**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA**

LUCIANNE MAIA COSTA LIMA

**Imunolocalização, metilação e polimorfismo do gene
ERCC1 em carcinoma espinocelular de cabeça e
pescoço: correlação com parâmetros clínicos, controle
locorregional e sobrevida**

São Paulo
2011

LUCIANNE MAIA COSTA LIMA

**Imunolocalização, metilação e polimorfismo do gene
ERCC1 em carcinoma espinocelular de cabeça e
pescoço: correlação com parâmetros clínicos, controle
locorregional e sobrevida**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de: Radiologia

Orientadora: Prof.^a Dra. Heloísa de
Andrade Carvalho

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Lucianne Maia Costa

Imunolocalização, metilação e polimorfismo do gene ERCC1 em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço : correlação com parâmetros clínicos, controle locorregional e sobrevida / Lucianne Maia Costa Lima. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Radiologia.

Orientadora: Heloisa de Andrade Carvalho.

Descritores: 1.Neoplasias de cabeça e pescoço 2.Carcinoma espinocelular
3.Reparo do DNA 4.Metilação 5.Polimorfismo genético 6.Imunoistoquímica
7.Radioterapia adjuvante

USP/FM/DBD-072/11

“Age de modo que consideres a humanidade tanto na tua pessoa quanto na de qualquer outro, e sempre como objetivo, nunca como simples meio.”

Immanuel Kant

*Dedico este trabalho ao meu amor, Agá
Por sua serenidade...
Meu caminho, minha força!*

Agradecimentos

À FAPESP

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

À UNIMONTES

Universidade Estadual de Montes Claros
Laboratório de Pesquisa em Saúde da UNIMONTES

Agradecimentos

A Deus, por minha coragem de ir ao encontro da vida, sorvendo cada instante como uma dádiva.

À minha mãe Deusmira Alves Maia. Por um amor sem medidas...

Ao meu pai Gézio Salvador Prates Costa. Por me ensinar o valor da honestidade e do trabalho árduo.

Ao meu esposo Agamenon Monteiro Lima e aos nossos filhos Mateus e Gabriel. Por este amor tão intenso! Nenhuma palavra pode expressá-lo por inteiro.

À Dra Heloísa Andrade Carvalho pela ajuda efetiva neste trabalho, por sua contribuição na minha formação profissional, por sua mão tão facilmente estendida. A minha admiração nunca se cansa...

Ao Dr Alfredo Maurício Batista de Paula os meus mais sinceros agradecimentos pela fundamental contribuição em todas as fases deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Pesquisa em Saúde da UNIMONTES, especialmente Ludmilla, Thiago e Camila, todo o meu apreço e gratidão.

Aos pacientes, por sua preciosa contribuição, pela oportunidade de servir.

Às minhas irmãs Eli, Ká, Pati e Ceci, com todo o meu carinho e amor verdadeiro.

Aos meus irmãos por afinidade, por se doarem por amizade e representarem tanto para mim! Pessoas muito queridas! Cada uma delas, sabe-se.

Esta tese está de acordo com:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª edição. São Paulo. Serviço de Biblioteca e Documentação, 2008.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Os dados desta tese foram utilizados na produção do artigo científico:

“DNA repair gene ERCC1 in head and neck squamous cell carcinoma: analysis of methylation and polymorphism (G19007A), protein expression, and association with epidemiological and clinicopathological factors”.

Dados apresentados parcialmente no IV FEPEG - Fórum de Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão (23 Setembro de 2010). Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro - Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1	Epidemiologia e etiopatogênese do carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP).....	3
2.2	Aspectos clínicos e morfológicos do CECP	6
2.3	Mecanismos de resposta celular à radiação ionizante.....	8
2.4	Mecanismos de Reparo do DNA.....	14
2.5	O gene de reparo do DNA ERCC1	15
2.6	Metilação do DNA	19
2.7	Polimorfismos Genéticos.....	25
2.7.1	Polimorfismo de ERCC1	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo primário	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	PACIENTES E MÉTODOS.....	31
4.1	Desenho do estudo.....	31
4.2	Critérios de elegibilidade	31
4.3	Critérios de exclusão.....	33

4.4	Definição e classificação das variáveis independentes clínicas, morfológicas e epidemiológicas	33
4.5	Análise do polimorfismo do gene ERCC1	37
4.6	Análise da metilação do gene ERCC1	38
4.7	Análise da expressão tecidual da proteína ERCC1	39
4.8	Análises estatísticas.....	41
4.9	Aspectos éticos	42
5	RESULTADOS	43
5.1	Avaliação e análise do polimorfismo alélico da região promotora do gene ERCC1.....	46
5.2	Análise do status da metilação do gene ERCC1.....	46
5.3	Avaliação da expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1	47
5.4	Análise da sobrevida global de acordo com as variáveis epidemiológicas, clínicas, morfológicas e com os achados moleculares de ERCC1.....	50
6	DISCUSSÃO.....	63
7	CONCLUSÃO.....	74
9	REFERÊNCIAS	76

Apêndices

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
BE	Efetividade biológica
BED	“Biological Effective Dose” (dose biológica efetiva)
BER	“Base-excision-repair” (reparo de excisão de base)
CECP	Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
CPCNP	Carcinoma de pulmão de células não pequenas
CPG	Dinucleotídeo citosina-guanina
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT3B	DNA metil transferases
ERCC1	“Excision Repair Cross Complementation Group 1” (gene de reparo do DNA)
GLB	“Gel loading buffer” (tampão de carregamento de gel)
GGR	Reparo genômico global
HFC	História familiar de câncer
HR	Risco relativo
HPV	Papiloma Virus Humano
IALT-Bio	“International Adjuvant Lung Cancer Trial Biology Study”
IC	Intervalo de confiança
INCa	Instituto Nacional do Câncer
LET	Transferência linear de energia
LSAB	“Labeled Streptavidin Biotin”: método baseado na Estreptavidina biotina
MAD	Metástase à distância
MSP-PCR	“Methylation-specific” PCR (PCR metilação-específica)
NER	“Nucleotide-excision-repair” (Reparo de excisão de nucleotídeo)
NHEJ	Reparo por recombinação não homóloga
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Valor de p (probabilidade)
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase

REB	Reparo por excisão de bases
REN	Reparo por excisão de nucleotídeos
RFLPs	Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição
RGG	Reparo genômico global
RLR	Recidiva locorregional
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RM	Ressonância magnética
RRH	Reparo por recombinação homóloga
SAH	S-adenosil-hocisteína
SAM	S-adenosil-metionina
SGM	Sobrevida global mediana
SNP	“Single-nucleotide-polymorphism” (polimorfismo de nucleotídeo único)
STP	Segundo tumor primário
TC	Tomografia computadorizada
TCR	Reparo acoplado à transcrição
TNM	Sistema de estadiamento de lesões malignas, que se baseia no tamanho tumoral (T), metástase em linfonodos (N) e metástase à distância (M).
UV	Raios ultra-violeta
VNTRs	Número variável de repetições em tandem
XP	Xeroderma pigmentoso

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitro
Mm	Micrômetro
F	Forward
HE	Hematoxilina e eosina
Min	Minuto
mM	Milimolar
ng	Nanograma
Pmol	Picomol
R	Reverse
%	Porcentagem do total

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismo de ação direta e indireta da radiação ionizante	9
Figura 2 -	Representação esquemática do mecanismo de NER.....	18
Figura 3 -	Metilação da citosina	21
Figura 4 -	Mecanismo de inibição da transcrição gênica através da metilação do DNA	22
Figura 5 -	Estrutura da cromatina ativa e inativa na região promotora do gene	23
Figura 6 -	Polimorfismo ERCC1 (G19007A).....	46
Figura 7 -	Metilação do gene ERCC1	47
Figura 8 -	Expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1 no parênquima neoplásico maligno localizada no fronte de invasão do CECP.....	48
Figura 9 -	Fluxograma mostrando o desfecho dos pacientes incluídos na análise de sobrevida	51
Figura 10 -	Sobrevida global dos 79 pacientes, estimada pelo método de Kaplan-Meier.....	52
Figura 11 -	Análise da sobrevida global dos pacientes de acordo com o tamanho do tumor (T). Estimado pelo método de Kaplan-Meyer	54
Figura 12 -	Análise da sobrevida global dos pacientes de acordo com a presença de linfonodos regionais acometidos (N+). Estimado pelo método de Kaplan-Meier	55
Figura 13 -	Análise da sobrevida global dos pacientes de acordo com a ocorrência de metástases à distância. Estimado pelo método de Kaplan-Meyer.....	56
Figura 14 -	Sobrevida global dos pacientes de acordo com a ocorrência de recidiva locorregional	57

Figura 15 - Sobrevida global de 79 pacientes, de acordo com o genótipo de ERCC1 demonstrado pelo método de Kaplan-Meier	58
Figura 16 - Sobrevida global de 79 pacientes, de acordo com o genótipo de ERCC1 agrupados conforme a presença do alelo A	59
Figura 17 - Gráfico da sobrevida global dos pacientes de acordo com o status da metilação de ERCC1, estimado pelo método de Kaplan-Meier.....	60
Figura 18 - Gráfico de sobrevida global de 79 pacientes de acordo com a expressão de ERCC1, estimado pelo método de Kaplan-Meier	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes de acordo com as variáveis epidemiológicas, clínicas e morfológicas.....	36
Tabela 2 - Primers utilizados para análise do polimorfismo G19007A de ERCC1	37
Tabela 3 - Primers utilizados para análise da metilação do gene ERCC1.....	39
Tabela 4 - Análise da associação entre os achados moleculares do gene ERCC1 (polimorfismo, status de metilação e expressão imunoistoquímica) investigados.....	44
Tabela 5 - Associação entre variáveis epidemiológicas, clínicas e morfológicas e os achados moleculares do polimorfismo, do status de metilação e da expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1.	45
Tabela 6 - Associação entre <i>Status</i> da Metilação de ERCC1 e variáveis clínico-epidemiológicas.....	49
Tabela 7 - Associação entre Expressão de ERCC1 e variáveis clínico-epidemiológicas e morfológicas.....	50
Tabela 8 - Análise de sobrevida de acordo com as variáveis clínico-morfológicas, epidemiológicas e moleculares desse estudo.	53
Tabela 9 - Características clínico-morfológicas e moleculares como variáveis prognósticas. Sobrevida global estimada pelo método de Kaplan-Meier.	62

RESUMO

Lima LMC. *Imunolocalização, metilação e polimorfismo do gene ERCC1 em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço: correlação com parâmetros clínicos, controle locorregional e sobrevida* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2011. 99p.

INTRODUÇÃO: O valor prognóstico dos marcadores biológicos tumorais relacionados ao câncer tem sido vastamente pesquisado. O gene de reparo ERCC1 (“Excision Repair Cross Complementation Group 1”) está envolvido na resistência individual à cisplatina. O objetivo deste trabalho é avaliar o valor prognóstico do polimorfismo G19007A de ERCC1, da metilação desse gene, e da expressão imunoistoquímica de sua proteína em pacientes portadores de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) submetidos à radioterapia. **PACIENTES E MÉTODOS:** Trata-se de um estudo retrospectivo envolvendo a análise de dados de 84 pacientes portadores de CECP, operados e submetidos à radioterapia adjuvante. Foram elegíveis pacientes com tumores de cavidade oral, orofaringe, hipofaringe ou laringe, que não apresentavam metástases à distância ou sinais de recidiva da doença e que não foram submetidos à quimioterapia. O polimorfismo do gene ERCC1 (G19007A) foi avaliado pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) a partir do DNA genômico extraído de tecido tumoral desses pacientes. A metilação do gene ERCC1 foi realizada por MSP-PCR (“Methylation-specific PCR”), com primers específicos para presença ou ausência de metilação do ERCC1. A expressão da proteína ERCC1 foi avaliada por técnica de imunoistoquímica. Foi utilizado um corte de 30% de células marcadas para classificação em baixa e alta expressão. **RESULTADOS:** 84 pacientes com idade mediana de 60 anos, numa proporção homem/mulher de 5:1 e 75 (89,5%) em estádios III ou IV. O genótipo GG ocorreu em 17 (20,2%) dos pacientes, o genótipo GA foi observado em 24 (28,6%), e o genótipo AA em 43 (51,2%) dos casos. A variante A para o gene ERCC1 foi observada em 79,8% das amostras, 43 (51,2%) pacientes apresentaram status metilado do ERCC1 e 70 (83,3%) pacientes apresentaram alta expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1.

Observou-se uma tendência de associação entre o polimorfismo de ERCC1 e a idade dos pacientes ($p = 0,059$). O status metilado do gene ERCC1 foi superior nas amostras de CECP de pacientes que não apresentaram metástases à distância (OR = 6,67; IC: 1,40–33,33; $p = 0,019$). Pacientes com mais de 45 anos apresentaram uma maior prevalência de amostras de CECP com alta expressão imunoistoquímica (OR = 4,86; IC95%: 1,2–19,7; $p = 0,027$), assim como pacientes com TNM avançado (OR = 5,04; IC95%: 1,07–23,7; $p = 0,041$). A sobrevida global mediana foi de 30 meses. Os pacientes com alta expressão de ERCC1 apresentaram sobrevida predominantemente inferior ($p = 0,089$). A análise multivariada demonstrou associação significativa da sobrevida com as variáveis T (OR = 2,87; IC95%: 1,38 – 5,97; $p = 0,005$), N (OR = 1,84; IC95%: 1,01–3,31; $p = 0,044$) e M (OR = 3,39; IC95%: 1,64–7,00; $p = 0,001$), mas não com o grupo de indivíduos não-metilados, que apresentou uma sobrevida global predominantemente superior (OR = 1,66; IC95%: 0,95–2,89; $p = 0,073$). **CONCLUSÃO:** A metilação e alta expressão de ERCC1 foram associadas à pior sobrevida, sem, no entanto, alcançar significância estatística. Indivíduos com mais de 45 anos apresentaram maior prevalência da variante alélica A no genótipo de ERCC1. O status metilado foi mais frequente em pacientes que não desenvolveram metástases à distância, assim como em indivíduos com doença avançada (III/IV). Houve associação entre a expressão de ERCC1 e o estadiamento da doença, revelando uma maior expressão de ERCC1 em pacientes com TNM avançado. Foram identificados como fatores independentes correlacionados à sobrevida, o T, N e M individualmente.

Descritores: 1.Neoplasias de cabeça e pescoço 2.Carcinoma espinocelular 3.Reparo do DNA 4.Metilação 5.Polimorfismo genético 6.Imunoistoquímica 7.Radioterapia adjuvante.

