quando toma banho de sol	0	0	0	0
Nunca				1

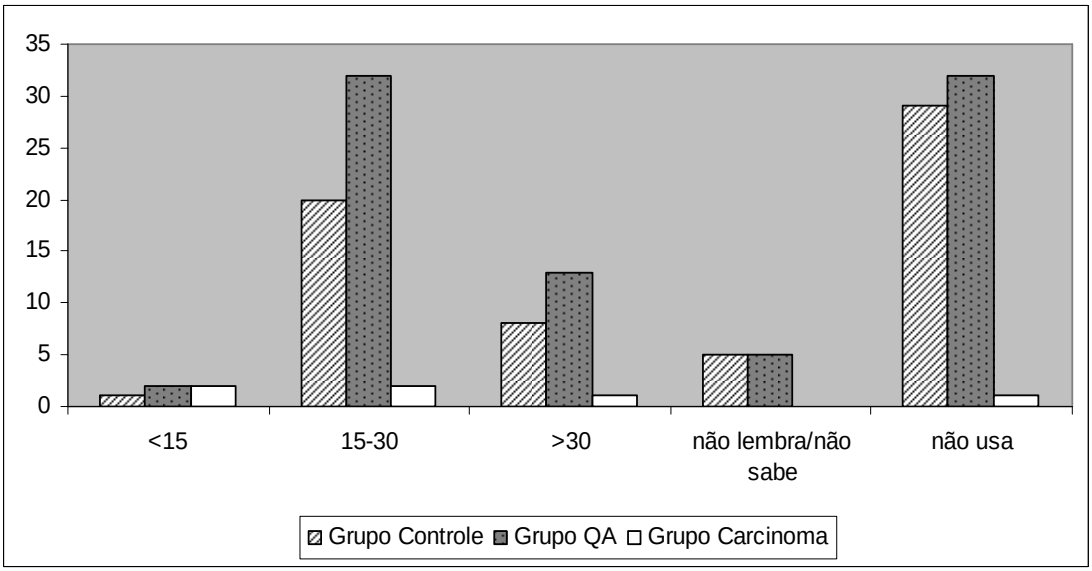


Gráfico 5.8 – Fator de proteção do filtro solar

Hábitos de etilismo e tabagismo estavam presentes em todos os grupos. Os detalhes podem ser observados nos gráficos 5.9 e 5.10.

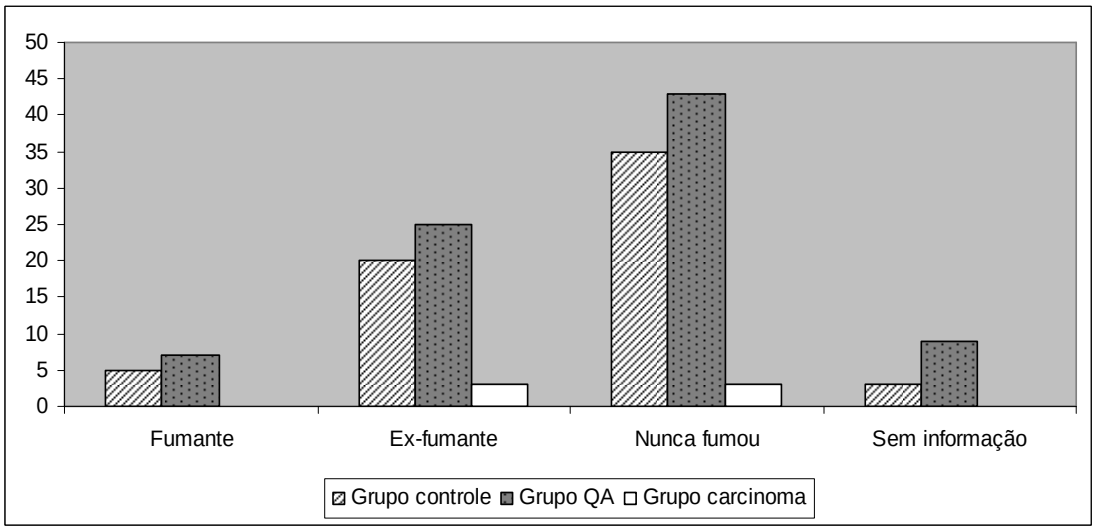


Gráfico 5.9– Hábito de tabagismo entre os entrevistados dos três grupos

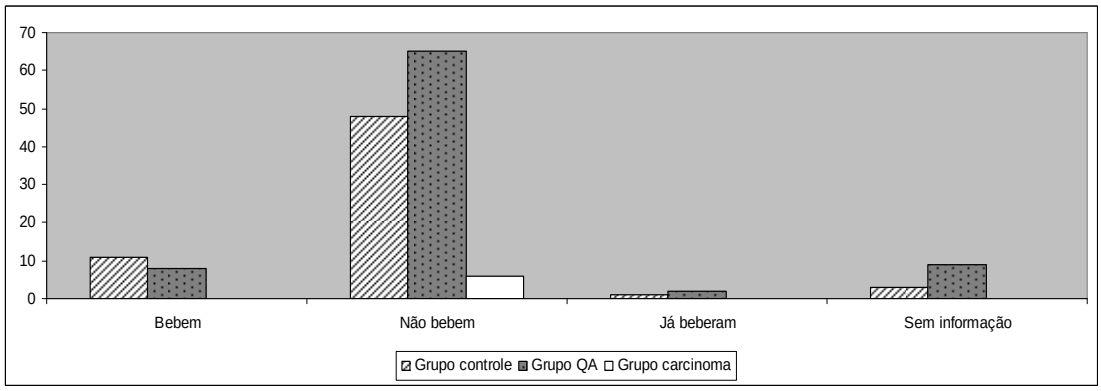


Gráfico 5.10 – Hábito de etilismo entre os entrevistados dos três grupos

5.2 SNPs

Para a análise dos polimorfismos o grupo QA foi constituído por 60 pacientes e o grupo controle por 41 indivíduos.

Os grupos controle e QA estavam pareados segundo a cor da pele (x^2=695, p=0,707), idade (F(1;99)=1,48, p=0,702) e sexo (x^2=0,150 com p=0,699).

A distribuição dos genótipos na população estudada estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O teste Qui-quadrado para esta avaliação resultou em x^2=0,001 com p=1,00 para XPD (Lys751Gln) e x^2=3,660 com p=0,16 para XPD (Asp312Asn) .

Na avaliação da associação dos SNPs com a QA, o genótipo AG para o XPD (Asp312Asn) mostrou associação significativa, com Odds Ratio=3,56 (1,40-9,10), constituindo, portanto um fator de risco para QA. A distribuição dos genótipos do XPD (Asp312Asn) nos grupos QA e controle pode ser observada na tabela 5.6. O SNP XPD (Lys751Gln) não mostrou associação positiva com a QA.

Tabela 5.6- Distribuição dos genótipos de XPD(Asp312Asn) nos grupos

Genótipos		*Controle*	*QA*	*Total*
AA	n	11	6	17
	%	64,7%	35,3%	100,0%
AG	n	15	44	59
	%	25,4%	74,6%	100,0%
GG	n	15	10	25
	%	60,0%	40,0%	100,0%
Total	n	41	60	101
	%	40,6%	59,4%	100,0%

Para avaliação dos fatores externos de exposição, bebida e fumo, outro modelo de regressão logística multinomial foi ajustado. Na tabela 5.7 apresentamos o resultado do ajuste final do modelo somente com as variáveis com contribuição significativa.

Tabela 5.7- Variáveis significativas no Modelo final para QA

Variável pesquisada	*Qui-quadrado (x^2)*	*gl*	*p*
XPD (Asp312Asn)	7,322	2	0,026
Cor dos olhos	31,005	2	<0,001
Reside ou já residiu em área rural?	8,007	1	0,005
Trabalha (ou) ao ar livre?	5,446	1	0,020
Toma banho de sol/ se bronzeia artificialmente?	15,903	4	0,003

Nas tabelas 5.8, 5.9 e 5.10 apresentamos as distribuições relativas às variáveis significativas agregadas ao modelo.

Tabela 5.8- Distribuição da variável indicativa de residência em área rural e QA

Reside ou já residiu em área rural?		*Grupo controle*	*Grupo QA*	*Total*
Não	n	29	23	52
	%	55,8%	44,2%	100,0%
Sim	n	12	37	49
	%	24,5%	75,5%	100,0%
Total	n	41	60	101
	%	40,6%	59,4%	100,0%

Tabela 5.9- Distribuição de indicativo de trabalho externo e QA

Trabalha (ou) ao ar livre?		*Grupo controle*	*Grupo QA*	*Total*
	n	35	23	58
Não	%	60,3%	39,7%	100,0%
	n	6	37	43
Sim	%	14,0%	86,0%	100,0%
	n	41	60	101
Total	%	40,6%	59,4%	100,0%

Tabela 5.10- Distribuição conjunta da freqüência de banhos de sol e QA

Toma banho de sol?		*Grupo controle*	*Grupo QA*	*Total*
Não	n	9	20	29
	%	31,0%	69,0%	100,0%
1 ou 2 vezes/ano	n	15	35	50
	%	30,0%	70,0%	100,0%
3 a 5 vezes/ano	n	11	2	13
	%	84,6%	15,4%	100,0%
6 vezes/ano	n	4	1	5
	%	80,0%	20,0%	100,0%
Mais de 6 vezes/ano	n	2	2	4
	%	50,0%	50,0%	100,0%
Total	n	41	60	101
	%	40,6%	59,4%	100,0%

O fato de ter residido em área rural e de ter executado trabalho em ambientes externos tiveram associação significativa com presença de QA, com valores $x^2=8,979$ com $p=0,003$ e $x^2=20,155$ com $p<0,001$, respectivamente.

A significância da associação entre freqüência de banhos de sol e QA não pode ser avaliada em virtude da necessidade de se entrevistar um maior número de indivíduos.

5.3 Análise morfológica

Na análise morfológica, os 38 casos de QA que foram submetidos às reações de imunoistoquímica, foram divididos da seguinte forma: 14 casos foram classificados como displasia epitelial discreta, 13 casos, displasia epitelial moderada e 11 casos, displasia epitelial intensa (figura 5.1).

5.4 Imunoistoquímica

O padrão de marcação imunoistoquímica obtido com os anticorpos XPC, XPF e CPD foi predominantemente nuclear para o grupo de lábio normal e para os casos de QA. Em relação às camadas do epitélio – basal, espinhosa e granulosa - não houve prevalência de marcação em nenhuma camada específica (figura 5.2A, C e E).

No entanto, nos casos de CEL a marcação para XPC e XPF não se limitou ao núcleo, sendo encontrada também no citoplasma das células malignas (figura 5.2B e D). No epitélio de superfície destas lesões houve marcação semelhante à

encontrada nos casos de queilite actínica. A presença de CPD nos carcinomas quando ocorreu foi predominantemente no epitélio de superfície (figura 5.2F).

A expressão dos anticorpos CPD, XPC e XPF discernida segundo o escore de positividade pode ser observada na tabela 5.11 para os casos de QA e CEL e tabela 5.12 para o grupo LN.

Prancha imagens HE

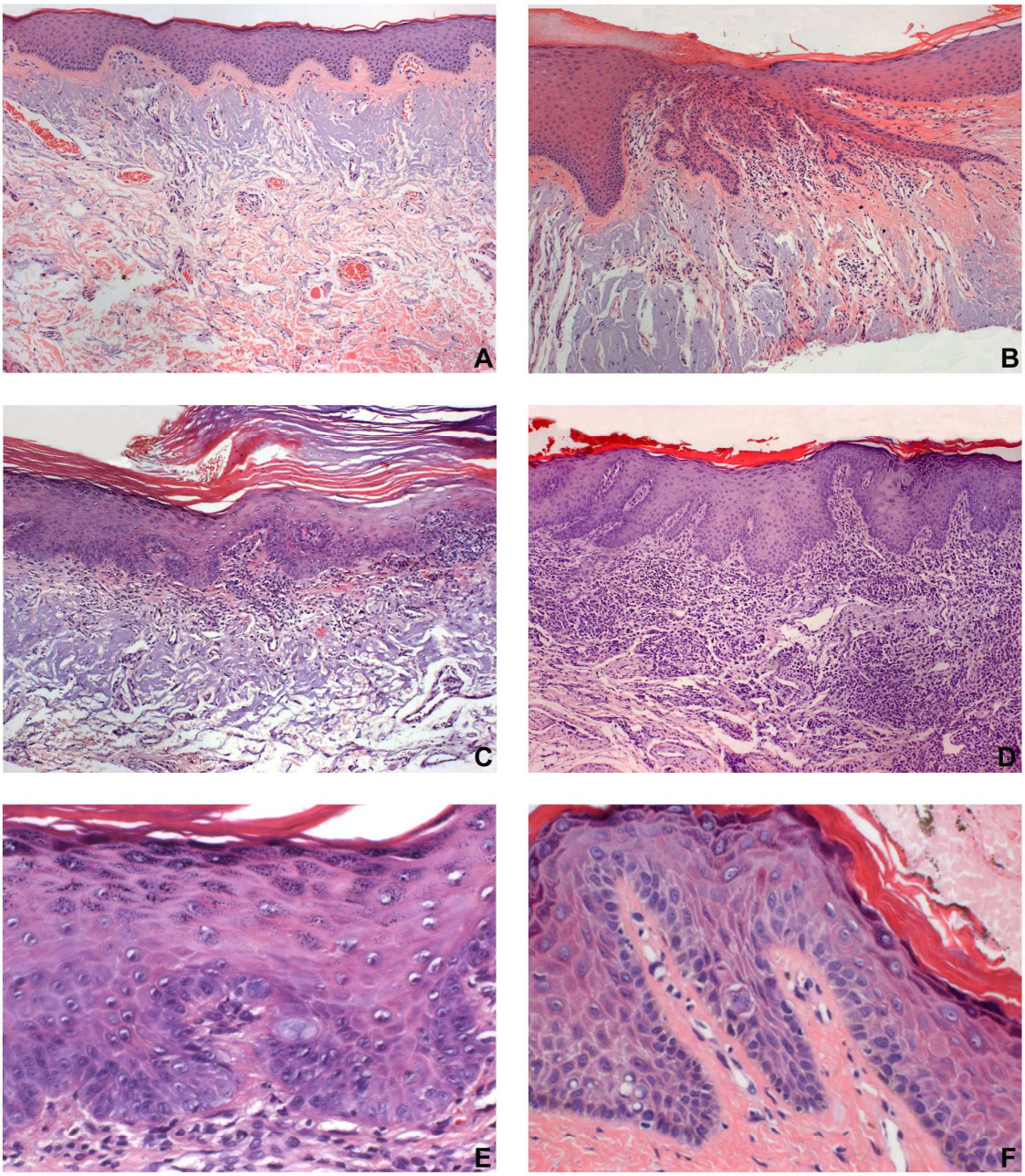


Figura 5.1- Aspectos histopatológicos das lesões de queilite actínica. A- queilite actínica com displasia epitelial discreta (100X no original); B a C- queilite actínica com displasia epitelial intensa (100X no original); E e F- atipias celulares e arquiteturais de lesões classificadas com displasia epitelial intensa (400 X no original)

PRANCHA IMUNO

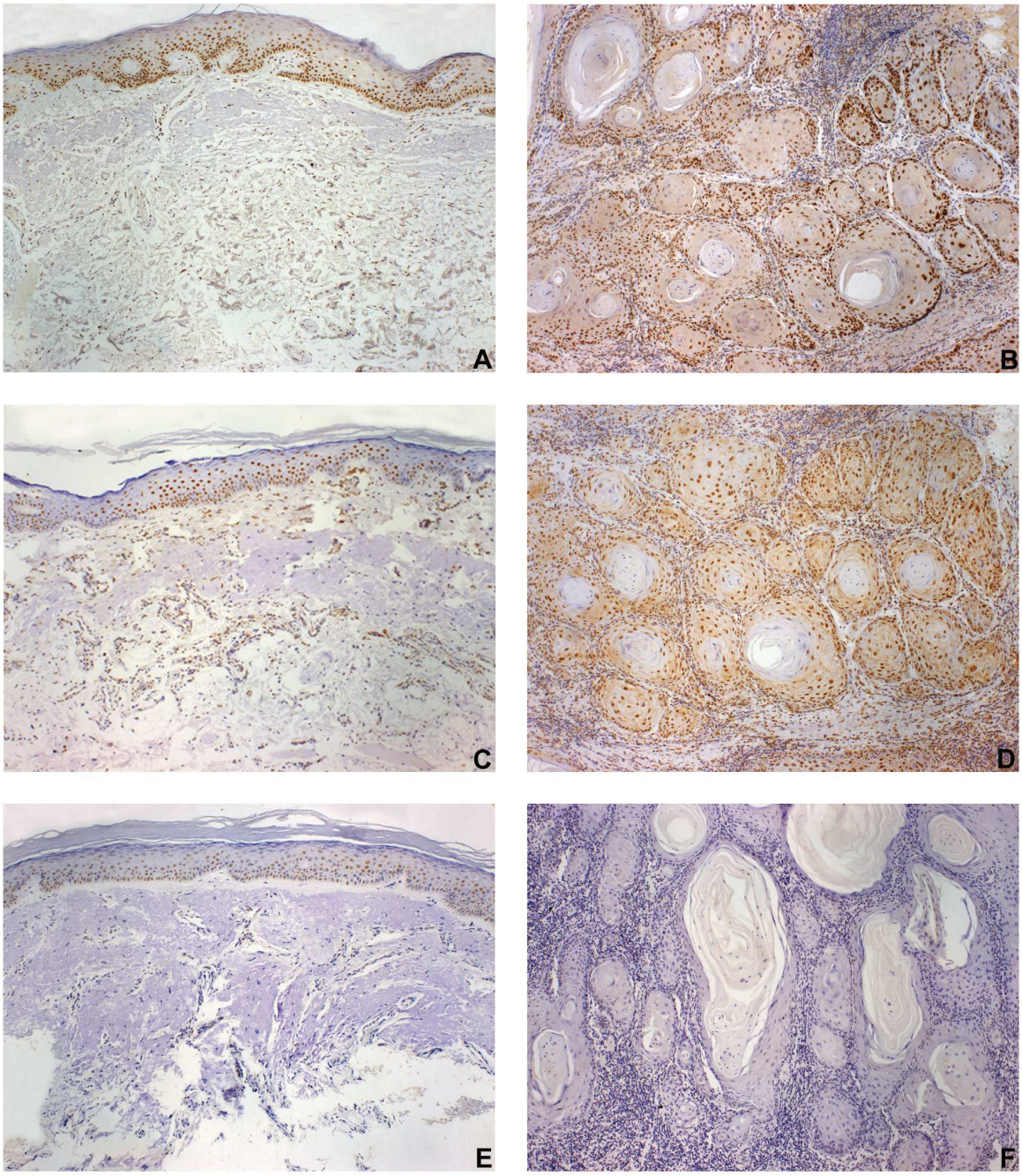


Figura 5.2 - Marcação imunoistoquímica para os anticorpos: anti-XPC em queilite actínica (A) e carcinoma epidermóide de lábio (B); anti-XPF em queilite actínica (C) e carcinoma epidermóide de lábio (D); anti-CPD em queilite actínica (E) e carcinoma epidermóide de lábio (F) (todas 100X no original)