ABSTRACT

Lima, LMC. *Immunolocalization, methylation, and polymorphism of ERCC1 gene in squamous cell carcinoma of the head and neck: correlation with clinical parameters, locoregional control and survival* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2011. 99p

INTRODUCTION: The prognostic value of tumor biomarkers related to cancer has been extensively studied. The repair gene ERCC1 (Excision Repair Cross Complementation Group 1) is involved in individual resistance to cisplatin. The aim of this study was to evaluate the prognostic value of ERCC1 G19007A polymorphism, methylation, and immunohistochemical expression of its protein in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) submitted to radiotherapy. **PATIENTS AND METHODS:** This is a retrospective study involving data analysis of 84 patients with HNSCC, who underwent surgery and adjuvant radiotherapy. Patients with oral cavity, oropharynx, hypopharynx and laryngeal tumors with no distant metastases or signs of disease recurrence and who did not receive chemotherapy were considered eligible for the study. The ERCC1 gene polymorphism (G19007A) was assessed by PCR (polymerase chain reaction) from genomic DNA extracted from the tumor tissue of these patients. Methylation of ERCC1 gene was performed by PCR-MSP (Methylation-specific PCR) using specific primers for the presence or absence of methylation of ERCC1. ERCC1 protein expression was assessed by immunohistochemistry. A cut-off of 30% of stained cells for the classification of low and high protein expression was used. **RESULTS:** 84 patients with median age of 60 years, a male/female ratio of 5:1 and 75 (89,5%) in stages III or IV. The GG genotype occurred in 17 (20.2%) patients, the GA genotype was observed in 24 (28.6%), and the AA genotype in 43 (51.2%) cases. The A variant of the ERCC1 gene was observed in 79.8% of the samples, methylated status in 43 (51.2%) patients, and 70 (83.3%) showed high immunohistochemical expression of ERCC1 protein. There was a trend for association between polymorphism of ERCC1 and patient age ($p = 0.059$). The methylated status of the ERCC1 gene was higher in samples of HNSCC patients who did not present distant metastasis (OR = 6.67, CI: 1.40-33.33, $p =$

0.019). Patients with more than 45 years presented a higher prevalence of HNSCC samples with high immunohistochemical expression (OR = 4.86, 95% CI 1.2-19.7, $p = 0.027$), as did patients with advanced TNM (OR = 5.04, 95% CI 1.07-23.7, $p = 0.041$). The median overall survival was 30 months. Survival was predominantly lower in patients with high expression of ERCC1 ($p = 0.089$). Multivariate analysis demonstrated significant association of survival with the variables T (OR = 2.87, 95% CI: 1.38-5.97, $p = 0.005$), N (OR = 1.84, 95% CI 1:01-3:31, $p = 0.044$) and M (OR = 3.39 95% CI: 1.64-7.00, $p = 0.001$), but not with the group of non-methylated individuals who presented a predominantly higher overall survival (OR = 1.66, 95% CI 0.95-2.89, $p = 0.073$).

CONCLUSIONS: Methylation and high expression of ERCC1 were associated with a lower survival, not reaching, however, statistical significance. Patients with more than 45 years had a higher prevalence of the A variant in the genotype of ERCC1. Methylated status was more frequent in patients who did not evolve with distant metastases, as well as individuals with advanced disease (III/IV). There was an association between the expression of ERCC1 and clinical staging, revealing a higher expression of ERCC1 in patients with advanced TNM. T, N and M individually were identified as independent factors correlated with survival.

Descriptors: 1.Head and neck neoplasms 2.Squamous cell carcinoma 3.DNA repair 4.Methylation 5.Polymorphism, genetic 6.Immunohistochemistry 7.Radiotherapy, adjuvant.

1 INTRODUÇÃO

O valor prognóstico dos marcadores biológicos tumorais relacionados ao câncer tem sido vastamente pesquisado, destacando-se a investigação de marcadores de proliferação celular, oncoproteínas, protooncogenes, genes supressores de tumor e, mais recentemente, genes envolvidos em modificações epigenéticas.

A influência da expressão da proteína de reparo do DNA ERCC1 (*Excision Repair Cross Complementation Group 1*) na resistência que determinados pacientes apresentam à quimioterapia baseada em cisplatina parece estar bem estabelecida em algumas neoplasias. No entanto, não está claro se existe correlação entre a expressão gênica de ERCC1, bem como o polimorfismo e o status da metilação da região promotora desse gene, com as características clínicas e morfo-funcionais das neoplasias de cabeça e pescoço que acometem pacientes submetidos à radioterapia. Esse entendimento poderia contribuir para o estabelecimento de um paralelo entre o valor prognóstico de ERCC1 e a resistência tumoral em pacientes submetidos aos tratamentos que utilizam radiação ionizante.

Evidências clínicas, muitas vezes, não são suficientes para predizer a resposta ao tratamento do câncer. Diversas pesquisas vêm sendo realizadas na busca de se obter um maior entendimento a respeito da biologia e do comportamento da doença, sobretudo, no intuito de conhecer novos fatores prognósticos que poderiam ser utilizados nas decisões terapêuticas e na predição de respostas às diversas modalidades de terapia oncológica (Tan e Ogden, 1997; Kannan et al., 1998; Tsuchiya et al., 2001; Shen et al., 2002; Grabenbauer et al., 2003). Resolvemos,

portanto, estudar o valor prognóstico da metilação e do polimorfismo GA do gene ERCC1, bem como da expressão imunoistoquímica de sua proteína em indivíduos portadores de CECP submetidos ao tratamento cirúrgico seguido de radioterapia como único tratamento adjuvante.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia e etiopatogênese do carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP)

Importante causa de doença e morte no Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos por causa conhecida notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade do Ministério da Saúde (INCa, 2010). As estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCa) para o ano de 2010 apontaram para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer no Brasil, dos quais 236.240 deveriam acometer indivíduos do sexo masculino e 253.030 do sexo feminino.

Câncer de cabeça e pescoço é um termo coletivo, definido em bases anátomo-morfológicas, utilizado para descrever tumores malignos do trato aerodigestivo superior. O carcinoma epidermoide é o tipo histológico mais comum nesse território, excluindo-se os tumores cutâneos (Wressmann et al., 2004) e corresponde aos tumores malignos originados em seios paranasais, cavidade nasal, cavidade oral, faringe e laringe (INCa, 2010).

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) compreende cerca de 6% de todas as neoplasias malignas (Koskinen et al., 2006) e constitui a quinta causa de câncer no mundo, com uma incidência global anual de 780 mil novos casos (Lemaire et al., 2003).

Cerca de 40% das neoplasias de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade oral, 15% na faringe, 25% na laringe (Döbrossy, 2005; Argiris et al., 2008). O principal subgrupo dos CECP refere-se ao câncer de cavidade oral, acometendo lábio, língua, gengiva, soalho oral e palato. Somente esses tumores são responsáveis por cerca de 18.000 casos de câncer a cada ano no Brasil, dos quais, 8.000 resultam em óbitos pela doença (INCa, 2010).

Observa-se que o CECP ocorre com maior frequência em indivíduos do gênero masculino na proporção de 4:1. A maior frequência dos casos depende de sua distribuição geográfica. No Brasil, tais neoplasias são mais comuns no sul e sudeste (Wunsch-Filho, 2002). Somente no estado de Minas Gerais, estimou-se a ocorrência de 1.180 casos novos de câncer da cavidade oral para o ano de 2010 (INCa, 2010).

A faixa etária de maior incidência de casos inicia-se aos 50 anos e aumenta até os 70 anos. Entretanto, tem se observado, no parâmetro mundial, um aumento da incidência de câncer de cabeça e pescoço em faixas etárias cada vez mais precoces, afetando adultos jovens com idade inferior a 45 anos (Myers et al., 2000; Llewellyn et al., 2003; Manuel et al, 2003). Não há um consenso na literatura para a definição da idade limite entre adultos jovens e indivíduos idosos. Sugere-se 45 ou, até mesmo, 40 anos para essa categorização de acordo com a idade. Esse parâmetro etário é amplamente utilizado em medicina para diversas neoplasias e, também, em patologias não neoplásicas. Enfatizando o câncer de cabeça e pescoço, tem sido utilizada a terminologia 'indivíduos clássicos ou típicos' em substituição a indivíduos idosos (Gawecki et al., 2007; De Paula et al, 2009).

Os fatores de risco ligados ao carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço são múltiplos, incluindo, além de fatores genéticos, aqueles relacionados ao meio

ambiente, ao trabalho e aos hábitos de vida, como o tabagismo, o alcoolismo, a dieta pobre em verduras e frutas e a classe social. A associação entre tabagismo e etilismo em câncer de cabeça e pescoço já é bem conhecida. Vários estudos epidemiológicos apontam para o maior risco de desenvolvimento dessas neoplasias em indivíduos fumantes e etilistas (De Stefani et al., 1987; Tuyns, 1990). A dieta rica em gordura também pode elevar o risco, sobretudo, em fumantes (Franco et al., 1989).

É provável que existam outros fatores de risco ligados ao surgimento desses tumores (Shiboski et al., 2005). Um estudo brasileiro identificou um risco excessivo em pacientes com má higiene oral e dentes em péssimo estado de conservação (Franco et al., 1989), apontando que a má higiene oral é um fator de risco reconhecido na etiologia do câncer de cabeça e pescoço.

O papiloma vírus humano (HPV) tem sido descrito como um dos fatores etiológicos do câncer de boca, orofaringe e laringe. Em uma metanálise sistemática de 60 estudos que incluíram 5046 pacientes portadores de CECP, ficou demonstrada uma prevalência global do HPV em 26% dos pacientes. A presença do HPV foi identificada em 36% dos tumores de orofaringe, em 24% dos tumores de cavidade oral e em 24% das neoplasias de laringe. O HPV 16 foi o subtipo mais comum, ocorrendo em 87% dos tumores de orofaringe e em 68% das neoplasias da cavidade oral (Kreimer et al., 2005). Conforme demonstrado em uma série de análises retrospectivas, os pacientes com tumores HPV positivos apresentam prognóstico melhor que os demais (Hoffmann et al., 2005; Reimers et al., 2007; O'Sullivan et al., 2010). Especialmente, o subgrupo de pacientes que apresentam hiperexpressão citoplasmática da proteína p16 parece se beneficiar mais do tratamento com radiação ionizante (Gay et al., 2010).

Classicamente, a etiopatogênese do câncer está relacionada a alterações genéticas progressivas (Scully et al., 2000; Toruner et al., 2004). Em CECP, pode-se observar uma relação do prognóstico do câncer de boca e orofaringe com eventos de aberrações cromossômicas em pacientes HPV negativos, denotando um caráter genético no fenômeno da carcinogênese (Smeets et al., 2009). Entretanto, evidências indicam que não somente fatores genéticos, mas também modificações epigenéticas estejam relacionadas à expressão de genes envolvidos no processo de regulação da carcinogênese (Robertson et al., 1999; Mizuno et al., 2001). Parece claro que alterações epigenéticas sejam similarmente relevantes e estejam intrinsecamente associadas à ruptura dos mecanismos de sinalização celular relacionados à carcinogênese (Jones; Baylin, 2002; Herman; Baylin, 2003).

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é portanto, uma doença multifatorial, sendo sua etiopatogênese claramente associada à exposição aos fatores de risco e à susceptibilidade individual, destacando-se as alterações genéticas e epigenéticas (Scully et al. 2000; Toruner et al., 2004).

2.2 Aspectos clínicos e morfológicos do CECP

Para o estadiamento clínico de todas as formas de carcinoma, é recomendada a classificação do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC, 2010), que está na sua sétima edição e é baseada em três eventos significativos da história natural do câncer – crescimento tumoral (T), disseminação para linfonodos regionais (N) e metástases à distância (M). Em tumores da região da cabeça e pescoço, a avaliação do tumor primário e da região cervical baseia-se no exame clínico (inspeção e palpação) dessa região. Estudos complementares podem incluir

tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (RM) e fibroscopia. Estes oferecem uma estimativa radiológica da profundidade da extensão tecidual e do envolvimento dos linfonodos regionais, geralmente mais acurada do que a avaliação clínica isoladamente. A fibroscopia permite o diagnóstico de lesões iniciais, ainda superficiais, que muitas vezes não são detectáveis por exames de imagem (tomografia computadorizada ou ressonância magnética). É utilizada também na caracterização da mobilidade das pregas vocais. A fixação das cordas vocais é tradicionalmente reconhecida como um fator prognóstico negativo, sendo este um dos principais critérios utilizados na diferenciação entre lesões precoces e avançadas da laringe (Kirchner e Som, 1971).

O estadiamento da doença em CECP é considerado um dos principais fatores prognósticos para a predição do controle locorregional e da sobrevida dos pacientes acometidos. Vários trabalhos na literatura conseguiram demonstrar a relação do tamanho da lesão, bem como da presença de metástases ganglionares cervicais com a sobrevida dos pacientes e com o índice de recidiva locorregional da doença (Beenken et al., 1999; Kowalski et al., 2000; Tankéré et al., 2000; Denis et al., 2001).

O sistema de gradação morfológica da Organização Mundial da Saúde (OMS) avalia a análise morfológica de todo o tecido neoplásico, considerando o grau de diferenciação das células malignas através da observação de áreas ceratinizadas ou de disceratose (Leon Barnes et al., 2005).

Em neoplasias primárias da cavidade oral, o padrão histológico da lesão tem sido frequentemente relacionado ao prognóstico da doença. Demonstrou-se, em pacientes portadores de carcinoma de língua oral, que o grau de diferenciação celular, o polimorfismo nuclear e a profundidade da invasão estavam relacionados à presença de metástases ganglionares locorregionais, sendo a profundidade da

invasão tecidual, o principal indicador de risco nesse grupo de pacientes (Byers et al., 1998).

2.3 Mecanismos de resposta celular à radiação ionizante e o papel da radioterapia no tratamento adjuvante do câncer de cabeça e pescoço

Quando aplicada aos tecidos, a radiação interage por mecanismo direto ou indireto. No mecanismo direto, a interação acontece com os próprios alvos intracelulares, componentes proteicos e lipídicos do DNA (ionização do DNA), provocando alterações estruturais que respondem por 30% do efeito biológico. Este é o processo dominante de interação das radiações de alto LET (transferência linear de energia), tais como neutrons e partículas- α . Alternativamente, a radiação pode interagir indiretamente com outros átomos ou moléculas na célula (particularmente a molécula de água), produzindo radicais livres aptos a danificar alvos críticos intracelulares. Esse último mecanismo é responsável por 70% dos danos, devido ao fato de a molécula de água ocupar parcela substancial da composição celular. O principal radical livre resultante dessa interação é a hidroxila (OH), que pode se recombinar com outros radicais livres ou reagir com moléculas orgânicas (Figura 1) (Hall e Giaccia, 2006). Para raios X e gama, cerca de 70% dos danos ocorrem por mecanismo indireto, dependentes de oxigênio e vulneráveis à ação de vários agentes químicos.

Aberrações cromossômicas e letalidade celular parecem resultar da interação dessas lesões (*single e double strand breaks do DNA*), levando a um modelo linear-quadrático de sobrevida celular:

Figura 1 – Mecanismo de ação direta e indireta da radiação ionizante.
Fonte: Hall e Giaccia, 2006

O modelo linear quadrático, conforme o qual a curva de sobrevivência para um determinado tipo de célula possui um componente linear (dano letal – parâmetro alfa) e outro quadrático (dano potencialmente letal – parâmetro beta), representa um dos modelos radiobiológicos de morte celular mais aceitos atualmente.