Tabela 5.11- Padrão de imunomarcação com anticorpos anti-CPD, -XPC e –XPF em QAs e carcinomas

Caso	*Lesão/classificação*	*CPD*	*XPC*	*XPF*
1	Carcinoma	0	3	3
2	Carcinoma	3	3	3
3	Carcinoma	0	3	3
4	Carcinoma	2	3	3
5	Carcinoma	0	3	3
6	Carcinoma	0	3	3
7	Carcinoma	0	2	2
8	Carcinoma	3	3	3
9	Carcinoma	1	3	3
10	QA Intensa	3	3	3
11	QA Intensa	3	3	3
12	QA Intensa	2	0	0
13	QA Intensa	0	0	0
14	QA Intensa	0	0	0
15	QA Intensa	0	0	3
16	QA Intensa	0	0	0
17	QA Intensa	0	0	0
18	QA Intensa	1	3	3
19	QA Intensa	1	3	3
20	QA Intensa	3	3	3
21	QA Moderada	1	0	0
22	QA Moderada	0	3	3
23	QA Moderada	2	3	3
24	QA Moderada	1	2	0
25	QA Moderada	0	0	0
26	QA Moderada	0	0	0
27	QA Moderada	3	3	3
28	QA Moderada	3	3	3
29	QA Moderada	0	3	0
30	QA Moderada	3	3	3
31	QA Moderada	3	3	3
32	QA Moderada	2	3	3
33	QA Moderada	2	0	0
34	QA Discreta	0	0	0
35	QA Discreta	3	0	0
36	QA Discreta	2	0	0
37	QA Discreta	3	3	3
38	QA Discreta	1	0	0
39	QA Discreta	0	0	0
40	QA Discreta	2	3	0
41	QA Discreta	1	2	0
42	QA Discreta	2	2	0
43	QA Discreta	1	3	3
44	QA Discreta	3	3	3
45	QA Discreta	3	3	0
46	QA Discreta	1	0	0
47	QA Discreta	3	3	0

Legenda: 0: nenhuma marcação; 1: até 10% das células marcadas; 2: de 10-50% das células marcadas; 3: mais que 50% das células marcadas

Tabela 5.12- Padrão de imunomarcação com anticorpos anti-CPD, -XPC e –XPF no grupo LN

Casos	*Diagnóstico*	*CPD*	*XPC*	*XPF*
1	Mácula melanótica	1	1	2
2	Hemangioma	3	1	1
3	Verruga vulgar	0	2	3
4	Hemangioma	1	1	2
5	Variz	0	0	0
6	Neoplasia mesenquimal de origem vascular	0	0	0
7	Queilite granulomatosa	1	2	3

Legenda: 0: nenhuma marcação; 1: até 10% das células marcadas; 2: de 10-50% das células marcadas; 3: mais que 50% das células marcadas

No grupo LN 71,4% dos casos apresentaram-se positivos para XPC e XPF. No grupo de carcinomas todos os casos foram positivos para XPC e XPF. Dos 38 casos de QA, 22 foram positivos para XPC e, destes casos, 5 tinham displasia epitelial intensa, 9 displasia moderada e 8 displasia discreta. Para XPF 16 casos foram positivos, sendo 6 casos com displasia epitelial intensa, 7 moderada e 3 discreta. Os resultados em porcentagens podem ser vistos na tabela 5.13 e 5.14.

Tabela 5.13- Distribuição do anticorpo XPC pelos grupos

Grupos		*XPC negativo*	*XPC positivo*	*Total*
LN	n	2	5	7
	%	28,6%	71,4%	100,0%
CEL	n	0	9	9
	%	0%	100,0%	100,0%
QAD	n	6	8	14
	%	42,9%	57,1%	100,0%
QAM	n	4	9	13
	%	30,8%	69,2%	100,0%
QAI	n	6	5	11
	%	54,5%	45,5%	100,0%
Total	n	18	36	54
	%	33,3%	66,7%	100,0%

Legenda: LN: lábio normal, CEL: Carcinoma epidermóide de lábio, QAD: Queilite actínica com displasia epitelial discreta, QAM: Queilite actínica com displasia epitelial moderada, QAI: Queilite actínica com displasia epitelial intensa.

Tabela 5.14- Distribuição do anticorpo XPF pelos grupos

Grupos		*XPF negativo*	*XPF positivo*	*Total*
LN	n	2	5	7
	%	28,6%	71,4%	100,0%
CEL	n	0	9	9
	%	0	100,0%	100,0%
QAD	n	11	3	14
	%	78,6%	21,4%	100,0%
QAM	n	6	7	13
	%	46,2%	53,8%	100,0%
QAI	n	5	6	11
	%	45,5%	54,5%	100,0%
Total	n	24	30	54
	%	44,4%	55,6%	100,0%

Legenda: LN: lábio normal, CEL: Carcinoma epidermóide de lábio, QAD: Queilite actínica com displasia epitelial discreta, QAM: Queilite actínica com displasia epitelial moderada, QAI: Queilite actínica com displasia epitelial intensa.

Com o anticorpo CPD foram positivos 4 casos de lábio normal, sendo 3 com marcação em menos de 10% das células e apenas 1 com marcação em mais de 50% das células. No grupo carcinoma 4 casos foram positivos e no grupo QA 27 casos foram positivos, distribuídos da seguinte forma: 6 casos com displasia epitelial intensa, 9 moderada e 12 discreta. Na tabela 5.15 observam-se as porcentagens de marcação em cada grupo.

Tabela 5.15- Perfil de marcação com o anticorpo CPD

Grupos		*CPD negativo*	*CPD positivo*	*Total*
LN	n	3	4	7
	%	42,9%	57,1%	100,0%
CEL	n	5	4	9
	%	55,6%	44,4%	100,0%
QAD	n	2	12	14
	%	14,3%	85,7%	100,0%
QAM	n	4	9	13
	%	30,8%	69,2%	100,0%
QAI	n	5	6	11
	%	45,5%	54,5%	100,0%
Total	n	19	35	54
	%	35,2%	64,8%	100,0%

Legenda: LN: lábio normal, CEL: Carcinoma epidermóide de lábio, QAD: Queilite actínica com displasia epitelial discreta, QAM: Queilite actínica com displasia epitelial moderada, QAI: Queilite actínica com displasia epitelial intensa.

Os testes de associação revelaram que as diferenças de expressão são estatisticamente significante somente para o anticorpo XPF (x^2=14,538, p=0,003).

Quando a análise foi realizada considerando o grupo QA como um todo, ou seja, sem dividi-lo segundo a classificação das lesões, além do XPF, o anticorpo XPC também mostrou uma associação positiva (x^2= 5,887 com p=0,050).

Analisando-se em conjunto os resultados para os três anticorpos (tabelas 3.5 e 3.6) temos que para o grupo dos carcinomas houve expressão de XPC e XPF mesmo na ausência de CPD.

Por outro lado, para as QAs, a expressão de XPC e XPF pareceu ser dependente da presença de CPD, já que na ausência de CPD (11 casos) apenas 1 caso apresentou XPC e XPF, 1 caso apresentou só XPC e 1 caso apresentou só XPF. Os outros 8 casos (73%) também não apresentaram XPC ou XPF. Na presença de CPD (27 casos) a maioria (20 casos - 74%) mostrou marcação positiva também para XPC e XPF (14) ou só para XPC (6). Alguns casos (7 casos - 26%)

não mostraram expressão de XPC ou XPF, mesmo com presença de CPD (tabelas 5.16 e 5.17).

No grupo LN 100% dos casos positivos para CPD também o foram para XPC e XPF. Na ausência de CPD (3 casos) a expressão de XPC e XPF foi verificada em apenas um caso (tabelas 5.16 e 5.17).

Tabela 5.16- Casos positivos para CPD *X* relação com XPC e XPF

	XPC+/XPF+	*XPC+/XPF-*	*XPC-/XPF+*	*XPC-/XPF-*	*Total*
CEL	4	0	0	0	4
QAI	5	0	0	1	4
QAM	6	1	0	2	7
QAD	3	5	0	4	8
Total QA	14	6	0	7	27
LN	4	0	0	0	4

Legenda: CEL: Carcinoma epidermóide de lábio, QAI: Queilite actínica com displasia epitelial intensa, QAM: Queilite actínica com displasia epitelial moderada, QAD: Queilite actínica com displasia epitelial discreta, LN: lábio normal.

Tabela 5.17- Casos negativos para CPD *X* relação com XPC e XPF

	XPC+/XPF+	*XPC+/XPF-*	*XPC-/XPF+*	*XPC-/XPF-*	*Total*
CEL	5	0	0	0	5
QAI	0	0	1	4	5
QAM	1	1	0	2	4
QAD	0	0	0	2	2
Total QA	1	1	1	8	11
LN	1	0	0	2	3

Legenda: CEL: Carcinoma epidermóide de lábio, QAI: Queilite actínica com displasia epitelial intensa, QAM: Queilite actínica com displasia epitelial moderada, QAD: Queilite actínica com displasia epitelial discreta, LN: lábio normal.

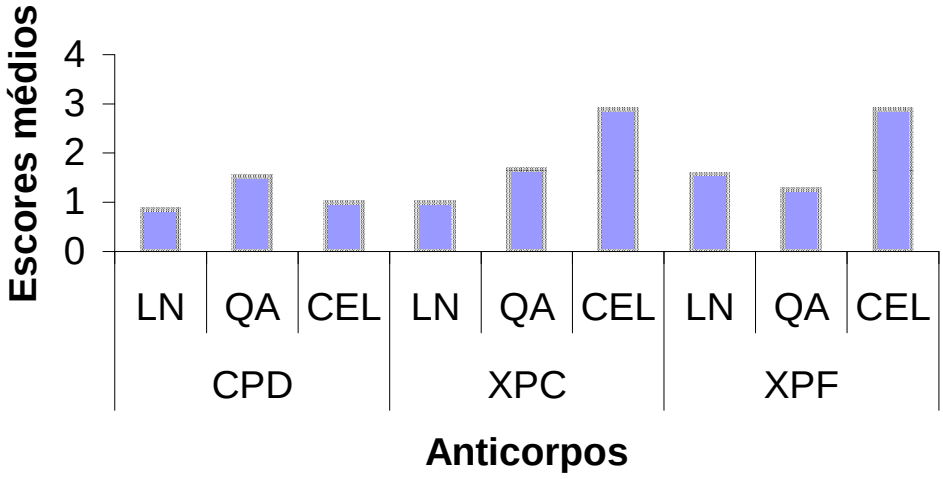
Considerando o escore de positividade do anticorpo para a avaliação conjunta dos anticorpos, foi ajustado um Modelo Linear Geral para Medidas Repetidas (3 anticorpos na mesma pessoa). As médias dos escores de positividade dos

anticorpos em função dos grupos, com coeficiente de confiança de 95%, são apresentados na tabela 5.18 e no gráfico 5.11.

Tabela 5.18 - Escores Médios dos Anticorpos em função dos Grupos.

Grupos	*Anticorpo*	*Média*	*Desvio*	*Intervalo de confiança 95%*
LN	CPD	0,857	0,462	-0,071-1,785
	XPC	1,000	0,483	0,029-1,971
	XPF	1,571	0,513	0,541-2,601
QA	CPD	1,526	0,198	1,128-1,925
	XPC	1,658	0,207	1,241-2,074
	XPF	1,263	0,220	0,821-1,705
CEL	CPD	1,000	0,408	0,181-1,819
	XPC	2,889	0,426	2,033-3,745
	XPF	2,889	0,452	1,981-3,797

Legenda: LN: lábio normal, QA: Queilite actínica, CEL: Carcinoma epidermóide de lábio



Legenda: LN: lábio normal, QA: Queilite actínica, CEL: Carcinoma epidermóide de lábio

Gráfico 5.11 – Escores Médios de Positividade dos Anticorpos nos diferentes Grupos

A partir do ajuste do modelo podemos afirmar que o anticorpo tem interação com os grupos, ou seja, os comportamentos são diferenciados segundo o anticorpo e grupo. A estatística do teste multivariado (Wilk´s) teve valor igual a x^2=0,683 com p=0,001, indicando que há interação entre o comportamento dos anticorpos nos grupos.

Para avaliar essa estrutura de dependência entre os anticorpos nos grupos utilizamos os Coeficientes de Correlação de Sperman.

No grupo LN foi significativa e elevada somente à correlação entre o XPF e XPC. No grupo QA os 3 anticorpos se correlacionaram de maneira significativa, entretanto o valor dessas correlações foi bem inferior ao observado no grupo LN. O grupo CEL se caracterizou por ter correlação significativa e muito elevada entre o anticorpos XPC e XPF. Esta característica também foi observada no grupo LN não sendo, portanto, específica deste grupo.

6 DISCUSSÃO

6.1 Dados epidemiológicos

Dentre os efeitos adversos da radiação UV citam-se o desenvolvimento de câncer de pele melanoma e não-melanoma, câncer de lábio e queilite actínica (QA)[20,75].

O desenvolvimento do carcinoma epidermóide de lábio (CEL) está relacionado ao acúmulo de altos níveis de exposição solar, ou seja, exposição crônica ao longo da vida. Há ainda uma aparente ligação entre exposição solar na juventude e risco para câncer de lábio, semelhante ao que ocorre para melanoma, mas não para o carcinoma epidermóide da pele[75].

Apesar de haver convincentes evidências sobre a relação causal entre radiação UV e câncer de lábio e QA, são raros os estudos epidemiológicos a respeito da relação entre hábitos de exposição solar e QA e/ou CEL.

Perea-Milla López et al.[76] avaliaram em um estudo caso-controle, a associação entre estilo de vida, fatores ambientais e fenotípicos com o câncer de lábio. Associação positiva foi encontrada para exposição solar precoce e crônica, relacionada a atividades profissionais ao ar livre. Além disto, indivíduos de olhos claros e pele altamente sensível ao sol (sempre se queimam, nunca se bronzeiam) apresentaram maior risco.

No Brasil, em um levantamento epidemiológico realizado com 111 pescadores do estado de Santa Catarina, a prevalência de QA estava associada ao tempo de exposição acumulada aos raios UV[77].

Através do questionário aplicado no presente estudo, foram levantados dados epidemiológicos de pacientes brasileiros com QA e CEL e pesquisados seus hábitos de exposição solar. Houve prevalência de indivíduos do sexo masculino com idade média de 64 e 65 anos, respectivamente, e que possuíam baixo nível de escolaridade.

A maioria das pessoas já havia residido em área rural e exercido atividades profissionais ao ar livre. Além disto, relataram haver ficado expostas de forma crônica ao sol durante a infância e/ou adolescência sem a utilização de medidas protetoras. No entanto, atualmente estas pessoas não mais se expunham de forma freqüente ao sol: a maioria se expunha menos de 3 horas em suas atividades diárias e tomava banhos de sol apenas uma a duas vezes por ano.

A capacidade de bronzeamento da pele destes pacientes também foi avaliada. A grande maioria relatou que quando se expunha ao sol sem medidas protetoras, sempre se queimava e nunca, ou apenas eventualmente, se bronzeava. Tais indivíduos possuíam pele e olhos claros.

A existência de manchas na pele dos pacientes com QA foi um achado bastante comum e alguns destes pacientes (8%) já tiveram câncer de pele.

Filtro solar labial e/ou loção eram utilizados pela maioria dos pacientes dos dois grupos, no entanto este hábito foi recentemente adquirido, após o diagnóstico e orientação profissional.

Os achados do presente trabalho confirmam os dados da literatura de que tanto a QA quanto o CEL estão relacionados à exposição crônica ao sol,

demonstrado pelo fato de que a maioria dos pacientes exerceu trabalho ao ar livre e/ou residiu em área rural. Também foi demonstrada uma relação com a exposição solar na juventude e maior prevalência entre indivíduos de pele e olhos claros com baixa capacidade de bronzeamento.

No estudo com pacientes espanhóis realizado por Perea-Milla López et al.[76] o hábito do tabagismo e o consumo de álcool foram considerados fatores de risco para o câncer de lábio. A associação entre tabagismo e QA também foi estabelecida em pesquisa realizada com pacientes italianos[78], embora o número de casos estudados tenha sido pequeno (apenas cinco). Por outro lado o estudo com pescadores brasileiros a relação entre tabagismo e QA foi negativa[77].

Esta entrevista revelou que no grupo QA 51% dos entrevistados não eram fumantes, apenas 8% fumavam atualmente, mas 30% eram ex-fumantes. No grupo carcinoma 50% eram ex-fumantes e 50% nunca tiveram este hábito. Em relação ao etilismo a grande maioria dos pacientes do grupo QA (77,4%) e 100% do grupo carcinoma não relataram tal hábito (atual ou passado).

6.2 SNPs

A presença de polimorfismos tem sido cada vez mais associada ao risco de desenvolvimento de uma ampla gama de doenças incluindo diversos tipos de neoplasias malignas[53,79,80,81].

Os genes do sistema de reparo do DNA são alvos interessantes neste tipo de estudo já que o DNA não reparado ou incorretamente reparado pode resultar em mutações, aberrações cromossômicas e instabilidade genética[60,82,83].

O gene XPD participa do sistema de reparo por excisão de nucleotídeo e codifica uma proteína de 761 aminoácidos, membro de um complexo de transcrição denominado TFIIH, o qual atua como fator de transcrição, e tem funções na regulação do ciclo celular e apoptose, além da participação no reparo de DNA[84]. Um grande número de polimorfismos está presente neste gene, mas daqueles presentes em regiões codificadoras apenas quatro vêm sendo alvos de estudos de associação por demonstrarem alta freqüência de heterozigose. Dois SNPs em especial o XPD (Asp312Asn) e o XPD (Lys751Gln) são associados ao desenvolvimento de lesões de pele causadas por exposição à radiação UV[85].

A proposta desse trabalho foi analisar a associação entre estes dois SNPs e o risco de desenvolvimento da QA, quadro que antecede o CEL.

Em relação ao polimorfismo XPD (Asp312Asn), a maioria dos estudos na literatura mostra haver risco aumentado ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, tais como carcinomas de pulmão, bexiga, cavidade oral e pele, na presença do genótipo homozigoto AA[82,86,87,88].

No estudo realizado por Hemminki et al. (2001)[59] o risco ao desenvolvimento de melanoma mostrou-se aumentado somente quando se considerava o grupo de pacientes com o genótipo AA em conjunto com o grupo de pacientes que apresentava o genótipo AG.