O ponto de concordância entre as duas curvas de morte celular resulta na relação alfa-beta para o grupo de células em questão. Quando irradiados, tecidos com alfa-beta elevado têm predisposição para manifestar efeitos agudos, como dermatites, mucosites e eritemas. Nesses tecidos, observa-se que a taxa de reparo é superada pelo índice que representa a taxa de divisão mitótica das células. Já, para os tecidos com alfa-beta baixo, os efeitos tardios (fibroses, mielopatias,

telangiectasia, neuropatias) têm maior probabilidade de ocorrência (Peacock et al., 1997).

Fowler (1989) introduziu o conceito de dose biológica efetiva (BED) baseado no modelo linear quadrático de sobrevivência celular. Esta formulação, representada pela equação 1, leva em conta parâmetros como dose total, dose por fração e a relação alfa-beta do tecido e permite a definição de esquemas de fracionamentos diferentes assegurando-se o isoefeito aos tecidos irradiados.

$$DBE = D \times \left[1 + \frac{d}{\left(\frac{\alpha}{\beta} \right)} \right] \quad (1)$$

Onde: D = dose total
d = dose por fração

Com base em estudos laboratoriais envolvendo culturas de células normais e neoplásicas, foram estabelecidos princípios básicos de radiobiologia, que incluem:

- 1) Curva de sobrevivência celular para radiação ionizante escassa e densa;
- 2) Curvas de dose-resposta para tecidos de resposta aguda e tardia;
- 3) Curvas de resposta celular em função da qualidade da radiação - relação entre efeito radiobiológico (BE) e transferência linear de energia (LET);
- 4) A variação da radiosensibilidade tecidual em função da fase do ciclo celular (do inglês *age-response function*);
- 5) Fracionamento. O reparo do dano sub-letal e do dano potencialmente letal e a taxa de dose efetiva;

- 6) O efeito da presença ou ausência da molécula de oxigênio na resposta à radiação, bem como de fatores químicos radioprotetores e radiosensibilizantes;
- 7) A cinética das células, tecidos normais e neoplásicos, o ciclo celular, fator de crescimento, fator de perda celular, e a reoxigenação.

Esses princípios permitem o entendimento retrospectivo dos protocolos de radioterapia convencional desenvolvidos empiricamente, e nos permitem apreciar a importância do intervalo entre as frações (fracionamento) e do prolongamento do tempo total de radioterapia (Hall, 1991). A divisão do tratamento em muitas frações reduz a efetividade biológica devido ao reparo dos danos subletais, tanto nos tecidos normais, quanto nos tumores. No entanto, o fracionamento permite a reoxigenação tecidual, aumentando a efetividade radiobiológica total à medida em que alcança diversas fases do ciclo celular caracterizadas por radiosensibilidades distintas. A hipóxia tecidual é considerada um fator de radiorresistência celular (Hall, 1990). Ainda no que diz respeito à letalidade celular, a radiação ionizante pode induzir à malignidade, devido à ativação de oncogenes ou à deleção de genes supressores de tumor. Este constitui fenômeno estocástico de grande importância em proteção radiológica (Hall, 1991).

A radioterapia representa uma das mais importantes modalidades terapêuticas para o controle do CECP. Tradicionalmente, essa abordagem é feita de maneira multidisciplinar e inclui, em grande parte dos casos, associações de cirurgia, radioterapia e quimioterapia.

Durante os últimos anos, vários esquemas de fracionamento de radioterapia ou combinações de tratamentos rádio e quimioterápicos foram testados, na tentativa de se obterem melhores taxas de controle local, mantendo-se a integridade

anatômica e funcional das estruturas envolvidas (Fu et al., 2000; Adelstein et al., 2003; Brizel et al., 1998).

Como tratamento adjuvante, classicamente, a radioterapia é empregada após ressecções cirúrgicas radicais com intenção curativa, especialmente para os casos de doença localmente avançada. Mesmo em neoplasias iniciais, é frequente a utilização da radioterapia com a intenção de reduzir as taxas de falha local e regional, quando existem fatores adversos favoráveis à recidiva (margens positivas ou exúguas e infiltração perineural) (Cooper, 2003).

Nos últimos anos, vários trabalhos têm demonstrado o benefício da quimioterapia associada à radioterapia em pacientes portadores de CECP que apresentam fatores de alto risco. O *Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) trial 9501* e o *European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) trial 22931* demonstraram evidências do benefício da quimioterapia adjuvante associada à radioterapia nesse grupo de pacientes. No entanto, observou-se um aumento importante da toxicidade do tratamento combinado (Cooper et al., 2004; Bernier et al., 2004), elevando significativamente o risco de complicações graves em alguns pacientes.

Nos primeiros três anos após o tratamento, observa-se uma elevada incidência de recidivas da doença, principalmente locais e regionais (Boysen, 1985; Cooney e Poulsen, 1999). Elas são as principais causas de falha no tratamento de pacientes com CECP (Kowalski, 2002; Carvalho, 2003). Depois do terceiro ano, o aparecimento de um segundo tumor primário (STP) torna-se uma causa importante de morbimortalidade (Vikram, 1984; Sturgis e Miller, 1995). Warren e Gates, (1932) realizam uma grande revisão de várias séries de casos de neoplasias primárias múltiplas e apresentaram 1.078 autópsias, quando identificaram 40 casos (3,7%) de

tumores múltiplos. Nesse estudo os autores propuseram e utilizaram os seguintes critérios para a identificação de neoplasias primárias múltiplas: a confirmação diagnóstica de malignidade para os tumores, a distinção entre eles e a exclusão da possibilidade de um tumor ser metástase do outro.

O mecanismo responsável pelas respostas individuais às diversas modalidades de tratamento oncológico não está bem estabelecido. A expressão do gene de reparo do DNA ERCC1 tem se mostrado como potencial marcador preditivo de resposta à quimioterapia baseada em cisplatina em pacientes portadores de neoplasias de pulmão de células não pequenas (Olaussen et al., 2006), câncer de ovário (Darcy et al., 2007), câncer gástrico (Kwon et al., 2007), câncer colorretal (Stoehlmacher et al., 2004) e câncer de esôfago (Kim et al., 2008). Tais evidências apontam que a alta expressão de ERCC1 esteja associada com pior resposta à quimioterapia baseada em cisplatina.

A maioria dos estudos envolvendo o polimorfismo genético tem avaliado a susceptibilidade ao câncer ou a resposta dos pacientes aos esquemas quimioterápicos baseados em cisplatina. Apesar de todas as evidências do envolvimento de ERCC1 no reparo aos danos inespecíficos ao DNA, não está claro se existe uma correlação com a resposta à radioterapia, especialmente em pacientes não submetidos à quimioterapia à base de cisplatina como tratamento primário. Da mesma forma, poucos trabalhos foram direcionados à avaliação do status da metilação da região promotora de ERCC1 em pacientes portadores de CECP. Por favorecer o silenciamento gênico, o fenômeno epigenético da metilação de ERCC1 poderia explicar as diferentes respostas à radioterapia nesse grupo de pacientes.

2.4 Mecanismos de Reparo do DNA

Entende-se por reparo, a capacidade da maquinaria celular de corrigir os erros causados ao material genético. Os principais mecanismos celulares conhecidos de proteção e manutenção da integridade do DNA em mamíferos são: o reparo por excisão de bases (BER), o reparo por excisão de nucleotídeos (NER), o reparo de bases mal pareadas (MMR), o reparo por recombinação homóloga (HR) e o reparo por recombinação não homóloga (NHEJ). Tendo em vista a diversidade de tipos de lesões, nenhum dos mecanismos, agindo isoladamente, seria suficiente para repará-las. Consequentemente, falhas nesses mecanismos de reparo elevam o risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer. Postula-se que nas células tumorais tratadas com cisplatina, a função danificada de NER/BER levaria a uma maior quantidade de danos ao DNA e assim, à morte das células tumorais (Shellard et al., 1993; Bosken et al., 2002).

O reparo por excisão de nucleotídeos é um dos mais importantes processos de reparo e tem sido intensamente estudado devido a sua versatilidade em operar principalmente, em danos que provocam distorção da hélice e interferência no pareamento de bases, obstruindo a transcrição e a replicação normais (Hoeijmakers, 2001). Além de apresentar importante papel no reparo por excisão de nucleotídeos, a proteína ERCC1 também pode desempenhar outras funções de reparo em diferentes tipos de danos do DNA, notadamente no mecanismo de recombinação, em que está envolvida no reparo de quebras de fita dupla de DNA (Sargent et al., 2000).

2.5 O gene de reparo do DNA ERCC1

O mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é uma importante via pela qual são removidos diversos danos ao DNA. NER direciona-se às lesões que distorcem a hélice e interferem no pareamento de bases, geralmente obstruindo a transcrição e a replicação normais (Lehmann, 2003). Esse mecanismo de reparo subdivide-se em dois sub-mecanismos. O reparo genômico global (GGR), responsável por remover lesões em ambas as fitas do genoma, e o reparo acoplado à transcrição, (TCR), cuja função é remover danos na fita transcrita do DNA (Mu et al., 1995; Ford, 2005).

As lesões processadas por NER incluem alterações induzidas por agentes endógenos e exógenos, tais como fotoprodutos da radiação ultravioleta e os adutos formados no DNA por produtos químicos como hidrocarbonetos aromáticos e cisplatina (Chipchase e Melton, 2002; Gillet e Schärer, 2006; Clingen et al., 2007). A deficiência do processo de reparo dessas lesões resulta em quadros diversos de instabilidade genética, muitas vezes vulneráveis às alterações neoplásicas (Friedberg e Meira, 2006). Sabe-se que a deficiência de NER leva a uma síndrome clássica de fotossensibilidade denominada xeroderma pigmentoso (XP), caracterizada pela alta incidência de câncer de pele induzido pelos raios ultra-violeta (UV) (Cleaver, 1968).

O gene ERCC1 constitui um importante componente dos genes de reparo do DNA. Foi o primeiro gene clonado que age predominantemente nas vias de reparo por excisão de nucleotídeos. Localiza-se no cromossomo 19q13.2-q13.3 e sua região codificadora apresenta 1,1 Kb e 10 éxons. A região que corresponde ao éxon 8 parece expressar a função de incisão da região alterada do DNA

(Hoeijmakers, 1987; Drapkin et al., 1994; Yu et al., 1997). ERCC1 posiciona a endonuclease XPC, que catalisa a incisão do DNA na porção 5' da fita lesionada, ao passo que XPG catalisa a incisão da extremidade 3'. O domínio central da proteína ERCC1 apresenta sítios de ligação para DNA de fita simples e de fita dupla, bem como um sítio de ligação para a proteína XPA. A ligação à XPA é importante para promover um elo entre a maquinaria de reparo e XPF. A ligação ERCC1/XPF é efetuada pelos domínios C-terminal de ambas as proteínas. As duas subunidades ERCC1 e XPF são instáveis em estado dissociado, sendo a organização dimérica crítica para a estabilidade e a atividade catalítica XPF (Tripsianes et al., 2005; Tsodikov et al., 2005). Após a incisão da fita, as DNA polimerases δ e ϵ removem os nucleotídeos e ressintetizam o DNA usando a fita não danificada como molde. A DNA ligase liga as extremidades à sequência original. (Figura 2) (Moser et al., 2007).

Além do reparo por NER, existem evidências de que o complexo ERCC1-XPF atue também no reparo por recombinação homóloga e não homóloga (Sargent et al., 1997; Pâques; Haber, 1999; Adair et al., 2000; Sargent et al. 2000), demonstrando um papel dual de ERCC1 no reparo dos danos do DNA. Esse envolvimento do ERCC1 nos mecanismos de reparo por recombinação, explicaria porque células deficientes em ERCC1 e XPF têm menores taxas de troca nas regiões de quebra das fitas de DNA que os tipos selvagens.

A formação de aberrações em linhagens de células NER-deficientes já foi previamente estudada, demonstrando-se que células 43-3B ERCC1-deficientes apresentam maior incidência (cerca de quatro vezes) de aberrações cromossômicas espontâneas (Darroudi e Natarajan, 1985). Outros estudos mostram que células NER-deficientes possuem níveis aumentados de aberrações cromossômicas em relação ao tipo selvagem (Palitti et al., 1983; Proietti De Santis et al., 2001).

Enquanto a reduzida expressão de ERCC1 tem sido associada ao risco aumentado de câncer (Wang et al., 2007), a elevada expressão dessa proteína associa-se à pior resposta ao tratamento quimioterápico e à pior sobrevida nesse grupo de indivíduos (Handra-Luca et al., 2007; Ota et al., 2009).

O processo de reparo do DNA danificado parece ser crítico para a resistência celular às drogas e, conseqüentemente para a sobrevida dos indivíduos afetados (Rosell et al., 2002; Jun et al., 2008). Vários estudos epidemiológicos demonstram associações entre genes de reparo e o risco de desenvolvimento de câncer, mas uma relação de causalidade não pode ser estabelecida. Portanto, a baixa expressão de ERCC1 observada em um paciente com câncer pode ser causa ou consequência do mesmo (Gossage e Madhusudan, 2007). Pode-se inferir que pacientes com graus variáveis de expressão de ERCC1 apresentam diferentes respostas à radiação ionizante (Goyal et al., 2010).

Em recente estudo realizado com pacientes portadores de neoplasias iniciais de cabeça e pescoço, demonstrou-se a influência do polimorfismo do ERCC1 na resposta à radioterapia nesses pacientes, traduzindo um papel do ERCC1 também no reparo dos danos induzidos por radiação ionizante (Carles et al., 2006). Mesmo diante de algumas evidências do envolvimento de ERCC1 no reparo dos danos induzidos por radiação, não está bem estabelecido se existe uma correlação do polimorfismo de ERCC1, da expressão de sua proteína e, sobretudo, do status da metilação da região promotora desse gene com a resposta à radioterapia e com a sobrevida dos pacientes.

Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de NER
 Fonte: Adaptado de Hoeijtmakers et al., 2001

2.6 Metilação do DNA

As modificações epigenéticas são processos que podem alterar a expressão gênica, sem contudo, modificar a sequência dos nucleotídeos. Essas modificações podem ser herdadas pelo genoma durante a divisão celular. Por não alterarem a sequência do DNA, os fenômenos epigenéticos são considerados potencialmente reversíveis (Momparker, 2003; Feinberg, 2004). Essas características tornam as alterações epigenéticas alvos atrativos para o estudo de intervenções terapêuticas em relação ao câncer (Ducasse e Brown, 2006).

Metilação do DNA e deacetilação de histonas correspondem às principais modificações epigenéticas em humanos (Teodoridis et al., 2004). Metilações aberrantes podem exercer papel fundamental no desenvolvimento de vários tipos de câncer através de mecanismos de silenciamento gênico (Goto et al., 2009; Vasilatos et al., 2009; Tanemura et al., 2009, Vaissière et al., 2009).

A adição do radical metil (CH₃) às regiões específicas do DNA contendo predominantemente nucleotídeos citosina denomina-se metilação. Esse mecanismo constitui um dos principais eventos epigenéticos no DNA humano e exerce funções importantes no controle da atividade gênica, no desenvolvimento embrionário, na inativação do cromossomo-X e na regulação de genes envolvidos no controle do ciclo celular, tais como genes de reparo do DNA e apoptose (Esteller, 2002). Esses fenômenos envolvem tanto a perda, quanto a adição de radicais metil ao DNA, bem como alterações do padrão das histonas.

As histonas funcionam como a matriz na qual o DNA se enrola, tendo um papel importante na regulação dos genes (Jones e Baylin, 2002). A sua estrutura é muito conservada entre os organismos eucarióticos, e os nucleossomos sempre se

apresentam como um octâmero com duas unidades das histonas H2A, H2B, H3 e H4. O DNA dá voltas ao redor do octâmero para atingir seu primeiro nível de compactação (Griffiths et al., 1996).

Em 1948, foi descoberta a 5'-metil-citosina (Weissbach, 1993), que corresponde a uma citosina metilada, ou seja, que possui um grupamento metil adicionado na posição 5 do anel pirimidínico. Porém, nem toda citosina presente no genoma pode ser metilada. Para que ocorra o processo de metilação, é necessário que a citosina esteja na sequência 5'-CG-3', conhecido como dinucleotídeo CpG, em que se observa um nucleotídeo citosina seguido pela guanina, unidos entre si por uma ligação fosfodiéster (Singal e Ginder, 1999).

Os dinucleotídeos CpG estão distribuídos heterogeneamente no genoma, encontrando-se principalmente em regiões de DNA altamente repetitivo e de heterocromatina (Fazzari e Greally, 2004), e na maioria das vezes, cerca de 80% estão altamente metilados. No entanto, existem regiões no genoma ricas em CpG que normalmente não estão metiladas ou o estão em baixa frequência. Trata-se de pequenas regiões do DNA variando entre 0,5 a 5 Kb, ocorrendo em média a cada 100 Kb, conhecidas como ilhas CpG. Normalmente, são encontradas nas extremidades 5' dos genes, em geral, na região promotora, podendo se estender para o interior do primeiro éxon. Entretanto, nem todas as ilhas CpG localizam-se na região promotora do gene. Algumas podem ser encontradas no interior dos éxons e íntrons (Rush; Plass, 2002).

Embora os principais determinantes moleculares das alterações da cromatina de células tumorais ainda não estejam totalmente elucidados, parece evidente que a repressão transcricional de genes supressores de tumor esteja associada à metilação anormal do DNA. Na grande maioria das vezes, a metilação ocorre em

regiões promotoras e éxons, onde há presença de dinucleotídeos CpG (Razin, 1998; Esteller, 2002; French et al., 2002; Herman e Baylin, 2003). Resíduos de citosinas no DNA são convertidos em 5'-metil-citosina pela ação de enzimas denominadas metiltransferases (DNMTs). O grupo metil é doado à S-adenosil-metionina (SAM), que é então convertida em S-adenosil-hocisteína (SAH) (Figura 3) (Grønbaek et al., 2007).

Figura 3 - Metilação da citosina.

Legenda: DNMT: metiltransferases; SAM: S-adenosil-metionina;
SAH: S-adenosil-homocisteína.

Fonte: Grønbaek et al., 2007

Uma maior frequência de citosinas na região promotora intensifica o processo da metilação, podendo levar a um estado de silenciamento gênico. A CpG metilada pode reprimir a transcrição diretamente pela inibição de fatores de transcrição ligados ao DNA e também, indiretamente, recrutando proteínas que ativam a enzima histona-deacetilase, responsável por possuir complexos repressores do DNA metilado (Figura 4) (Razin, 1998; Jenuwein e Allis, 2001; Esteller, 2002; French et al., 2002).

Figura 4 - Mecanismo de inibição da transcrição gênica através da metilação do DNA.

A: CpG não metilado permite a ligação do DNA a fatores de transcrição (FTs) favorecendo a transcrição gênica.

B: a transcrição é comprometida pela metilação das CpGs, que bloqueia a ligação dos dos FTs ao DNA.

C: mostra o bloqueio da transcrição através da afinidade do DNA metilado a proteínas de ligação ME-CpG que também impedem a ligação de FTs aos promotores.

Fonte: Attwood et al., 2002.

A deacetilação das histonas é um mecanismo responsável por remover grupos acetil, levando ao enovelamento do DNA. Este, uma vez condensado em torno das histonas, compromete a ligação dos fatores de transcrição, podendo, assim, impedir a transcrição gênica. As citosinas metiladas tendem a recrutar histonas deacetilases favorecendo a condensação do DNA (Figura 5) (Nan et al., 1997; Eng et al., 2000; Attwood et al., 2002).

Figura 5 - Estrutura da cromatina ativa e inativa na região promotora do gene

A: a cromatina ativa na transcrição é caracterizada por citosinas não-metiladas e histona terminal acetilada. Lisina 4 na histona H3 é trimetilada.

B: citosinas metiladas que se ligam a domínios protéicos MBDs que atraem histonas deacetilases (HDACs), as quais removem grupos acetil da histona terminal. O DNA se enovela sob a forma de uma estrutura de cromatina “fechada”, carreando o marcador de silenciamento lisina-9 trimetilada da histona 3. Esse mecanismo compromete a transcrição gênica.

Fonte: Grønbaek et al., 2007

O padrão de metilação tem sido correlacionado a vários tipos de câncer, como o de pulmão (Vilmar e Sorensen, 2008), o de cavidade oral (Shaw et al., 2007), e o de cabeça e pescoço (Calmon et al., 2007). Modificações epigenéticas podem ser eventos iniciais da carcinogênese, enquanto as alterações genéticas podem ser a consequência da ruptura de um estado epigenômico. Dessa forma, a

metilação pode estar envolvida tanto na causa como na consequência do processo carcinogênico (French et al., 2002). A hipermetilação, tanto quanto a hipometilação, podem favorecer o fenômeno da carcinogênese (Auerkari, 2006). Essas variações podem resultar em diferentes tipos tumorais, além de influenciarem de maneira significativa o seu prognóstico (Golub et al., 1999).

Estudos têm demonstrado que tanto a hipometilação global do DNA como a hipermetilação regional ocorrem na carcinogênese (Jones; Baylin, 2002), sugerindo que a metilação inadequada possa contribuir para a iniciação e progressão do câncer.

Um maior entendimento dos fatores que influenciam o status da metilação dos genes em células humanas é necessário. Pesquisas têm associado a ocorrência de metilação do DNA à exposição a fatores carcinogênicos do tabaco. Embora não existam evidências precisas da relação entre tabagismo e metilação do DNA, (Hasegawa et al., 2002; Ai et al., 2003), esse fenômeno poderia supostamente favorecer o silenciamento do gene ERCC1, alterando seu padrão de expressão e interferindo nos eventos da sobrevivência dos pacientes submetidos à radioterapia.

ERCC1 está diretamente envolvido no reconhecimento e na excisão de fragmentos danificados do DNA. Está demonstrado que a alta expressão de ERCC1 em tecidos neoplásicos se relaciona à resistência à cisplatina em muitos tipos de câncer (Furuta et al., 2002; Yu et al., 2000). Também parece claro que ERCC1-XPF desenvolve um importante papel na proteção dos mamíferos contra danos celulares induzidos por radiação ionizante, tanto *in vitro* como *in vivo* (Ahmad et al., 2008). Entretanto, não está bem definido se o fenômeno epigenético da metilação de ERCC1 interfere na expressão de sua proteína, especialmente em pacientes portadores de CECP.

Em recente estudo envolvendo gliomas cerebrais, demonstrou-se uma associação entre a metilação da região promotora de ERCC1 e a expressão gênica, bem como, à resistência dessas células à cisplatina (Chen et al., 2010).

O silenciamento gênico de ERCC1 pode estar relacionado ao comportamento tumoral também no CECP, influenciando as respostas celulares à quimio e à radioterapia. Um maior entendimento sobre a influência desse fenômeno na evolução clínica de indivíduos submetidos à radioterapia poderia contribuir para a melhor seleção e condução de estratégias de tratamento oncológico nesse grupo de pacientes.

2.7 Polimorfismos Genéticos

O conceito tradicional de polimorfismo relaciona-se a alterações na carga genética dos indivíduos, ocorrendo em frequência de no mínimo 1% de uma determinada população e resultando em variações de um padrão ainda considerado biologicamente normal, podendo causar ou não, alterações na função da proteína e no fenótipo (Den Dunnen e Antonarakis, 2001).

Um polimorfismo na região promotora poderá alterar a proporção da transcrição de uma determinada proteína. Já, quando localizado na região codificadora ou nos limites intro/exón, pode produzir proteínas incompletas ou inativas, como resultado de um *splicing* incorreto do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm). Polimorfismos genéticos caracterizados por deleções gênicas completas eliminam qualquer atividade funcional da proteína, enquanto polimorfismos genéticos que se associam às duplicações do gene inteiro podem resultar em elevados níveis de atividade (Miller et al., 2001).

As técnicas mais usadas para se detectar a ocorrência de polimorfismos genéticos envolvem os polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) (Botstein et al., 1980), e os polimorfismos genéticos de número variável de repetições em tandem (VNTRs) (Moreti et al., 2001). Os RFLPs correspondem a polimorfismos genéticos de pontos que criam ou destroem sítios de restrição enzima-específicos. Para detecção desse polimorfismo, utiliza-se de enzimas de restrição. Estas têm sequências de reconhecimento específicas no DNA. As alterações da sequência do DNA genômico resultam na criação ou destruição de sítios de clivagem, alterando desse modo, o tamanho de um ou mais fragmentos de DNA oriundos da ação da enzima de restrição (Miller et al., 2001).

Os polimorfismos genéticos por inserção/deleção consistem numa série de comprimentos de fragmentos alélicos, relacionados entre si por um número variável de sequências de DNA repetidas em tandem no intervalo entre dois sítios de restrição. São os VNTRs (Moretti et al., 2001).

Os VNTRs e os RFLPs detectam polimorfismos de forma similar, através da amplificação da região de interesse pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e, se necessário, posterior tratamento com enzimas de restrição que reconhecem sítios específicos e originam fragmentos de DNA com comprimentos variados. Enquanto os RFLPs revelam polimorfismos genéticos devido à presença ou ausência de um sítio de restrição, os VNTRs revelam polimorfismos genéticos devido aos números diferentes de repetições situadas entre os sítios de amplificação (Botstein et al., 1980; Moretti et al., 2001).

Polimorfismos genéticos funcionais em genes de citocinas e outros mediadores inflamatórios que podem confirmar diferenças interindividuais na síntese e secreção dessas proteínas têm sido associados a doenças que apresentam

componentes inflamatórios (Parkhill et al., 2000). Portanto, a investigação e a caracterização dos elementos específicos alterados podem proporcionar biomarcadores aplicáveis em diagnóstico e prognóstico, estimando o risco em indivíduos (Kornman et al., 1997).

2.7.1 Polimorfismo de ERCC1

O gene ERCC1 é altamente polimórfico, apresentando aproximadamente 245 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) (do inglês *single-nucleotide-polymorphism*) (<http://ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Esse tipo específico de polimorfismo representa a forma mais comum de variação genética humana. Quando ocorrem na região promotora do gene, podem afetar a expressão ou a atividade de enzimas e, portanto, estar associado ao risco de câncer (Montgomery et al., 2004; Singal et al., 2005; Liu et al., 2008; De Paula et al., 2009).

A região codificadora de ERCC1 compreende dez éxons. Shen et al. (2002) identificaram polimorfismos de três dos éxons de ERCC1. Todos resultaram em mutações silenciosas com ausência de substituição de aminoácidos.

Os efeitos funcionais dos polimorfismos silenciosos de ERCC1 ainda não estão bem elucidados. No entanto, algumas das variantes alélicas polimórficas do DNA em genes de reparo podem estar associadas à reduzida capacidade de reparo e ao aumento da susceptibilidade ao câncer (Goode et al., 2002)

A ocorrência de polimorfismos no gene ERCC1 tem sido estudada frente ao risco de desenvolvimento de vários tipos de câncer (Sturgis et al. 2002; Yin et al., 2003). Muitos estudos têm focado em dois tipos de polimorfismos. O polimorfismo C8092A pode afetar a estabilidade do DNA e o polimorfismo T19007C pode estar

associado com níveis reduzidos do RNA mensageiro e da proteína (Chen et al., 2000; Yu et al., 2000).

Chen et al. (2000) observaram que o genótipo ERCC18029CC é significativamente associado com o aumento do risco de oligoastrocitomas. Identificou-se também uma associação entre esse genótipo com o aumento do risco de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Em um estudo caso-controle, avaliando o polimorfismo 3'UTR de ERCC1 (ERCC1 8092), comparou-se o genótipo de pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço com o de pacientes livres de câncer. Nesse estudo foi demonstrado que a variante alélica ERCC1 8092A foi menos frequente no grupo caso, bem como o genótipo selvagem homozigótico ERCC1 8092CC, sugerindo para a presença dessa variante, um efeito protetor (Sturgis et al., 2002).

Em contraste com os trabalhos mencionados acima, alguns poucos estudos epidemiológicos em população caucasiana investigaram a associação entre o polimorfismo G19007A de ERCC1 e o câncer, revelando uma associação do alelo A com alguns tipos de neoplasias malignas (Winsey et al., 2000; Tomescu et al., 2001; Yin et al., 2002; Nexø et al., 2003; Yin et al., 2003; Vogel et al., 2004). Não se sabe ao certo qual a influência do polimorfismo alélico de ERCC1 em CECP. Inexistem estudos avaliando a frequência do polimorfismo GA de ERCC1, bem como o seu valor prognóstico nesse grupo de pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo primário

- Verificar o valor prognóstico da metilação e polimorfismo GA do gene ERCC1 e da imunolocalização de sua proteína em indivíduos portadores de CECP submetidos ao tratamento cirúrgico seguido de radioterapia como único tratamento adjuvante.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar se o polimorfismo alélico GA de ERCC1 e o status da metilação deste gene interferem na expressão imunoistoquímica de sua proteína.
- Verificar se o polimorfismo GA do gene ERCC1, o silenciamento gênico promovido pela metilação desse gene e a expressão tecidual da proteína ERCC1 estão associados com fatores clínicos, epidemiológicos e morfológicos (estadiamento clínico, localização do sítio primário, recorrência tumoral locoregional e à distância, aparecimento de segundo tumor primário, idade, gênero, história familiar de câncer e grau tumoral).

- Avaliar se o polimorfismo GA, a metilação do gene ERCC1 e sua expressão imunoistoquímica apresentam impacto na sobrevida do indivíduo portador do CECP.
- Realizar o perfil epidemiológico e clínico-patológico dos indivíduos portadores de CECP submetidos ao tratamento cirúrgico e à radioterapia adjuvante.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo longitudinal, envolvendo a coleta e a análise de dados clínico-epidemiológicos de 84 pacientes portadores de CECP, operados e submetidos à radioterapia adjuvante. Todos os diagnósticos foram confirmados por exames clínico e histopatológico, e os materiais de biópsia foram utilizados nas análises moleculares.

As informações clínicas foram obtidas a partir dos prontuários de pacientes portadores de CECP atendidos na cidade de Montes Claros – Minas Gerais, tanto na rede pública, quanto na rede privada, oriundos dos serviços de Oncologia Clínica, Radioterapia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

4.2 Critérios de elegibilidade

Objetivando a avaliação do comportamento tumoral em portadores de CECP virgens de tratamentos baseados em cisplatina, foram selecionados 116 de 470 pacientes admitidos no período de 12 de agosto de 1999 a 7 de abril de 2006. Tal período antecede a institucionalização dos protocolos de quimioterapia adjuvante

para o tratamento do CECP em nosso meio. Dentre os pacientes selecionados, 84 apresentaram os critérios de elegibilidade e foram objeto deste estudo.