Este estudo mostrou haver um risco aumentado para QA associado somente ao genótipo AG. É possível que o risco se mostre aumentado também para AA quando se aumentar o número de indivíduos nos grupos estudados. Além disto,

deve-se considerar ainda o fato de que apenas 10 a 20% dos pacientes com QA irão desenvolver o CEL. Portanto, somente será possível avaliar se este SNP está relacionado com a fotocarcinogênese quando o grupo de pacientes com CEL for analisado.

A presença do alelo A implica na síntese do aminoácido Asn ao invés de Asp. Esta alteração pode possivelmente levar a uma alteração na função da proteína e conseqüente redução na capacidade de reparo do DNA[85].

Em estudos que abordam especificamente a fotocarcinogênese, a presença de Asn foi associada a uma diminuição da capacidade de reparo do DNA[55,59,89] e por outro lado, a um aumento da resposta apoptótica à radiação UV[90]. No entanto, este aumento da apoptose poderia ser explicado como um reflexo da diminuição da capacidade de reparo.

Contrariamente a estes achados, os resultados da pesquisa realizada por Han et al. (2005)[60] revelaram uma associação entre o genótipo Asn e risco diminuído para melanomas.

Em relação ao polimorfismo XPD (Lys751Gln), a presença de Gln, também está associada à capacidade de reparo diminuída, aumento da apoptose e diminuição ao risco de melanoma. Em muitas pesquisas estas associações são possíveis apenas quando se considera a presença conjunta de Gln no códon 751 e Asn no códon (Asp312Asn)[55,59].

Apesar de estes dois polimorfismos se encontrarem em desequilíbrio de ligação, ou seja, eles aparecem associados de forma não aleatória mais freqüentemente do que seria esperado, nos resultados deste trabalho não se encontrou associação entre o SNP XPD (Lys751Gln) e a QA. Mais uma vez isso pode ser explicado pelo número limitado de pacientes analisados até o momento, ou

ainda, é possível que estes dois polimorfismos não estejam em desequilíbrio de ligação nesta população estudada.

De modo geral, a suscetibilidade ao câncer pode ser afetada por fatores ambientais. Em carcinomas de cavidade oral os hábitos de tabagismo e etilismo constituem importantes fatores de risco[91]. Na fotocarcinogênese a exposição à radiação UV é sabidamente o principal fator etiológico e alguns autores consideram ainda o hábito de fumar como predisponente à QA e ao CEL[26].

Deste modo, a análise dos SNPs associada à presença de fatores ambientais se torna interessante, entretanto, há poucos trabalhos na literatura com esta abordagem[85].

Neste trabalho, a interação do polimorfismo XPD (Asp312Asn) com fatores externos relativos à exposição solar e hábitos de alcoolismo e tabagismo também foi avaliada. Como resultado, apenas o fato de ter residido em área rural e exercido atividades profissionais ao ar livre foram considerados fatores associados ao risco de desenvolver QA em pacientes com o polimorfismo. Portanto, o hábito do tabagismo não foi associado ao desenvolvimento da QA.

6.3 Imunoistoquímica

A avaliação da presença de CPD foi realizada com o intuito de demonstrar pela primeira vez a presença de tais alterações de DNA em QA e CEL possibilitando também avaliar a eficiência da remoção destas lesões pelo sistema de reparo de DNA por excisão de nucleotídeo.

No grupo QA a quantidade de casos em que se observaram CPDs foi proporcionalmente maior em relação ao grupo LN. Quando o grupo QA foi considerado dividido segundo o grau de displasia, observou-se que conforme o grau de severidade da QA aumenta ocorre uma diminuição de casos positivos para CPD. Esta aparente contradição pode ser explicada pelo fato de que os CPDs não removidos podem dar lugar a mutações C-T[41,84]. Isto também se aplica ao grupo dos carcinomas, no qual células contendo CPDs estavam presentes em um número de casos ainda menor que no grupo LN. Além disto, nos carcinomas a proliferação de células transformadas invadindo o tecido conjuntivo torna maior a espessura da lesão dificultando a difusão da radiação UV e a formação de novos CPDs.

O acúmulo de CPDs em QAs confirma que estas lesões de DNA causadas pela radiação UV devem ser fatores etiológicos da fotocarcinogênese em lábio de modo semelhante ao que ocorre na pele e que na QA a eficiência do sistema de reparo de DNA por excisão de nucleotídeo em remover tais lesões está prejudicada.

Para avaliar se as proteínas XPC e XPF que atuam no sistema de reparo de DNA por excisão de nucleotídeo têm relação com o acúmulo de CPDs e participam do desenvolvimento da QA e do CEL suas expressões imunoistoquímicas também foram avaliadas.

A expressão de XPC e de XPF foi verificada na maior parte dos casos do grupo LN revelando uma correlação na expressão destas duas proteínas neste grupo.

Porém, nos outros dois grupos seus comportamentos foram independentes. Enquanto a expressão XPC aumenta na QA e chega a 100% dos casos nos carcinomas, a expressão de XPF se revelou diminuída nos casos de QA, mas aumentada no grupo carcinoma no qual está presente também em 100% dos casos.

Quando se leva em consideração o grau de displasia, observa-se que a expressão de XPF diminui conforme o grau de severidade diminui. A expressão XPC parece não ter relação com os diferentes estágios da doença, sendo mais elevada nos casos de QAM.

Com base nestas observações pode-se inferir que XPF desempenha papel no desenvolvimento da QA já que sua expressão está diminuída neste grupo.

A expressão de XPC e XPF também foi analisada em relação à presença de CPD. No grupo LN, observou-se que a expressão destas proteínas era dependente da expressão de CPD. No grupo QA foi observada uma tendência em se manter a mesma correlação, porém 26% dos casos não apresentaram XPC e XPF, mesmo com a presença de CPD. No grupo carcinoma essa tendência não se manteve, ou seja, houve expressão de XPC e XPF mesmo na ausência de CPD.

Os casos de QA com ausência de expressão de XPC e XPF, mas que mostraram acúmulo de CPDs, indicam que algum mecanismo de repressão deve estar atuando sobre estas proteínas. Na ausência de XPC e XPF, portanto sem a atuação do sistema de reparo de DNA por excisão de nucleotídeo, as lesões não corrigidas se acumulam e podem dar origem a mutações em genes com funções chave na carcinogênese[92,93]. Desta forma, é possível se considerar que estes casos seriam os mais propensos a sofrerem transformação maligna. Estudos clínicos que acompanhem a evolução da QA em longo prazo conjuntamente com a avaliação da expressão destas proteínas são necessários para que esta hipótese se confirme.

Até o presente momento pouco se sabe a respeito do controle da expressão das proteínas que atuam no sistema de reparo de DNA por excisão de nucleotídeo. Um mecanismo conhecido é o controle via p53. Quando as células são expostas à radiação UV a proteína p53 é fosforilada levando à ativação de p48 que aumenta a

resposta do reparo genômico global[94]. Outras duas proteínas sabidamente envolvidas no controle do sistema de reparo de DNA por excisão de nucleotídeo são a GADD45 e PCNA, cuja transcrição pode ser ativada por p53 ou por uma via independente[34,94].

Por outro lado mutações em p53 podem surgir justamente como resultado de um sistema de reparo ineficiente. Em cânceres de pulmão a hipermetilação da região promotora de XPC leva a sua inativação e contribui pelo menos parcialmente, para a ocorrência de mutações em p53 [95].

Além disto, alguns autores sugerem que em queratinócitos há um mecanismo específico de controle do NER que envolve p63[96,97]. Ferguson-Yates et al.[98] utilizaram queratinócitos humanos deficientes em p53 para avaliação do efeito da redução de p63 no reparo genômico global. Nestes queratinócitos deficientes em p53, os níveis do XPC não estão modificados e o reparo ocorre sem prejuízo. Os resultados obtidos por estes pesquisadores indicam que a redução simultânea de p53 e p63, mas não de p53 e p73, compromete o reparo de CPDs nos queratinócitos e que este efeito está associado à diminuição nos níveis das proteínas XPC e DDB2, outra proteína que atua no reconhecimento de CPDs.

Em relação à XPF, esta proteína apresenta-se sob a forma de um heterodímero ERCC1-XPF que é recrutado para o local da lesão através da proteína XPA[99]. Sabe-se que há um mecanismo de regulação recíproca entre ERCC1 e XPF[71]. Em experimentos com camundongos *knockout* o decréscimo da expressão de ERCC1 leva a degradação de XPF e vice-e-versa[100]. Desta forma, ausência ou defeitos em ERCC1, XPA ou em outras proteínas de reparo que atuam em etapas anteriores podem se responsáveis pela ausência de XPF nestes casos de QA.

Outros mecanismos como o controle translacional, também podem estar envolvidos reprimindo a expressão das proteínas. Este tipo de regulação parece ocorrer em linhagens celulares de câncer de testículo nas quais baixas quantidades de proteína ERCC1, XPF e XPA foram observadas apesar da abundante quantidade de RNAm[101]. Polimorfismos genéticos que levam a uma alteração na função da proteína e conseqüentemente interferem na capacidade de reparo de DNA[53] constituem outra hipótese que poderia justificar ausência de expressão de XPC e XPF.

É preciso lembrar ainda que XPC e XPF participam de outras vias celulares como reparo por excisão de base (BER), reparo de quebra de fita dupla, reparo de danos oxidativos ao DNA, recombinação homóloga e na manutenção do telômero[102,103]. Deste modo, outras proteínas e outros mecanismos de controle destas vias podem estar atuando sobre a expressão de XPC e XPF.