Os pacientes foram submetidos ao tratamento cirúrgico radical seguido de radioterapia adjuvante. Os critérios de indicação da adjuvância foram: margens exíguas ou comprometidas, infiltração perineural ou linfovascular, comprometimento linfonodal, estágio T3/T4. Todos foram tratados com fracionamento padrão de radioterapia (200 cGy/dia), com técnica convencional bidimensional. As doses totais de radiação variaram entre 5.000 cGy e 7.000 cGy. Foram utilizados equipamentos de telecobaltoterapia e acelerador linear de partículas com fótons de energia de 6 MV. Nenhum dos pacientes recebeu quimioterapia adjuvante.

A fim de serem incluídos neste estudo, os pacientes selecionados apresentaram todos os seguintes critérios:

- Comprovação histopatológica de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, com sítio primário comprovado em cavidade oral, orofaringe, hipofaringe ou laringe.
- Pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico radical com intenção curativa.
- Pacientes submetidos à radioterapia como tratamento adjuvante, tendo completado o esquema terapêutico proposto.
- Pacientes com registro de acompanhamento ambulatorial em prontuário médico por período superior a 24 meses após a data de cadastramento (diagnóstico), ou até o óbito.

4.3 Critérios de exclusão

Por não apresentarem características compatíveis com a proposta do estudo, foram excluídos os seguintes indivíduos:

- Pacientes submetidos à quimioterapia à base de platina como tratamento primário (concomitante à radioterapia e ou adjuvante à cirurgia) ou que apresentaram qualquer histórico de tratamento quimioterápico anterior baseado em platina.
- Pacientes portadores de segunda neoplasia maligna ao diagnóstico.
- Pacientes portadores de metástases à distância ao diagnóstico.
- Pacientes que apresentaram recidiva locorregional da doença antes do início da radioterapia adjuvante.
- Pacientes sem amostras disponíveis de tecido tumoral para análise.

4.4 Definição e classificação das variáveis independentes clínicas, morfológicas e epidemiológicas

Os dados clínico-morfológicos e epidemiológicos coletados nos prontuários foram idade, gênero, história familiar de câncer, localização do sítio primário, gradação histológica da lesão, estadiamento clínico (TNM), tamanho do tumor, presença de linfonodos comprometidos, hábitos tabagista e etilista.

Para categorização dos pacientes de acordo com a idade, utilizou-se a terminologia 'indivíduos clássicos' para aqueles com idade superior a 45 anos e indivíduos jovens para aqueles com idade inferior a 45 anos.

Para categorização de acordo com os hábitos tabagista e etilista, os indivíduos que declararam ter abandonado o hábito tabagista ou etilista por período igual ou superior a seis meses foram considerados não-fumantes e não-etilistas, respectivamente.

As lesões foram categorizadas de acordo com a localização do sítio primário em anterior e posterior. Lesões localizadas na cavidade oral foram consideradas como de localização anterior. Lesões da orofaringe, hipofaringe e laringe foram consideradas como de localização posterior.

Secções histológicas na espessura de cinco micrômetros foram desparafinizadas, coradas com hematoxilina/eosina e avaliadas em microscópio de luz convencional. Foram realizadas gradações morfológicas em todas as lesões, de acordo com a gradação adotada pela OMS (WHO, 1997) (Apêndice A). A gradação morfológica das amostras foi realizada por um único patologista (De Paula et al., 2009) em vinte casos de CECP escolhidos aleatoriamente. Três semanas depois, os casos de CECP foram novamente graduados. O teste estatístico de Kappa foi utilizado para avaliar o grau de concordância obtido intra-observador revelando resultados de boa concordância.

Para o estadiamento clínico das lesões foi utilizada a classificação do *American Joint Committee on Cancer* AJCC, (2003) (Apêndice B). Após a categorização clínica dos pacientes, os mesmos foram divididos em grupos específicos para os parâmetros clínicos TNM. Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com o TNM. Grupo I/II e grupo III/IV. Da mesma forma, dividimos os pacientes em dois grupos conforme o tamanho do tumor (T1/T2 e T3/T4) e a presença de linfonodos locorregionais comprometidos (N negativo e N positivo).

As características clínico-morfológicas e epidemiológicas dos pacientes em estudo estão apresentadas na tabela 1.

A ocorrência de recidiva tumoral locorregional, de metástases à distância e de segundo tumor primário foram os desfechos observados com base nos achados clínico-laboratoriais e imaginológicos e no julgamento do médico assistente do paciente. Para o diagnóstico de segundo tumor primário, foram utilizados os critérios de Warren e Gates (Warren e Gates, 1932).

A sobrevida global foi definida como o intervalo de tempo entre a data do diagnóstico (cadastro) e o óbito, ou até a data final da observação dos pacientes.

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes de acordo com as variáveis epidemiológicas, clínicas e morfológicas

Parâmetros	n (%)
Idade	
Jovens	12 (14,3%)
Clássicos	72 (85,7%)
Gênero	
Masculino	71 (84,5%)
Feminino	13 (15,5%)
HFC	
Presente	38 (45,2%)
Ausente	45 (53,6%)
Sítio primário	
Cavidade oral	37 (44,0%)
Orofaringe	29 (34,5%)
Laringe	11 (13,1%)
Hipofaringe	7 (08,3%)
Gradação OMS	
I	24 (28,6%)
II	33 (39,3%)
III	27 (32,1%)
Estádio TNM	
I	1 (01,2%)
II	08 (09,5%)
III	37 (44,0%)
IV	38 (45,5%)
T	
T1	3 (03,6%)
T2	19 (26,6%)
T3	41 (48,8%)
T4	21 (25,0%)
N	
N0	31 (36,9%)
N1	22 (26,2%)
N2	26 (31,0%)
N3	5 (06,0%)
Hábito tabagista	
Não fumantes	3 (03,6%)
Fumantes/ex-fumantes	81 (96,4%)
Hábito etilista	
Não etilistas	8 (09,5%)
Etilistas/ex-etilistas	76 (90,5%)

Legenda: n: número de pacientes; %:percentagem do total; HFC: história familiar de câncer; OMS: grau histológico conforme Organização Mundial de Saúde; T: tamanho do tumor; N: status dos linfonodos locorregionais.

4.5 Análise do Polimorfismo do Gene ERCC1

Extração de DNA e Polimorfismo do gene ERCC1(G19007A)

Secções de tumor primário, equivalentes ao 100 µm de espessura dos espécimes, foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit *Dneasy Tissue* (Qiagen, Chatsworth, CA) de acordo com o protocolo do fabricante.

O polimorfismo do gene ERCC1 (G19007A) foi avaliado pela técnica RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição) (Wang et al., 2006), que revela polimorfismos genéticos devido à presença ou ausência de um sítio de restrição. A reação de amplificação foi realizada em uma mistura de 25µL contendo 50-200 ng de DNA genômico, 12,5 pmol/L de cada *primer* (25 mM of each, Amresco, Ohio, CA, EUA) (Tabela 2), 0,1 mmol/L de desoxinucleotídeos trifosfatos, solução tampão, 2,0 mmol/L MgCl₂ e 1,25 U Taq polimerase (*Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA*). A técnica consistiu de uma desnaturação inicial a 95° C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturação por 30s, o anelamento a 58,5°C por 30s, a extensão a 72°C por 30s e a extensão final a 72°C por 20 min. O produto 252-bp foi digerido utilizando BrsD1 (*TaKaRa Biotechnology Company*) durante 12 a 16h a 37°C.

Tabela 2 - Primers utilizados para análise do polimorfismo G19007A de ERCC1

Região	I. PRIMERS (REFERÊNCIAS)	II. ENZIMA DE RESTRIÇÃO (CONDIÇÃO)	III. GENÓTIPOS
ERCC1 G19007 A	5'5'-TCA TCC CTA TTG ATG GCT TCT GCC C 3' 5'-GGC CCA GCA CAT AGT CGG GA 3' WANG et al., (2006)	BrsD1* (37° /12hs)	GG (252 bp), GA (252,179, 73 bp) AA (179, 73 bp)

Eletroforese

Os produtos de PCR foram verificados através da eletroforese em gel de poliacrilamida. Foram aplicados 3µL de cada produto juntamente com 1µL de *gel loading buffer* (GLB) no gel a 6,5%. A corrida foi realizada em tampão TBE 1x, a 160V, durante aproximadamente 30 min, utilizando-se cuba específica (*mini-vertical gel electrophoresis unit, Sigma*). A revelação foi efetuada com coloração à base de brometo de etídio e auxílio de transluminador (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA, EUA) e com padrão de peso molecular de 100bp.

4.6 Análise da metilação do gene ERCC1

A metilação do gene ERCC1 foi avaliada através de *methylation-specific PCR* (MSP). A partir tratamento do DNA com bissulfito, as citosinas não metiladas de DNA são convertidas em uracilas, enquanto citosinas metiladas permanecem inalteradas. Cerca de 1 ng de DNA de cada amostra foi desnaturada por incubação com 2 µL de NaOH 3M por 20 min a 50 ° C. Em seguida, as amostras foram tratadas com bissulfito de sódio (2,5 M) e hidroquinona (1M) por 3 horas a 70°C. Posteriormente, as amostras de DNA foram purificadas com um kit específico de purificação de acordo com o protocolo do fabricante (*Promega, Madison, WI, EUA*). As amostras foram ressuspensas em H₂O destilada ultra-pura e 100 ng de DNA foram utilizados para a PCR.

A reação de PCR foi realizada com um volume total de 25 µL contendo 100 ng de DNA genômico, 0,5 µL (20 pmol/L) de *primer* não-metilado e *primer* metilado para o gene ERCC1 (Tabela 3), 2,5 µL de dNTP mix (25 mM de cada um, *Amresco, Ohio, CA, EUA*), 2,5 µL de tampão PCR 10X, 1,25 µL de cloreto de

magnésio (50 mM), e 2,5 U de Platinum Taq DNA polimerase (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad , CA, EUA). A PCR foi realizada com 40 ciclos (95°C durante 60s, 56,5°C por 30s e 72°C por 60s) em um termociclador (*Eppendorf AG*, Hamburgo, Alemanha).

Tabela 3 . *Primers* utilizados para análise da metilação do gene ERCC1

Sequência de primers		Produto PCR bp	Referência	PCR- Condição térmica
Metilado	F 5'- GCG GAG TTT TAT CGG TTT AC -3' R 5'- AAA CGC CTT CTC GAA AAA T-3'	167	Construído	1 x 95°C-5' 40 x 95°C-1' 56,5°C-1' 72°C-1' 1 x 72°C-10'
Não Metilado	F 5'- GTG GAG TTT TAT TGG TTT AT -3' R 5'- AAA CAC C TT C TC AAA AAA T -3'	167	Construído	1 x 95°C-5' 40 x 95°C-1' 56,5°C-1' 72°C-1' 1 x 72°C-10'

Os produtos de PCR com 167bp foram verificados em gel de poliacrilamida 6,5%. Foram aplicados 5 µL de cada produto da amostra juntamente com 1 µL de *gel loading buffer* (GLB). A corrida foi realizada com tampão TBE 1x, a 180 V durante aproximadamente 60 min utilizando cuba específica para eletroforese (mini-vertical gel electrophoresis unit, Sigma). A revelação foi realizada com coloração a base de prata para evidenciação dos produtos, com o auxílio de um padrão de peso molecular de 100 pb.

4.7 Análise da expressão tecidual da proteína ERCC1

Análise imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica foi realizada a partir de cortes histológicos de 3µm, que foram desparafinizados e hidratados. As amostras foram incubadas com o

anticorpo monoclonal ERCC1 (*clone 8F1, Abcam, Cambridge, RU*), e posteriormente conjugados à estreptavidina biotina peroxidase (*K0690; Dako, Glostrup, Dinamarca*). Para revelação da marcação utilizou-se DAB (diamino-benzidina). As amostras foram contracoradas com hematoxilina de Mayer's e montadas. Os controles positivos das reações foram secções de carcinoma previamente positivas para a proteína em estudo. Os controles negativos foram obtidos por substituição do anticorpo primário negativo da DAKO (X0902).

Avaliação da expressão de ERCC1

A expressão imunoistoquímica dos biomarcadores foi avaliada em microscópio óptico com aumento de 10 x e de 40 x Olympus® BH2. A metodologia de avaliação baseou-se na contagem de células com o auxílio de um retículo de 100 pontos composto, de 10 linhas verticais e 10 linhas horizontais medindo 0,092 mm². A análise imunoistoquímica da proteína ERCC1 foi obtida pelo percentual de células marcadas em todos os campos contados (12 campos por espécime). Em cada caso, foi avaliada a imunolocalização da proteína estudada na região do fronte invasivo dos tumores e também em suas áreas superficial e central. O tumor foi considerado de baixa expressão quando se observou que menos de 30% das células estavam marcadas pelo anticorpo. O tumor foi considerado de alta expressão quando se observou que mais de 30% de suas células apresentavam marcação positiva (Jun et al., 2008). Outros pontos de corte foram testados (10%, 20%, 40%) e embora os resultados tenham sido muito semelhantes, o ponto de corte de 30% foi o que se mostrou mais consistente.

4.8 Análises estatísticas

Todos os dados coletados foram digitalizados e analisados no programa estatístico SPSS®, versão 17.0, para Windows®. Foi realizada a estatística descritiva (medidas de frequência relativas e absolutas) de todas as variáveis estudadas. Para investigar associação entre o polimorfismo de ERCC1, a metilação de ERCC1, a expressão de ERCC1 (variáveis desfecho) e as variáveis independentes (idade, sexo, história familiar de câncer, grau tumoral, TNM, T, N, recidiva loco-regional, metástases à distância, segundo tumor primário), foram conduzidas análises bivariadas através dos testes do Qui-quadrado e exato de Fisher e análises multivariadas através de regressão logística. As magnitudes da associação entre as variáveis desfecho e as variáveis independentes foram estimadas através da *odds ratio* (OR) com seus respectivos intervalos de confiança de 95%. As análises de sobrevida global foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier, e a diferença entre as curvas foi avaliada pelo teste *Log-rank*. Utilizou-se o modelo de regressão de Cox para estimar o risco relativo (HR) com intervalo de confiança de 95%. Tanto na regressão logística quanto na regressão de Cox, as variáveis cujos níveis descritivos (valores de p) foram menores que 0,20 na análise bivariada, foram incluídas na análise multivariada seguindo a ordem decrescente do nível descritivo (Hosmer e Lemeshow, 1989). O modelo final foi composto pelos fatores que permaneceram associados às variáveis dependentes ao nível de 0,05 ($p < 0,05$).

4.9 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa 0720/07) em 28 de agosto de 2007 (Apêndice C) e pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Montes Claros (processo número 614/07) em 18 de Maio de 2007 (Apêndice D).

5 RESULTADOS

A prevalência do sexo masculino foi revelada na proporção homem/mulher de 5:1. A faixa etária da população em estudo apontou uma média de idade de 60 anos, variando de 32 a 94 anos. Dentre os fatores de risco avaliados, o hábito tabagista foi verificado em 76,2% dos indivíduos. O percentual de indivíduos não fumantes foi de 23,8%, dentre os quais 20,2 % se declararam como ex-fumantes. O hábito etilista foi observado em 61,9% dos pacientes em estudo. Dentre os indivíduos classificados como não etilistas 26,2% se declararam como ex-etilistas.

O polimorfismo e o status de metilação do gene ERCC1 não foram associados com a expressão tecidual da proteína ERCC1 ($p>0.05$). As análises das associações entre os achados moleculares do gene ERCC1 (polimorfismo, status de metilação e a expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1) estão representadas na tabela 4.

As análises das associações entre as variáveis independentes clínico-morfológicas e epidemiológicas e os achados moleculares do polimorfismo alélico da região promotora de ERCC1, do status de metilação do gene ERCC1 e da expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1 estão representadas na tabela 5.

Tabela 4 - Análises das associações entre os achados moleculares do gene ERCC1 (polimorfismo, status de metilação e expressão imunoistoquímica) investigados. Frequências avaliadas pelo teste de Qui-quadrado

Parâmetros Moleculares ERCC1	Polimorfismo		Expressão Imunoistoquímica	
	GG n %	GA/AA n %	Baixa n %	Alta n %
Status de Metilação				
Não metilado	8 (47.1%)	33 (49.3%)	7 (50.0%)	34 (48.6%)
Metilado	9 (52.9%)	34 (50.7%)	7 (50.0%)	36 (51.4%)
p valor	(0,872)		0,922	
Expressão Imunoistoquímica				
Baixa	2 (11.8%)	4 (28.6%)	-	-
Alta	15 (88.2%)	20 (28.6%)	-	-
p valor	0,544		-	-

n: número de pacientes; % percentagem do total.

Tabela 5 - Associações entre variáveis epidemiológicas, clínicas e morfológicas e os achados moleculares do polimorfismo, do status de metilação e da expressão imunohistoquímica da proteína ERCC1. Frequências avaliadas pelo teste de Qui-quadrado

Variáveis	ERCC1					
	Polimorfismo n %		Status de Metilação n %		Expressão n %	
Idade	GG	GA/AA	NM	M	Baixa	Alta
Jovens	0 (0%)	12 (17.9%)	6 (14.6%)	6 (14.0%)	5 (35.7%)	7 (10%)
Clássicos	17 (100%)	55 (82.1%)	35 (85.4%)	37 (86.0%)	9 (64.3%)	63 (90%)
p valor	0,059		0,587		0,012	
Gênero						
Feminino	3 (17.6%)	10 (14.9%)	36 (87.8%)	35 (81.4%)	2 (14.3%)	11 (15.7%)
Masculino	14 (82.4%)	57 (85.1%)	5 (12.2%)	8 (18.6%)	12 (85.7%)	59 (84.3%)
p valor	0,782		0,306		0,893	
HFC						
Ausente	11 (64.7%)	34 (51.5%)	20 (48.8%)	25 (59.5%)	8 (57.1%)	37 (53.6%)
Presente	6 (35.3%)	32 (48.5%)	21 (51.2%)	17 (40.5%)	6 (42.9%)	32 (46.4%)
p valor	0,330		0,223		0,810	
T						
T1/T2	2 (11.8%)	20 (29.9%)	12 (29.3%)	10 (23.3%)	5 (35.7%)	17 (24.3%)
T3/T4	15 (88.2%)	47 (70.1%)	29 (70.7%)	33 (76.7%)	9 (64.3%)	53 (75.7%)
p valor	0,130		0,531		0,375	
N						
Ausente	6 (35.3%)	25 (37.3%)	17 (41.5%)	14 (32.6%)	8 (57.1%)	23 (32.9%)
Presente	11 (64.7%)	42 (62.7%)	24 (58.5%)	29 (67.4%)	6 (42.9%)	47 (67.1%)
p valor	0,878		0,268		0,086	
TNM						
I/II	2 (11.8%)	7 (10.4%)	6 (14.6%)	3 (7.0%)	4 (28.6%)	5 (7.1%)
III/IV	15 (88.2%)	60 (89.6%)	35 (85.4%)	40 (93.0%)	10 (71.4%)	65 (92.9%)
p valor	0,875		0,218		0,018	
Sítio Primário						
Anterior	6 (35.3%)	31 (46.3%)	20 (48.8%)	17 (39.5%)	7 (50%)	30 (42.9%)
Posterior	11 (64.7%)	36 (53.7%)	21 (51.2%)	26 (60.5%)	7 (50%)	40 (57.1%)
p valor	0,416		0,263		0,623	
OMS						
I	6 (35.3%)	18 (26.9%)	13 (31.7%)	11 (25.6%)	4 (28.6%)	20 (28.6%)
II/III	11 (64.7%)	49 (73.1%)	28 (68.3%)	32 (74.4%)	10 (71.4%)	50 (71.4%)
p valor	0,492		0,543		0,989	
STP						
Ausente	15 (88.2%)	56 (83.6%)	43 (82.9%)	37 (86%)	12 (85.7%)	59 (84.3%)
Presente	2 (11.8%)	11 (16.4%)	7 (17.1%)	6 (14%)	2 (14.3%)	11 (15.7%)
p valor	0,636		0,693		0,893	
M						
Ausente	12 (80%)	58 (87.9%)	31 (77.5%)	39 (95.1%)	13 (100%)	57 (83.8%)
Presente	3 (20%)	8 (12.1%)	9 (22.5%)	2 (4.9%)	0 (0%)	11 (16.2%)
p valor	0,421		0,021		0,119	
Recidiva						
Ausente	8 (53.3%)	45 (68.2%)	27 (65.9%)	25 (58.1%)	8 (61.5%)	45 (66.2%)
Presente	7 (46.7%)	21 (31.8%)	14 (34.1%)	18 (41.9%)	5 (38.5%)	23 (33.8%)
p valor	0,275		0,308		0,747	

Legenda: NM: não metilado; M:metilado; HFC: história familiar de câncer; T: tamanho do tumor; N: linfonodos acometidos; STP: segundo tumor primário; M: metástases à distância.

5.1 Avaliação e análise do polimorfismo alélico da região promotora do gene ERCC1

A análise descritiva da frequência dos polimorfismos G19007A de ERCC1 das amostras de CECP deste estudo revelou que o genótipo GG ocorreu em 17 (20,2%) dos pacientes. O genótipo GA foi observado em 24 (28,6%), e o genótipo AA foi revelado em 43 (51,2%) dos casos. A variante alélica genotípica A para o gene ERCC1 foi observada em 79,8% das amostras (Figura 6).

Figura 6 - Polimorfismo ERCC1 (G19007A)

Legenda: Linha 1 – padrão de peso molecular (100bp); Linha 2 - genótipo GA (252bp, 179bp e 73bp); Linha 3 - genótipo AA (179bp e 73bp); Linha 4 - genótipo GG (252bp); Linha 5 – Controle negativo.

5.2 Análise do status da metilação do gene ERCC1

O status da metilação de ERCC1 foi avaliado nas amostras de CECP deste estudo. A análise descritiva revelou que 43 (51,2%) pacientes apresentaram status metilado e 41 (48,8%) dos indivíduos apresentaram status não-metilado (Figura 7).

Figura 7 - Metilação do gene ERCC1. Canais 1 e 2: status ERCC1 metilado (167bp); Canal 3: status ERCC1 não metilado (167bp).

Legenda: M: metilado: U: não metilado

5.3 Avaliação da expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1

A expressão de ERCC1 foi avaliada nas amostras de CECP deste estudo e a sua análise descritiva revelou que 14 (16,7%) pacientes apresentaram baixa expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1, enquanto que 70 (83,3%) pacientes apresentaram alta expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1. A expressão imunoistoquímica apresentou forte marcação nuclear, sendo predominantemente localizada no fronte invasivo da lesão (Figura 8).

Observamos uma tendência de associação entre o polimorfismo de ERCC1 e a idade dos pacientes ($p = 0,059$). A maior prevalência de indivíduos clássicos foi observada no grupo de indivíduos portadores da variante alélica A no genótipo de ERCC1.

Figura 8 - Expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1 no parênquima neoplásico maligno localizada no fronte de invasão do CECP (Coloração: diaminobenzidina. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer. Aumento: 400X).

Foi verificada uma relação estatisticamente significativa entre o status da metilação de ERCC1 e a ocorrência de metástases à distância. Os pacientes com status de ERCC1 metilado apresentaram menor ocorrência de metástases à distância ($p=0,021$). Houve associação entre a expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1 e a idade dos pacientes. Foi observada uma maior proporção de pacientes clássicos nas amostras de CECP que apresentaram alta expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1 ($p = 0.012$). Houve associação entre a expressão de ERCC1 e o TNM. Foi demonstrada uma maior proporção de pacientes com TNM avançado entre os indivíduos com alta expressão de ERCC1 ($p=0,018$).

Foram conduzidas análises multivariadas através de regressão logística. As magnitudes da associação entre as variáveis desfecho (status de metilação do gene ERCC1 e expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1) e as variáveis independentes foram estimadas através da *odds ratio* (OR) com seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

Os resultados obtidos na análise multivariada da metilação do gene ERCC1 mostraram que a prevalência do status metilado nas amostras de indivíduos diagnosticados com TNM avançado (III/IV) foi superior àquela dos indivíduos classificados em TNM inicial (I/II) (OR = 9,12; IC95%: 1,04 – 80,38; $p = 0,047$). Observamos ainda que, a prevalência do status metilado do gene ERCC1 é superior nas amostras de CECP de pacientes que não apresentaram metástases à distância (OR = 6,67; IC: 1,40 – 33,33; $p = 0,019$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Associação entre Status da Metilação de ERCC1 e variáveis clínico-epidemiológicas. Análise multivariada por regressão logística binária

Parâmetros		Status metilado de ERCC1 OR ajustada (IC 95%)	P valor
TNM	I/II	1	0,047
	III/IV	9,12 (1,04 - 80,38)	
Meta Dist	Não	1	0,019
	Sim	0,15 (0,03-0,73)	

A análise multivariada da expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1 demonstrou que pacientes clássicos apresentaram uma maior prevalência de amostras de CECP com alta expressão imunoistoquímica (OR=4,86; IC95%:1,2 – 19,7; $p = 0,027$). Observamos ainda que a correlação com o TNM se manteve estatisticamente significativa, revelando uma maior expressão de ERCC1 em pacientes com TNM avançado (OR: 5,04; IC95%:1,07 – 23,7; $p=0,041$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Associação entre Expressão de ERCC1 e variáveis clínico-epidemiológicas e morfológicas. Análise multivariada por regressão logística binária

Parâmetros	OR ajustada (IC 95%)	p valor
Idade		
Jovens	1	0,027
Clássicos	4,86 (1,2 – 19,7)	
TNM		
I/II	1	0,041
III/IV	5,04 (1,07 – 23,7)	

5.4 Análise da sobrevida global de acordo com as variáveis epidemiológicas, clínicas, morfológicas e com os achados moleculares de ERCC1

Dos 84 indivíduos selecionados para este estudo, cinco foram excluídos da análise da sobrevida global devido a perda do seguimento. A avaliação dos demais parâmetros clínico-morfológicos, epidemiológicos e moleculares foi mantida nesses pacientes. O seguimento mediano da amostra investigada neste estudo foi de 36 meses. A data final considerada como fim da observação foi 1 de Maio de 2010. A figura 9 mostra os desfechos clínicos dos 79 pacientes incluídos na análise de sobrevida global.

Figura 9 - Fluxograma mostrando o desfecho dos pacientes incluídos na análise de sobrevida

Legenda: IAM: infarto agudo do miocárdio; UPGD: úlcera péptica gastroduodenal.

A sobrevida global mediana foi de 30 meses. A sobrevida global em dois anos foi de 55%, enquanto a sobrevida global em cinco anos foi de 36% (Figura 10).

Figura 10 - Sobrevida global dos 79 pacientes, estimada pelo método de Kaplan-Meier

As análises de sobrevida global foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier e as diferenças entre as curvas foram avaliadas pelo teste *Log-rank*. Utilizou-se o modelo de regressão de Cox para estimar o risco relativo (HR) com intervalo de confiança de 95%. Para a análise multivariada foram incluídas as variáveis TNM, T, N, M, gradação histológica (OMS), expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1 e status da metilação do gene ERCC1. O modelo final foi composto pelos fatores que permaneceram associados às variáveis dependentes ao nível de 0,05 ($p < 0,05$).

A análise bivariada de sobrevida global de acordo com as variáveis clínico-morfológicas, epidemiológicas e moleculares desse estudo está representada na tabela 8.

Tabela 8 - Análise de sobrevida de acordo com as variáveis clínico-morfológicas, epidemiológicas e moleculares desse estudo. Estimada pelo método de Kaplan-Meier. Diferenças avaliadas pelo *Log-Rank*.

Parâmetros	SGM	HR	IC (95%)	p valor
Idade				
< 45	26	0,83	(0,39 – 1,76)	0,626
> 45	31			
Gênero				
Feminino	22	1,09	(0,49 – 2,44)	0,831
Masculino	31			
HFC				
Ausente	30	0,905	(0,53 – 1,55)	0,713
Presente	31			
Sítio Primário				
Anterior	27	1,037	(0,60 – 1,8)	0,897
Posterior	34			
TNM				
I/II	NA	1,74	(0,85 – 14,4)	0,082
III/IV	29			
T				
T1/T2	71	2,15	(1,08 – 4,28)	0,029
T3/T4	47			
N +				
Ausente	13,6	1,74	(0,97 – 3,1)	0,063
Presente	04			
MetaDist				
Ausente	34	2,2	(1,12 – 4,3)	0,022
Presente	20			
OMS				
I	50	1,67	(0,87 – 3,2)	0,119
II/III	29			
Expressão ERCC1				
Baixa	NA	2,05	(0,88 – 4,84)	0,099
Alta	29			
Metilação ERCC1				
Presente	25	1,47	(0,86 – 2,51)	0,156
Ausente	31			
Genótipo ERCC1				
GG	27	0,89	(0,45 – 1,76)	0,727
GA/AA	31			

Legenda - SGm: sobrevida global mediana (em meses); HR: risco relativo; IC: intervalo de confiança; NA: não alcançada; T: tamanho do tumor; N +: linfonodos acometidos; MetaDist: metástases à distância; HFC: história familiar de câncer; OMS: gradação histológica.

Na avaliação dos resultados obtidos por análise bivariada, foi demonstrado que a sobrevida global dos pacientes com tumores T1/T2 foi estatisticamente superior àquela encontrada nos pacientes com lesões de tamanhos T3/T4 ($p = 0,025$) (Figura 11).

Figura 11 - Análise da sobrevida global dos pacientes de acordo com o tamanho do tumor (T). Estimado pelo método de Kaplan-Meier ($p = 0,025$).

Observou-se que os pacientes portadores de linfonodos regionais comprometidos apresentaram sobrevida global predominantemente inferior ($p > 0,05$) (Figura 12).