Nos resultados deste estudo obteve-se um aumento da expressão de XPC e XPF nos casos de carcinoma, o que parece contraditório, principalmente em relação à XPF que teve sua expressão diminuída no grupo QA. De fato, em cânceres geralmente, espera-se encontrar uma menor expressão de proteínas de reparo de DNA. Em carcinomas de bexiga e testículo, por exemplo, há uma diminuição da expressão de XPF[101]. No entanto, em carcinomas de pulmão ocorre o inverso[104]. Neste caso, os autores sugerem que a expressão aumentada de XPF pode estar relacionada a um aumento da demanda fisiológica do reparo no tecido alterado ou ao aumento do número de mitoses.

Nos casos de CEL a expressão de XPF apresentou-se elevada. Tal resultado indica que a expressão desta proteína, provavelmente está sendo modulada por

algum outro mecanismo presente em outras vias das quais XPF faz parte e que possivelmente foi ativado durante processo neoplásico.

Dentre os possíveis papéis exercidos por XPF fora do sistema de reparo de DNA por excisão de nucleotídeo, uma participação interessante é na regulação da integridade do telômero através de sua atividade nuclease. Nesta localização ERCC1-XPF forma um complexo com TRF2, uma conhecida proteína reguladora do comprimento do telômero. Quando TRF2 está super expressa ocorre o seqüestro de XPF nos telômeros ocasionando degradação anormal do telômero e o encurtamento de sua extremidade. Concomitantemente ocorre deficiência no reparo de DNA. A instabilidade genética causada pelo encurtamento dos telômeros associada à ineficiência do NER predispõe ao desenvolvimento do câncer[105].

Esta participação de XPF formando um complexo com TRF2 pode explicar os resultados obtidos em relação aos níveis aumentados desta proteína no grupo carcinoma.

7 CONCLUSÕES

- Na população analisada, a maioria das pessoas atingidas pela QA e pelo CEL apresenta pele branca, olhos azuis ou verdes e cabelos castanhos, cuja média de idade é de 64 e 65 anos, respectivamente.
- O fato de ter residido em área rural e exercido atividades profissionais ao ar livre foram considerados fatores de risco para o desenvolvimento da QA.
- O genótipo AG para o polimorfismo XPD (Asp312Asn) está associado a maior risco para o desenvolvimento da QA.
- O acúmulo de CPDs e a diminuição da expressão de XPF em casos de QA evidenciam a reduzida eficiência do NER nestas lesões, condição que possivelmente leva ao aparecimento de mutações e conseqüentemente contribui para o desenvolvimento do CEL.
- Os casos de QA mais propensos a sofrerem transformação maligna provavelmente são aqueles que apresentam acúmulo de CPDs combinado com a ausência de XPC e/ou XPF.

REFERÊNCIAS[1]

1. Sykes AJ, Allan E, Irwin C. Squamous cell carcinoma of the lip: The role of electron treatment. Clin Oncol 1996;8(6):384-6.

2. Zitsch RP III. Carcinoma of the lip. Otolaryngol Clin North Am 1993;26(2):265-77.

3. Durazzo MD, Araujo 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(4):293-8.

4. Salgarelli AC, Sartorelli F, Cangiano A, Pagani R, Collini M. Surgical treatment of lip cancer: our experience with 106 cases. J Oral Maxillofac Surg. 2009; 67(4):840-5.

5. De Visscher JG, van der Waal I. Etiology of cancer of the lip. A review. Int J Oral Maxillofac Surg 1998;27(3):199-203.

6. Kübler AC, de Carpentier J, Hopper C, Leonard AG, Putnam G. Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy. Int J Oral Maxillofac Surg 2001; 30(6):504-9.

7. Bentley JM, Barankin B, Lauzon GJ. Paying more than lip service to lip lesions. Can Fam Physician 2003; 49:1111-6.

8. Million RR, Cassisi NJ, Macuso AA. Oral Cavity, In: Million RR, Cassisi NJ, editors. Management of head and neck cancer: a multidisciplinary approach. 2nd ed. Philadelphia: JB Lippincott Co; 1994. p.321-400.

[1] De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

9. Keller AZ. Cellular types, survival race, nativity, occupation, habits and associated diseases in the pathogenesis of lip cancer. Am J Epidemiol 1970;91(5):486-99.

10. Anderson DL. Cause and prevention of lip cancer. J Can Dent Assoc 1971;37(4):138-42.

11. Salgarelli AC, Sartorelli F, Cangiano A, Collini M. Treatment of lower lip cancer: an experience of 48 cases. Int J Oral Maxillofac Surg 2005; 34(1):27-32.

12. Quaedvlieg PJ, Creytens DH, Epping GG, Peutz-Kootstra CJ, Nieman FH, Thissen MR, et al. Histopathological characteristics of metastasizing squamous cell carcinoma of the skin and lips. Histopathology 2006;49(3):256-64.

13. Antunes AA, Antunes AP. Estudo retrospectivo e revisão de literatura dos tumores dos lábios: experiência de 28 anos. Rev Bras Cancerologia 2004; 50(4):295-300.

14. Amar A, Franzi SA, Curioni OA, Rapoport A, Cervantes O. Esvaziamento cervical no tratamento do carcinoma epidermóide de lábio. Rev Bras Otorrinolaringol 2004;70(6):772-5.

15. Vahtsevanos K, Ntomouchtsis A, Andreadis C, Patrikidou A, Karakinaris G, Mangoudi D, et al. Distant bone metastases from carcinoma of the lip: a report of four cases. Int J Oral Maxillofac Surg 2007; 36:180-5.

16. Abreu MAMM, Silva OMP, Pimentel DRN, Hirata CHW, Weckx LLM, Alchorne MMA, et al. Actinic cheilitis adjacent to squamous carcinoma of the lips as an indicator of prognosis. Rev Bras Otorrinolaringol 2006;72(6):767-71

17. Picascia DD, Robinson JK. Actinic cheilitis: a review of the etiology, differential diagnosis and treatment. J Am Acad Dermatol 1987; 17(Pt1):255-64.

18. Vukadinovic M, Jezdic Z, Petrovic M, Medenica LM, Lens M. Surgical management of squamous cell carcinoma of the lip: analysis of a 10-year experience in 223 patients. J Oral Maxillofac Surg 2007;65(4):675-9.

19. Horta MC, de Assis LA, de Souza AF, de Araújo VC, Gomez RS, Aguiar MC. P53 and p21 WAF1/CIP1 overexpression at the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2007;36(2):88-92.

20. Menta Simonsen Nico M, Rivitti EA, Lourenço SV. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. J Cutan Pathol 2007; 34(4):309-14.

21. Nicolau SG, Balus L. On the nature of keratoacanthoma and its position among epithelio-cutaneous tumors. Oncology 1964;17:120-34.

22. Main JH, Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. J Can Dent Assoc 1994;60(2):113-6.

23. Cataldo E, Doku HC. Solar cheilitis. J Dermatol Surg Oncol 1981;7(12):989-95.

24. Manganaro AM, Will MJ, Poulos E. Actinic cheilitis: a premalignant condition. Gen Dent 1997;45(5):492-4.

25. Kaugars GE, Pillion T, Svirsky JA, Page DG, Bums JC, Abbey LM. Actinic cheilits: a review of 152 cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1999;88(2):181-6.

26. Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, KayavisI. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases Oral Diseases 2004;10: 212–16.

27. Robinson JK. Actinic cheilitis. A prospective study comparing four treatment methods. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1989;115(7):848-52.

28. Cavalcante ASR, Anbinder AL, Carvalho YR. Clinical cheilitis: clinical and histological features. J Oral Maxillofac Surg 2008; 66:498-503.

29. Koten JW, Verhagen AR, Frank GL. Histopathology of actinic cheilitis. Dermatologica 1967;135(6):465-71.

30. Terezhalmy GT, Naylor GD. Actinic cheilitis. J Indiana Dent Assoc 1993; 72(4):12-5.

31. Dufresne RG Jr, Garrett AB, Bailin PL, Ratz JL. Carbon dioxide laser treatment of chronic actinic cheilitis. J Am Acad Dermatol 1988;19(Pt1):876-8.

32. Kutcher MJ, Rubesntein D. Fifteen inches from cancer: early recognition of facial lesions by the dentist. Compend Contin Educ Dent 2004; 25(12):939-42.

33. Hussein MR. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. J Cutan Pathol 2005; 32(3):191-205.

34. Melnikova VO, Ananthaswamy HN. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. Mutation Research 2005; 571(1-2): 91-106.

35. Sinha RP, Häder DP. UV induced DNA damage and repair: a review. Photochem Photobiol Sci 2002;1(4):225-36.

36. Sander CS, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. Br J Dermatol 2003; 148(5):913-22.

37. Setlow RB, Carrier WL. Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. J Mol Biol 1996; 17(1):237-54.

38. Mitchell DL. The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. Photochem Photobiol 1998; 48(1):51-7.

39. Clingen PH. Arlett CF. Roza L, Mori T. Nikaido O, Green MHL. Induction of cyclobutane pyrimidine dimers, pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts, and Dewar valence isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells. Cancer Res 1995;55(11):2245-8.

40. Sage E. Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. Photochem Photobiol 1993; 57(1):163-74.

41. Daya-Grosjean L, Sarasin A. The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors. Mut Res 2005;571(1-2):43-56.

42. Brash DE. UV mutagenic photoproducts in *Escherichia coli* and human cells: a molecular genetics perspective on human skin cancer. Photochem Photobiol 1988; 48(1):59-66.

43. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 2001;411(6835):366-74.

44. Leibeling D, Laspe P, Emmert S. Nucleotide excision repair and cancer. J Mol Hist 2006; 37(5-7):225-38.

45. De Boer J, Hoeijmakers JH. Nucleotide excision repair and human syndromes. Carcinogenesis 2000; 21(3):453-60.

46. Park CJ, Choi BS. The protein shuffle. Sequential interactions among components of the human nucleotide excision repair pathway. FEBS J 2006;273(8):1600-8.

47. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. Expert Rev Mol Med 2002;4(26):1-22.

48. Kulaksiz G, Reardon JT, Sancar A. Xeroderma pigmentosum complementation group E protein (XPE/DDB2): purification of various complexes of SPE and analyses of their damaged DNA binding and putative DNA repair properties. Mol Cell Biol 2005; 25(22):9784-92.

49. Sugasawa K. UV-induced ubiquitylation of XPC complex, the UV-DDB-ubiquitin ligase complex, and DNA repair. J Mol Histol 2006;37(5-7):189-202.

50. Venema J, van Hoffen A, Karcagi V, Natarajan AT, van Zeeland AA, Mullenders LH. Xeroderma pigmentosum complementation group C cells remove pyrimidine dimmers selectively form the transcribed strand of active genes. Mol Cell Biol 1991;11(8):4128-34.

51. Benhamou S, Sarasin A. ERCC2/XPD gene polymorphisms and cancer risk. Mutagenesis 2002;17(6):463-9.

52. Sugimura T, Kumimoto H, Tohnai I, Fukui T, Matsuo K, Tsurusako S, et al. Gene-environment interaction involved in oral carcinogenesis: molecular

epidemiological study for metabolic and DNA repair gene polymorphisms. J Oral Pathol Med. 2006; 35(1):11-8

53. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002; 11(2):1513-30

54. Millikan RC, Hummer A, Begg C, Player J, de Cotret AR, Winkel S, et al. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and risk of multiple primary melanoma: the genes environment and melanoma study. Carcinogenesis 2006; 27(3):610-8.

55. Qiao Y, Spitz MR, Shen H, Guo Z, Shete S, Hedavati M, et al.. Modulation of repair of ultraviolet damage in the host-cell reactivation assay by polymorphic XPC and XPD/ERCC2 genotypes. Carcinogenesis 2002; 23(2):295-9.

56. Tomescu D, Kavanagh G, Ha T, Campbell H, Melton DW. Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. Carcinogenesis 2001;22(3):403-8.

57. Dybdahl M, Vogel U, Frentz G, Wallin H, Nexo BA. Polymorphisms in the DNA repair gene XPD: correlations with risk and age at onset of basal cell carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1999;8(1):77-81.

58. Vogel U, Hedavati M, Dybdahl M, Grossman L, Nexo BA. Polymorphisms of the DNA repair gene XPD: correlations with risk of basal cell carcinoma revisited. Carcinogenesis 2001;22(6): 899-904.

59. Hemminki K, Xu G, Angelini S, Snellman E, Jansen CT, Lambert B, et al. XPD exon 10 and 23 polymorphisms and DNA repair in human skin in situ. Carcinogenesis 2001;22(8):1185-8.

60. Han J, Colditz GA, Liu JS, Hunter DJ. Genetic variation in XPD, sun exposure, and risk of skin cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14(6):1539-44.

61. Brewster AM, Alberg AJ, Strickland PT, Hoffman SC, Helzlouer K. XPD polymorphism and risk of subsequent cancer in individuals with nonmelanoma skin cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004;13(8):1271-5.

62. McCarty KM, Smith TJ, Zhou W, Gonzalez E, Quamruzzaman Q, Rahman M, et al. Polymorphisms in XPD (Asp312Asn and Lys751Gln) genes, sunburn and arsenic-related skin lesions. Carcinogenesis 2007; 28(8):1697-702.

63. Cheo DL, Burns DK, Meira LB, Houle JF, Friedberg EC. Mutation inactivation of the xeroderma pigmentosum group C gene confers predisposition to 2-acetylaminofluorene-induced liver and lung cancer and to spontaneuous testicular cancer in Trp53 _/_ mice. Cancer Res 1999; 59:771-5.

64. Fautrel A, Andrieux L, Musso O, Boudjema K, Guillouzo A, Langoue S. Overexpression of the two nucleotide excision repair genes ERCC1 and XPC in human hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2005;43:288-93.

65. Chen Z, Yang J, Wang G, Song B, Li J, Zhigang X. Attenuated expression of xeroderma pigmentosum group C is associated with critical events in human bladder cancer, carcinogenesis and progression. Cancer Res 2007; 67(10):4578-85.

66. Yang M, Kang MJ, Choi Y, Kim CS, Lee SM, Park CW, et al. Associations between XPC expression, genotype, and the risk of head and neck cancer. Environ Mol Mutagen 2005; 45(4):374-79.

67. Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Spitz MR, Wei Q. Expression of nucleotide excision repair genes and the risk for squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer 2002; 94:393-7.

68. Wu YH, Cheng YW, Chang JT, Wu TC, Chen CY, Lee H. Reduced XPC messenger RNA level may predict a poor outcome of patients with nonsmall cell lung cancer. Cancer 2007;110(1):215-23.

69. Liu C, Zhou S, Begum S, Sidransky D, Westra WH, Brock M, et al. Increased expression and activity of repair genes TDP1 and XPF in non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2007;55(3): 303-11.

70. Wei Q, Wang LE, Sturgis EM, Mao L. Expression of nucleotide excision repair proteins in lymphocytes as a marker of susceptibility to squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14(8):1961-6.

71. Planchard D, Domont J, Taranchon E, Monnet I, Tredaniel J, Caliandro R, et al. The NER proteins are differentially expressed in ever smokers and in never smokers with lung adenocarcinoma. Ann Oncol In press March 2009.

72. McGurk CJ, Cummings M, Köberle B, Hartley JA, Oliver RT, Masters JR. Regulation of DNA repair gene expression in human cancer cell lines. J Cell Biochem 2006; 97(5):1121-36.

73. Blast. Basic local alignment search tool. Disponível em URL: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. [2008 maio 10]

74. Mapas de sítios de enzimas de restrições. Disponível em URL: http://www.restrictionmapper.org/. [2008, maio 10]

75. Gallagher RP, Lee TK. Adverse effects of ultraviolet radiation: A brief review. Prog Biophys Mol Biol 2006;92(1):119-31.

76. Perea-Milla López E, Miñarro-Del Moral RM, Martínez-García C, Zanetti R, Rosso S, Serrano S, et al. Lifestyles, environmental and phenotypic factors associated with lip cancer: a case–control study in southern Spain. Br J Cancer 2003;88(11):1702-7.

77. Silva FD, Grando FI, Calvo LJ, Rath MC, Fabro IBS, Lückmann SM. Estudo da prevalência de alterações labiais em pescadores da ilha de Santa Catarina. Rev Odonto Ciência 2006;21(51):37-42.

78. Campisi G, Margiotta V. Oral mucosal lesions and risk habits among men in an Italian study population. J Oral Pathol Med 2001;30(1): 22-8.

79. McColgan P, Shama P. Polymorphisms of matrix metalloproteinases 1,2,3 and 9 and susceptibility to lung, breast and colorectal cancer in over 30,000 subjects. Int J Cancer 2009 [Epub ahead of print]

80. Inamoto Y, Murata M, Katsumi A, Kuwatska Y, Tsujimura A, Ishikawa Y, et al. Donor single nucleotide polymorphism in the CCR9 gene affects the incidence of skin GVHD. Bone Marrow Transplant 2009 Jun 15 [Epub ahead of print]

81. Ren XY, Xu L, Meng HX, Zhao HS, Lu RF, Chen ZB, et al. Family-based association analysis of S100A8 genetic polymorphisms with aggressive periodontitis. J Periodontal Res 2009; 44(2):184-92.

82. Andrew AS, Nelson HH, Kelsey KT, Moore JH, Meng AC, Casella DP, et al. Concordance of multiple analytical approaches demonstrates a complex relationship between DNA repair gene SNPs, smoking and bladder cancer susceptibility. Carcinogenesis 2006; 27(5):1030-7.

83. McCarty KM, Smith TJ, Zhou W, Gonzalez E, Quamruzzaman Q, Rahman M, et al. Polymorphisms in XPD (Asp312Asn and Lys751Gln) genes, sunburn and arsenic-related skin lesions. Carcinogenesis 2007, 28(8):1697-702.

84. Nouspikel T. Nucleotide excision repair: variations on versatility. Cell Mol Life Sci 2009; 66(6):994-1009.

85. Wang F, Chang D, Hu FL, Sui H, Han B, Li DD et al. DNA Repair Gene XPD Polymorphisms and Cancer Risk: A Meta-analysis Based on 56 Case-Control Studies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008; 17(3):507-17.

86. Schabath MB, Delclos GL, Grossman HB, Wang Y, Lerner SP, Chamberlain RM, et al. Polymorphisms in XPD exons 10 and 23 and bladder cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005,14(4):878-84.

87. Shi Q, Wang LE, Bondy ML, Brewster A, Singletary SE, Wei Q. Reduced DNA repair of benzo[a]pyrene diol epoxide-induced adducts and common XPD polymorphisms in breast cancer patients. Carcinogenesis 2004;25(9):1695-700.

88. Majumder M, Sikdar N, Ghosh S, Roy B. Polymorphisms at XPD and XRCC1 DNA repair loci and increased risk of oral leukoplakia and cancer among NAT2 slow acetylators. Int J Cancer 2007;120(10):2148-56.

89. Spitz MR, Wu X, Wang Y, Wang LE, Shete S, Amos CL, et al. Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. Cancer Res 2001;61:1354-7.