Figura 12 - Análise da sobrevida global dos pacientes de acordo com a presença de linfonodos regionais acometidos (N+). Estimado pelo método de Kaplan-Meier ($p=0,058$)

A sobrevida global mediana dos pacientes que apresentaram metástases à distância foi inferior à dos pacientes livres de metástases ($p=0,018$) (Figura 13).

Figura 13 - Análise da sobrevida global dos pacientes de acordo com a ocorrência de metástases à distância. Estimado pelo método de Kaplan-Meier ($p = 0,018$)

A sobrevida global mediana dos pacientes que apresentaram recidiva locorregional foi inferior à dos pacientes livres de metástases ($p = 0,032$) (Figura 14).

Figura 14. Análise da sobrevida global dos pacientes de acordo com a ocorrência de recidiva locorregional. Estimada pelo método de Kaplan-Meier ($p = 0,032$).

A análise da sobrevida global dos pacientes de acordo com o polimorfismo alélico da região promotora de ERCC1 não revelou significância estatística (Figura 15).

Figura 15 - Sobrevida global de 79 pacientes, de acordo com o genótipo de ERCC1 demonstrado pelo método de Kaplan-Meier ($p=0,906$).

A análise de sobrevida global dos pacientes de acordo com a presença do alelo A no genótipo de ERCC1 não alcançou significância estatística (Figura 16).

Figura 16 - Sobrevida global de 79 pacientes, de acordo com o genótipo de ERCC1 agrupados conforme a presença do alelo A ($p = 0,725$)

A análise da sobrevida global de acordo com status da metilação de ERCC1 não alcançou significância estatística (Figura 17).

Figura 17 - Gráfico da sobrevida global dos pacientes de acordo com o status da metilação de ERCC1, estimado pelo método de Kaplan-Meier ($p=0,151$)

Os pacientes, cujas amostras de CECP apresentaram alta expressão imunohistoquímica do gene ERCC1, apresentaram sobrevida global mediana predominantemente inferior ($p>0,05$) (Figura 18).

Figura 18 - Gráfico de sobrevida global de 79 pacientes de acordo com a expressão de ERCC1, estimado pelo método de Kaplan-Meier ($p=0,089$)

Na análise multivariada por regressão de Cox, as associações com as variáveis T (OR:2,87; IC95%: 1.38 – 5.97); $p = 0,005$), N (OR:1,84; IC95%: 1.01 - 3.31; $p = 0,044$) e M (OR:3.39; IC95%: 1.64 – 7.00; $p = 0,041$) alcançaram significância estatística. A associação com o status de metilação de ERCC1 apontou uma sobrevida global predominantemente superior no grupo de indivíduos não-

metilados (OR:1,66; IC: 0,95 – 2,89; $p = 0,073$). Os resultados da análise multivariada por regressão de Cox estão representados na tabela 9.

Tabela 9 - Características clínico-morfológicas e moleculares como variáveis prognósticas. Sobrevida global estimada pelo método de Kaplan-Meier. Análise multivariada por regressão de Cox

Parâmetros	OR ajustada (IC 95%)	p valor
T		
T1/T2		
T3/T4	2,87 (1.38 -5.97)	0,005
N		
Positivo		
Negativo	1.84 (1,01 – 3,31)	0,044
M		
Ausente		
Presente	3.39 (1,64 – 7,00)	0,041
Status de Metilação		
Metilado		
Não-metilado	1.66 (0,95 – 2,89)	0,073

Legenda: T: tamanho do tumor; N: linfonodos acometidos; M: metástases à distância; OR: *Odds ratio*; IC: intervalo de confiança.

6 DISCUSSÃO

O câncer é uma doença multifatorial que resulta de interações complexas entre o genótipo individual e os fatores ambientais aos quais o indivíduo é exposto. Em geral, nenhum gene, assim como nenhum fator ambiental isoladamente pode ser identificado como fator causal na etiologia das neoplasias malignas. Em eucariontes, as vias de reparo do DNA são altamente conservadas e constituem uma rede de caminhos bioquímicos interligados, cuja função é permitir que as injúrias ao meio intracelular sejam corrigidas.

Algumas variáveis alélicas em genes de reparo parecem estar associadas à capacidade de reparo reduzida e à maior susceptibilidade ao câncer. ERCC1 está envolvido tanto no reconhecimento do dano, como na incisão da parte danificada do DNA (Hoeijmakers, 2001). No entanto, os efeitos funcionais dos polimorfismos silenciosos de ERCC1 ainda não foram claramente elucidados (Goode et al., 2002).

A análise do polimorfismo alélico de ERCC1 nas amostras de CECP deste estudo revelou que a frequência de ERCC1 G19007A foi de 0,79 para o alelo A.

Alguns estudos em população caucasiana investigaram a associação entre o polimorfismo G19007A de ERCC1 e o câncer, e revelaram a associação da variante alélica A com vários tipos de neoplasias (Winsey et al., 2000; Tomescu et al., 2001; Yin et al., 2002, 2003; Nexø et al., 2003; Vogel et al., 2004;). Nestes estudos, a frequência do polimorfismo G19007A A de ERCC1 permaneceu em torno de 0,65. Resultados um pouco inferiores ao nosso.

Observou-se ainda que os portadores do genótipo AA em ERCC1 G19007A apresentaram risco aumentado para carcinoma basocelular, câncer de mama e câncer de pulmão (Yin et al., 2002, 2003; Nexø et al., 2003; Vogel et al., 2004). Entretanto, o mesmo polimorfismo ERCC1 G19007A foi estudado em câncer colorretal, não tendo sido encontrada uma associação bem definida (Mort et al., 2003). Um estudo caso-controle avaliou a associação do câncer de pulmão e o polimorfismo G19007A de ERCC1 em uma população chinesa, observando-se ausência de elevação do risco dessa neoplasia associada ao genótipo dos pacientes (Yin et al., 2006).

Os resultados publicados na literatura são conflitantes e insuficientes para esclarecer se a variação alélica A do polimorfismo do gene ERCC1 determina diretamente o comportamento clínico da doença. Por se tratar de um gene de reparo do DNA, especulamos que a participação do alelo A possa ser importante, não apenas nas fases iniciais da carcinogênese (Herman et al., 1996; Goode et al., 2002; Sturgis et al., 2002), mas também, no controle da progressão tumoral em nossa amostra.

A avaliação do risco de câncer, bem como da predisposição individual dos pacientes ao câncer de cabeça e pescoço extrapola o escopo deste trabalho. Um estudo caso-controle avaliando o polimorfismo alélico G19007A de ERCC1 em CECP poderia indicar se existe relação da presença do alelo A no genótipo de ERCC1 com o risco de câncer de cabeça e pescoço.

A radioterapia produz injúria ao material genético levando as células tumorais à apoptose. Nos últimos anos, o polimorfismo em enzimas metabólicas e em genes de reparo do DNA foi associado à resposta ao tratamento em câncer de pulmão (Rosell et al., 2002), de colo uterino (Britten et al., 2000), de cólon (Stoehlmacher et

al., 2002) e outros tipos de câncer. Apesar da importância de ERCC1 como marcador prognóstico em câncer humano, uma associação entre polimorfismos de ERCC1 e resposta à radioterapia em pacientes portadores de CECP ainda não foi claramente demonstrada.

O polimorfismo alélico da região promotora de ERCC1, assim como o status de metilação desse gene não foram associados à expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1 em nossas amostras. Da mesma forma, não houve associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo de ERCC1, o status da metilação de ERCC1 e a variável recidiva locorregional da doença, o que parece indicar uma ausência de influência desses dois fatores moleculares de ERCC1 no padrão de recidiva locorregional de nossos pacientes.

Em contraste com nossos achados, Carles et al. (2006), em recente estudo envolvendo pacientes portadores de neoplasias iniciais de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia exclusiva com intenção curativa, conseguiram demonstrar a influência do polimorfismo de ERCC1 na resposta terapêutica e, consequentemente, no tempo de progressão da doença e na sobrevida global dos pacientes. Esse estudo oferece importantes indícios de que o padrão de resposta à radioterapia possa variar em função do genótipo de ERCC1. Entretanto, é importante observar as características do grupo estudado. Todos os indivíduos apresentavam doença em estágio clínico I e II, observando-se um estado de performance de Karnofsky mediano de 90% no grupo selecionado.

O presente estudo foi conduzido no contexto da saúde pública do Sistema Único de Saúde (SUS), e nossa amostra foi composta predominantemente por indivíduos diagnosticados em fases avançadas da doença. Fatores clínico-nutricionais adversos podem ter influenciado a radiosensibilidade tecidual,

desfavorecendo condições adequadas de resposta à radiação ionizante em nossos pacientes. Além disso, a comparação deste, com o estudo mencionado anteriormente, torna-se ainda mais inadequada se considerarmos que a radioterapia foi utilizada como tratamento adjuvante em todos os pacientes do presente estudo, exatamente pelo fato de os mesmos apresentarem fatores de risco para recidiva local e regional. Um estudo envolvendo uma população sob condições clínico-nutricionais controladas poderia contribuir para a avaliação da radiosensibilidade dos pacientes em função do polimorfismo alélico de ERCC1.

Os resultados obtidos na análise multivariada por regressão logística demonstraram uma maior proporção do status metilado do gene ERCC1 nas amostras de indivíduos diagnosticados com TNM avançado (III/IV) (OR = 9,12; IC95%: 1,04 – 80,4; $p = 0,047$). Foi também observada uma maior proporção do status metilado do gene ERCC1 nas amostras de CECP de pacientes que não apresentaram metástases à distância (OR = 6,67; IC95%: 1,40 – 33,33; $p = 0,019$).

Metilação *de novo* usualmente inicia-se nas margens das ilhas CpG dos promotores e progressivamente se estende para o centro das ilhas (Nephew; Huang, 2003). Geralmente, a densidade de sítios CpG metilados dentro de um locus, assim como o número de loci metilados, vai aumentando nos estágios mais avançados do câncer (Nephew e Huang, 2003). Esse fato pode ser ilustrado pela alta proporção do status metilado em indivíduos com TNM avançado em nossa amostra.

O achado de status metilado de ERCC1 predominante em pacientes sem metástases à distância parece paradoxal. Mas, se considerarmos que a grande maioria da nossa população apresentava estádios III/IV da doença (alto risco) e apenas 11 (13,5%) evoluíram com metástases à distância, a ocorrência de silenciamento gênico promovido pela metilação de ERCC1 nesse grupo pode ser

questionada. A metilação gênica é um processo aleatório e potencialmente reversível, cujo impacto na expressão proteica não pode ser previsto ou dimensionado (Momparker, 2003; Feinberg, 2004). Mesmo na presença de alta expressão imunohistoquímica de ERCC1, especulamos que a metilação dos seus promotores seria responsável pelo reparo ineficiente, o que pode ter aumentado a radiosensibilidade tecidual, melhorando o controle local e diminuindo a incidência de metástases à distância. Entretanto, não se sabe qual o real papel de ERCC1 no comportamento da doença sistêmica e nossos resultados podem ter sido apenas incidentais.

A metilação de ERCC1 já foi previamente relacionada à radiosensibilidade em gliomas cerebrais. Um estudo utilizando colônias celulares de quatro linhagens distintas de gliomas cerebrais demonstrou que a curva de sobrevivência a 2 Gy dessas células variou sobremaneira, em função do status da metilação da região promotora de ERCC1, apontando assim, importante relação entre a ocorrência do fenômeno da metilação de ERCC1 e a radiosensibilidade desses tumores. Com base nesse estudo, considera-se que a metilação da região promotora de ERCC1 levaria ao comprometimento da capacidade de reparo dos danos induzidos pela radiação ionizante. Ademais, a metilação do ERCC1 poderia influenciar na remodelação da cromatina, alterando o sinal de transdução e desse modo, alterando também a radiosensibilidade celular. Segundo esse estudo, o status da metilação de ERCC1 pode ser considerado um fator preditivo de radiosensibilidade em gliomas e a alta expressão de ERCC1 pode indicar radiorresistência (Liu et al., 2009). Em recente estudo, também envolvendo gliomas cerebrais, demonstrou-se uma associação entre a metilação da região promotora de ERCC1 e a expressão gênica, bem como à resistência dessas células a cisplatina. O status da metilação de ERCC1

representou maior valor preditivo de sensibilidade à cisplatina que o grau tumoral, o gênero e a idade dos pacientes (Chen et al., 2010). Apesar de não ser adequado comparar estudos com metodologias distintas, inexistem estudos clínicos avaliando o valor prognóstico da metilação de ERCC1 em câncer de cabeça e pescoço, especialmente em pacientes submetidos à radioterapia como único tratamento adjuvante. Nós consideramos ser esta a principal característica do nosso estudo. Mas, tendo em vista o número de casos aqui analisados e a ausência de dados comparativos com estudos prévios da mesma natureza, não podemos afirmar que a metilação de ERCC1 seja o fator responsável pelo padrão de disseminação sistêmico da doença em nossos pacientes.

Nós encontramos uma alta expressão de ERCC1 em 83,3% das amostras de CECP. Esses valores são consistentes com estudos prévios em câncer de cabeça e pescoço (Handra-Luca et al., 2007; Jun et al., 2008). Em contraste com esses achados, um estudo em câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP), observou que apenas 30 a 40% dos tumores expressavam ERCC1 (Olaussen et al., 2006). O *International Adjuvant Lung Cancer Trial Biology Study* (IALT-Bio), direcionado para avaliação do benefício da quimioterapia adjuvante com cisplatina em CPCNP, usou imunoistoquímica para avaliar a expressão de ERCC1 em espécimes cirúrgicas. Nesse estudo, entre 761 tumores, a expressão do gene foi positiva em 335 (44%) e negativa em 426 (56%) (Arriagada et al., 2004). De acordo com estes achados, parece existir uma variação do padrão e da proporção da expressão de ERCC1 em função do tipo de tumor.

De todos os sistemas de reparo, NER é o mais versátil em termos de reconhecimento dos danos, processando tanto lesões causadas por agentes endógenos, quanto exógenos ambientais. Esse fato parece ser ilustrado pela

predominância absoluta do tabagismo e etilismo na população em estudo. Se observarmos a frequência do hábito tabagista na população deste estudo (77,2% de fumantes e 20,2% de ex-fumantes), nos parece coerente inferir que a alta expressão imunoistoquímica de ERCC1 tenha ocorrido como consequência dos danos frequentes ao DNA celular induzidos pelo tabaco neste grupo de pacientes.

Os resultados do presente estudo não demonstraram significância estatística na associação de recidiva locorregional e expressão imunoistoquímica de ERCC1. No entanto, observamos uma alta expressão imunoistoquímica desta proteína na maioria absoluta (75%) dos nossos pacientes que evoluíram com recidivas locorregionais. Não podemos afirmar com segurança que o padrão de expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1 seja o fator responsável pela pior evolução desses pacientes, principalmente se considerarmos que a nossa amostra é constituída predominantemente por pacientes com doença localmente avançada (estádios III/IV) e, portanto, de alto risco para recidiva local e regional. Um estudo envolvendo um maior número de pacientes de risco standard seria necessário para um melhor entendimento da influência de ERCC1 no padrão de recidiva locorregional nesse grupo de pacientes.