90. Seker H, Butkiewicz D, Bowman ED, Rusin M, Hedayate M, Grossman L et al. Functional significance of XPD polymorphic variants: attenuated apoptosis in human lymphoblastoid cells with the XPD 312 Asp/Asp genotype. Cancer Res 2001;61:7430-4.

91. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. Curr Opin Oncol 2009;21(3):194-200.

92. Nishigori C. UV-induced DNA damage in carcinogenesis and its repair. J Dermatol Sci. 2000; 23 Suppl1:SS41-4.

93. Zhu Y, Yang H, Chen Q, Lin J, Grossman HB, Dinney CP, et al. Modulation of DNA damage/DNA repair capacity by XPC polymorphisms. DNA Repair 2008; 7(2):141-8.

94. Chu G. Global genomic repair and p53 in a dance after DNA damage. Cancer Biol Ther 2002; 1(2):150-1.

95. Wu YH, Tsai Chang JH, Cheng YW, Wu TC, Lee H. Xeroderma pigmentosum group C gene expression is predominantly regulated by promoter hypermethylation and contributes to p53mutation in lung cancers. Oncogene 2007; 26(33):4761-73.

96. D'Errico M, Teson M, Calcagnile A, Nardo T, De Luca N, Lazzari C, et al. Differential role of transcription-coupled repair in UVB-induced response of human fibroblasts and keratinocytes. Cancer Res 2005; 65(2):432-8.

97. Ferguson BE, Oh DH. Proficient global nucleotide excision repair in human keratinocytes but not fibroblasts deficient in p53. Cancer Res 2005; 65(19): 8723-9.

98. Ferguson-Yates BE, Li H, Dong TK, Hsiao JL, Oh DH. Impaired of cyclobutane pyrimidine dimers in human keratinocytes deficient in p53 and p63. Carcinogenesis 2008; 29(1):70-5.

99. Croteau DL, Peng Y, Van Houten B. DNA repair gets physical: Mapping an XPA-binding site on ERCC1. DNA Repair 2008;7(5):819-26.

100. Gaillard PH, Wood RD. Activity of individual ERCC1 and XPF subunits in DNA nucleotide excision repair. Nucleic Acids Res 2001;29(4): 872–9.

101. McGurk, Cummings M, Koberle B, Hartley JA, Oliver RT, Masters JR. Regulation of DNA Repair Gene Expression in Human Cancer Cell. J Cell Biochem 2006;97(5):1121-36.

102. Sugasawa K. Xeroderma pigmentosum genes: functions inside and outside DNA repair. Carcinogenesis 2008;29(3):455-65.

103. D'Errico M, Parlanti E, Teson M, de Jesus BM, Degan P, Calcagnile A, et al. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. EMBO J 2006;25(18):4305-15.

104. Liu C, Zhou S, Begum S, Sidransky D, Westra WH, Brock M, et al. Increased expression and activity of repair genes TDP1 and XPF in non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2007;55(3):303-11.

105. Munoz P, Blanco B, Blasco M. Role of the TRF2 telomeric protein in cancer and ageing. Cell Cycle 2006; 5(7):718-21.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 134/07

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"PROTEÍNAS E POLIMORFISMOS DE GENES DE REPARO DE DNA NA FOTOCARCINOGÊNESE EM LÁBIO"**, de responsabilidade da Pesquisadora: **PATRÍCIA LEITE DE GODOI ADACHI RICARDO,** sob orientação da Professora Doutora **MARÍLIA TRIERVEILER MARTINS.**

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 04 de outubro de 2007

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-900
São Paulo – SP - Diretoria Telefax: (011) 3091- 0062/3091-7817/3091-7860 - Compras (011) 3091-7895

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(A) Sr.(a) está sendo convidado(a) para participar da pesquisa "Estudo de proteínas e polimorfismos em genes de reparo de DNA e seu papel na carcinogênese do carcinoma epidermóide de lábio" sob responsabilidade da pesquisadora Dra. Marília Trierveiler Martins e de Patricia L. G. Adachi Ricardo.

Sua participação não é obrigatória e a qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em relação à continuidade ou qualidade do tratamento odontológico que recebe neste Serviço.

O objetivo principal deste estudo é verificar porque algumas pessoas têm maior risco para o desenvolvimento de queilite actínica e câncer de lábio do que outras. Para avaliar isto estudaremos uma parte do material genético de cada voluntário. Esta parte que estudaremos corresponde aos genes XP. Dentro destes genes iremos verificar se há alterações, conhecidas como polimorfismos, que possam estar relacionados ao risco desenvolvimento de queilite actínica ou câncer de lábio.

O câncer de lábio, assim como o câncer de pele, é causado pela radiação solar ultravioleta (UV) e é precedido de uma lesão, a queilite actínica. Quando nos expomos frequentemente e excessivamente ao sol, acontecem algumas alterações no DNA (material genético) de nossas células. Estas alterações podem ser corrigidas pelo sistema de reparo de DNA que nossas células possuem. Os genes conhecidos com XP fazem parte de um dos sistemas de reparo existentes. Quando estes genes estão defeituosos (mutados) o reparo não ocorre e isto pode levar ao desenvolvimento de câncer. Pessoas que têm mutações (defeitos) nos genes XP são portadoras de uma síndrome chamada Xerodermia pigmentosa. Porém na população em geral, livre da síndrome, geralmente ocorrem pequenas variações nestes genes, que não constituem uma mutação e que são chamadas de polimorfismos. Estudos realizados anteriormente já demonstraram que pessoas com determinadas variações têm mais ou menos risco de desenvolver câncer de pele. No entanto, a relação destes polimorfismos com o desenvolvimento da queilite actínica e do câncer de lábio ainda não foi verificada e é com este intuito que estamos realizando este estudo.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em doar algumas células da boca que serão colhidas por meio de uma raspagem feita com uma espátula apropriada, sendo esta técnica não invasiva e nem dolorosa. Além disto, haverá também o preenchimento de um questionário no qual pediremos informações sobre seus hábitos de exposição e proteção ao sol.

É importante salientar que não haverá riscos nem benefícios para sua saúde. No entanto, esta pesquisa poderá trazer benefícios futuros para a população em geral.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidencias e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço dos pesquisadores principais, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Patricia Leite de Godoi Adachi Ricardo bem como sua orientadora Marília Trierveiler Martins se encontram à Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 Cidade Universitária – São Paulo/SP, telefone (11) 3091-7902.

Eu,_____, portador do RG número _____, declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Desejo receber informações sobre os resultados da pesquisa, bem como sobre a existência ou não de polimorfismos nos meus genes de reparo de DNA:

SIM ( ) Telefone para contato:_____
NÃO ( )

São Paulo, ____ de _____ de _____.

_____
Assinatura do paciente ou responsável

ANEXO C – Questionário

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO DOS HÁBITOS DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO SOLAR

Idade:_____ sexo: F ( ) M ( )
Profissão:_____
Já trabalhou em área rural? _____

1- Reside em:
Zona rural ( ) zona urbana ( )
Já residiu em área rural? _____ Por quanto tempo?_____

2- Nível de escolaridade:
Analfabeto ( ) ensino fundamental incompleto ( ) ensino fundamental completo ( ) ensino médio incompleto ( ) ensino médio completo ( ) ensino superior incompleto ( ) ensino superior completo ( ) pós graduação ( )

3- Cor da pele
Branca ( ) mulata ( ) morena ( ) negra ( ) amarela ( )

4- Cor dos olhos:
Azuis/verdes ( ) castanhos claros ( ) castanhos escuros ( ) negros ( )

5- Cor dos cabelos
Castanhos ( ) loiros ( ) negros ( ) ruivos ( )

6- Durante sua infância ou adolescência você ficou exposto ao sol por longos períodos?
( ) não
( ) não me recordo
( ) sim, mas nunca utilizei medidas protetoras
( ) sim, mas sempre utilizei medidas protetoras

7- Você se expõe ao sol de forma prolongada e freqüente ao sol ou toma banho de sol?
( ) na sua casa
( ) no trabalho
( ) na praia/clube
( ) no sítio/fazenda
( ) não me exponho

8- Quando você se expõe ao sol:
( ) ás vezes se queima, sempre se bronzeia
( ) nunca se queima, sempre se bronzeia
( ) sempre se queima, eventualmente se bronzeia
( ) sempre se queima, nunca se bronzeia

9- Quanto tempo você se expoe ao sol diariamente?
( ) menos de 1 hora
( ) De 1 hora a 3 horas
( ) De 3 hora a 6 horas
( ) Mais de 6 horas

10- Você toma banho de sol ( ) ou se bronzeia artificialmente ( )?
( ) poucas vezes (1 ou 2 vezes/ano)
( ) às vezes (3 a 5 vezes/ano)
( ) regularmente (6 vezes/ano)
( ) sempre

11- Você já teve queimaduras devido à exposição solar?
( ) nunca tive
( ) só uma vez
( ) até 3 vezes
( ) mais de 3 vezes

12- Você já teve outros problemas devido à exposição solar?
( ) não
( ) sim, câncer de pele
( ) sim, manchas na pele
( ) sim, outros _____

13- Você utiliza protetores solares em loção ( ) e/ou labial ( )?
( ) em qualquer época do ano
( ) nunca uso
( ) somente no verão
( ) quando tomo banho de sol

14- Qual o fator de proteção solar (FPS)?
( ) não uso
( ) menor que 4
( ) de 4 a 8
( ) de 8 a 15
( ) de 15 a 30
( ) maior que 30

15- Você fuma? _____ Já fumou? _____ Por quanto tempo?_____

16- Você bebe? _____ Já bebeu? _____ Por quanto tempo? _____