Foi demonstrada uma associação entre o TNM e a expressão de ERCC1 ($p = 0,018$). Esta associação se manteve estatisticamente significativa na análise multivariada (OR: 5,04 IC95%:1,07 – 23,7; $p = 0,041$), apontando uma maior proporção de pacientes com TNM avançado no grupo de indivíduos com alta expressão de ERCC1.

Houve associação entre a idade dos pacientes e a expressão de ERCC1 ($p = 0,012$). Em análise multivariada, ajustada pelo modelo de regressão logística, ficou demonstrado que os indivíduos com idade acima de 45 anos apresentaram

uma probabilidade quase cinco vezes superior para a alta expressão de ERCC1 (OR 4,86; IC95%:1,2 – 19,7; $p = 0,027$). Esse achado é compatível com a faixa etária de maior prevalência do CECP.

O fenótipo do câncer pode aparecer, quer devido à maior ocorrência de mutações intrínsecas ou à persistência de mutações extrínsecas causadas por carcinógenos ambientais, como resultado do reparo insuficiente do DNA danificado ao longo do tempo. Esta pode ser a causa da maior prevalência de indivíduos clássicos apresentando alta expressão da proteína ERCC1 em nossas amostras. No entanto, é importante notar que embora os estudos epidemiológicos possam fornecer evidências *in vivo* da relação entre o padrão de expressão dos genes de reparo do DNA e o risco de câncer, os estudos de associação não provam causalidade (Gossage e Madhusudan, 2007). Nesse contexto, baixos níveis de expressão de ERCC1 observados em pacientes com câncer podem ser compreendidos como a causa ou a consequência da doença. A alta expressão de ERCC1 nas formas mais agressivas do CECP da nossa amostra poderia ser justificada pelo aumento do número de células expressando a proteína ERCC1 na tentativa de conter os frequentes danos ao DNA celular.

Nós observamos a ocorrência de 13 (15,5%) casos de segundo tumor primário na evolução clínica de nossos pacientes. Esses achados são compatíveis com a maioria dos trabalhos que mostram uma prevalência de tumores múltiplos metacrônicos em câncer de cabeça e pescoço (Vaamonde et al., 2003; Di Martino et al., 2002).

A sobrevida global do grupo de pacientes estudados foi de 55% em dois anos e 36% em cinco anos, com mediana de 30 meses. A análise de sobrevida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço na base de dados do SEER (sistema

eletrônico de editoração de revistas) (<http://seer.ibict.br/>), observou que no período de 1974 a 1997 houve um incremento da sobrevida a cinco anos de 38,1% para 56,7%. Essa melhora das taxas de sobrevida dos pacientes pode estar relacionada ao diagnóstico em fases mais precoces da doença e às mudanças de paradigma dos tratamentos implementados nas últimas décadas. A população deste estudo foi composta predominantemente por indivíduos com doença avançada. Ademais, não foi utilizada cisplatina no tratamento adjuvante desses pacientes, em sua maioria, tratados no final da década de 1990. Portanto, é compreensível que as nossas taxas de sobrevida sejam comparáveis às taxas inferiores encontradas na literatura.

Na regressão de Cox para análise de sobrevida global as variáveis T (tamanho do tumor), N (presença de linfonodos loco-regionais comprometidos) e M (metástases à distância) foram selecionadas como variáveis independentes. Esse fato demonstra a importância de se considerar esses parâmetros como fatores preditivos isoladamente, e não apenas agrupados conforme o TNM.

A análise da sobrevida global dos nossos pacientes demonstrou que os indivíduos com alta expressão de ERCC1 apresentaram uma sobrevida mediana predominantemente inferior ($p = 0,082$). O modelo de regressão de Cox indicou uma probabilidade de sobrevida global duas vezes superior (OR: 2,05; IC95%: 0,87 – 4,84; $p = 0,089$) no grupo de pacientes com baixa expressão de ERCC1, sem contudo, alcançar significância estatística.

Vários trabalhos da literatura conseguiram demonstrar o valor preditivo de ERCC1 na resposta à quimioterapia com cisplatina (van de Vaart et al., 2000; Warnecke-Eberz et al., 2004; Joshi et al., 2005; Handra-Luca et al., 2007). Alguns deles mostraram o valor prognóstico da expressão imunoistoquímica de ERCC1 na sobrevida dos pacientes (Handra-Lucca et al., 2007; Ota et al., 2009). O IALT-Bio

Study demonstrou um benefício absoluto de 4,1% na sobrevida em cinco anos entre os pacientes com CPCNP tratados com quimioterapia adjuvante baseada em cisplatina. De acordo com os resultados desse estudo, o ganho de sobrevida obtido com o tratamento adjuvante somente foi demonstrado no grupo de pacientes ERCC1-negativos (Arriagada et al., 2004).

Nosso estudo apresenta várias limitações. A primeira delas diz respeito ao número de pacientes. Apenas 84 de 470 pacientes apresentavam amostras disponíveis de tecido tumoral para análise e preenchiam os critérios de inclusão. Ademais, nossa análise foi baseada em dados retrospectivos de tratamentos realizados ao longo de vários anos. Durante este estudo, ocorreram avanços nas técnicas de radioterapia e nas condições de detecção precoce dos casos. Até mesmo as condições de suporte ao paciente oncológico, bem como as técnicas de cuidados paliativos avançaram sobremaneira. Tais circunstâncias certamente afetaram a resposta tumoral e a sobrevida dos pacientes. Outra limitação do estudo se refere à ausência de estratificação dos grupos de acordo com o sítio primário, o que tornou a amostra bastante heterogênea. Sabe-se que o prognóstico dos pacientes em CECP pode variar em função do sítio primário: câncer de laringe tem melhor prognóstico que o de cavidade oral. Acreditamos que, da mesma forma como acontece com os adutos da platina, a alta expressão de ERCC1 esteja também influenciando negativamente a sobrevida global dos nossos pacientes, ao favorecer o frequente reparo dos danos induzidos pela radiação ionizante. Esses dados precisam ser validados por um estudo prospectivo envolvendo um maior número de pacientes estratificados para cada tipo de tumor.

Recentemente, um estudo brasileiro avaliando a expressão da proteína ERCC1 e do RNA mensageiro em pacientes portadores de CECP submetidos à

radioterapia e à quimioterapia adjuvantes observou uma maior sobrevida global no grupo de pacientes com maior expressão da proteína ERCC1 por imunoistoquímica (De Castro et al., 2011). Esse achado poderia ser explicado pela inibição tumoral resultante da maior capacidade de reparo. No entanto, torna-se paradoxal, pois uma maior intensidade de reparo levaria ao aumento da resistência à cisplatina, o que influenciaria negativamente a evolução dos pacientes. Tendo em vista a ausência do uso de cisplatina no tratamento de nossos pacientes, torna-se inadequado comparar os dois estudos, e não podemos afirmar que tenha sido este o fator responsável pela diversidade dos resultados encontrados em ambos os estudos.

Na população aqui estudada, o estadiamento foi confirmado como o principal fator prognóstico relacionado à sobrevida. Entretanto, nossos achados, em conformidade com os trabalhos previamente publicados na literatura, podem oferecer indícios de que ERCC1 apresente valor preditivo de sobrevida global em CECP, também no grupo de pacientes operados e submetidos à radioterapia adjuvante exclusiva.

7 CONCLUSÕES

- O status metilado de ERCC1, assim como a alta expressão imunoistoquímica de sua proteína foram associadas à pior sobrevida, sem, no entanto, alcançar significância estatística.
- O polimorfismo e o status de metilação do gene ERCC1 não foram associados com a expressão tecidual da proteína ERCC1.
- Indivíduos com mais de 45 anos apresentaram maior prevalência da variante alélica A no genótipo de ERCC1.

Estadiamento III/IV, bem como ausência de disseminação sistêmica da doença foram correlacionados à metilação de ERCC1. Maior proporção do status metilado foi observada no grupo de pacientes com doença avançada e no grupo de pacientes sem metástases à distância.

Não observamos correlação entre grau histológico das amostras de CECP e os aspectos moleculares de ERCC1 (polimorfismo alélico GA de ERCC1, metilação de ERCC1 e expressão imunoistoquímica da proteína ERCC1).

- Foram identificados como fatores correlacionados à sobrevida, o T, N e M individualmente, independente do genótipo de ERCC1, do status de metilação de ERCC1 e da expressão imunoistoquímica de sua proteína.

Pacientes com T1/T2, N0 e que não desenvolveram metástases à distância apresentaram melhor sobrevida global.

- A frequência de ERCC1 G19007A neste estudo foi de 0,79 para o alelo A. A alta expressão imunoistoquímica de ERCC1 foi observada em 70 (83,3%) dos pacientes. Segundo tumor primário foi encontrado em 13 (15,5%) pacientes.

REFERÊNCIAS

Adair GM, Rolig RI, Moore-Faver D, Zabelshansky M, Wilson JH, Nairn RS. Role of ERCC1 in removal of long non-homologous tails during targeted homologous recombination. *EMBO J*. 2000;19:5552-61.

Adelstein DJ, Li Y, Adams GI, Wagner H Jr, Kish JA, Ensley JF, et al. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21:92-8.

Ahmad A, Robinson AR, Duensing A, Van Drunen E, Beverloo HB, Weisberg DB, et al. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*. 2008;28:5082-92.

Ai L, Stephenson KK, Ling W, Zuo C, Mukunyadzi P, Suen JY, et al. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Mod Pathol*. 2003;16:944-50.

American Joint Committee on Cancer – AJCC. *Manual de estadiamento do cancer*. Trad. Daniela Dornelles Rosa. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008;371:1695-709.

Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J; International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2004;350:351-60.

Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59:241-57.

Auerkari EI. 3. Methylation of tumor suppressor genes p16(INK4a), p27(Kip1) and E-cadherin in carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2006;42:5-1

Beenken SW, Krontiras H, Maddox WA, Peters GE, Soong S, Urist MM. T1 and T2 squamous cell carcinoma of the oral tongue: prognostic factors and the role of elective lymph node dissection. *Head Neck*. 1999;21:124-30.

Bernier J, Dometge C, Ozsahin M, et al. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350:1945-1952.

Bosken CH, Wei Q, Amos CI, et al: An analysis of DNA repair as a determinant of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 94:1091-1099, 2002.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 1980;32:314-31.

Boysen M, Natvig K, Winther FO, Tausjö J. Value of routine follow-up in patients treated for squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Otolaryngol.* 1985;14:211-4.

Britten RA, Liu D, Tessier A, Hutchison MJ, Murray D. ERCC1 expression as a molecular marker of cisplatin resistance in human cervical tumor cells. *Int J Cancer.* 2000;89:453-7.

Brizel DM, Albers ME, Fisher SR, Scher RL, Richtsmeier WJ, Hars V, et al. Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med.* 1998;338:1798-804.

Byers RM, El-Naggar AK, Lee YY, Rao B, Fornage B, Terry NH, et al. Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue? *Head Neck.* 1998;20:138-44.

Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, Souza FP, Filho JF, Fukuyama EE, et al. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007;173:31-7.

Carles J, Monzo M, Amat M, Jansa S, Artells R, Navarro A, et al. Single-nucleotide polymorphisms in base excision repair, nucleotide excision repair, and double strand break genes as markers for response to radiotherapy in patients with Stage I to II head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;66:1022-30.

Carvalho AL, Magrin J, Kowalski LP. Sites of recurrence in oral and oropharyngeal cancers according to the treatment approach. *Oral Dis.* 2003;9:112-8.

Castro G Jr, Snitcovsky IML, Siqueira SAC, Villar RC, Pasini F, Mangone F, et al. Adjuvant chemoradiation in head and neck squamous cell carcinoma patients presenting with high or intermediate-risk features and delayed overall treatment time. [Abstract]. *Ann Oncol*. 2008;19:223.

Chen HY, Shao CJ, Chen FR, Kwan AL, Chen ZP. Role of ERCC1 promoter hypermethylation in drug resistance to cisplatin in human gliomas. *Int J Cancer*. 2010;126:1944-54.

Chen P, Wiencke J, Aldape K, Kesler-Diaz A, Miike R, Kelsey K, et al. Association of an ERCC1 polymorphism with adult-onset glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9:843-7.

Chipchase MD, Melton DW. The formation of UV-induced chromosome aberrations involves ERCC1 and XPF but not other nucleotide excision repair genes. *DNA Repair (Amst)*. 2002;1:335-40.

Cleaver JE. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature*. 1968;218:652-6.

Clingen PH, Arlett CF, Hartley JA, Parris CN. Chemosensitivity of primary human fibroblasts with defective unhooking of DNA interstrand cross-links. *Exp Cell Res*. 2007;313:753-60.

Cooney TR, Poulsen MG. Is routine follow-up useful after combined-modality therapy for advanced head and neck cancer? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999;125:379-82.

Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, et al. Radiation Therapy Oncology Group 9501/Intergroup. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2004;350:1937-44.

Cooper JS. The oral cavity. In: Cox JD, Ang KK, editors. *Radiation Oncology: Rationale, Technique, Results*. 8th ed. St Louis; Mosby; 2003. p.219-55.

Darcy KM, Tian C, Reed E. A Gynecologic Oncology Group study of platinum-DNA adducts and excision repair cross-complementation group 1 expression in optimal, stage III epithelial ovarian cancer treated with platinum-taxane chemotherapy. *Cancer Res*. 2007;67:4474-81.

Darroudi F, Natarajan AT. Cytological characterization of repair-deficient CHO cell line 43-3B. I. Induction of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges by UV and its modulation with 3-aminobenzamide. *Mutat Res*. 1985;149:239-47.

De Castro G Jr, Pasini FS, Siqueira SA, Ferraz AR, Villar RC, Snitcovsky IM, Federico MH. ERCC1 protein, mRNA expression and T19007C polymorphism as prognostic markers in head and neck squamous cell carcinoma patients treated with surgery and adjuvant cisplatin-based chemoradiation. *Oncol Rep*. 2011 Mar;25:693-9.

De Paula AM, Souza LR, Farias LC, Corrêa GT, Fraga CA, Eleutério NB, et al. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. *Oral Oncol*. 2009;45:777-82.

De Stefani E, Correa P, Oreggia F, Leiva J, Rivero S, Fernandez G, et al. Risk factors for laryngeal cancer. *Cancer*. 1987;60:3087-91.

Den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet*. 2001;109:121-4.

Denis F, Garaud P, Manceau A, Beutter P, Garand G, le Floch O, et al. Prognostic value of the number of involved nodes after neck dissection in oropharyngeal and oral cavity carcinoma. *Cancer Radiother*. 2001;5:12-22.

Döbrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev*. 2005;24:9-17.

Drapkin R, Sancar A, Reinberg D. Where transcription meets repair. *Cell*. 1994;77:9-12.

Ducasse M, Brown MA. Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer*. 2006;5:60.

Eng C, Herman JG, Baylin SB. A bird's eye view of global methylation. *Nat Genet*. 2000;24:101-2.

Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*. 2002;21:5427-40.

Fazzari MJ, Greally JM. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat Rev Genet*. 2004;5:446-55.

Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol.* 2004;14:427-32.

Ford JM. Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53. *Mutat Res.* 2005;577:195-202.

Fowler JF. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *Br J Radiol.* 1989;62:679–94.

Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer.* 1989;43:992-1000.

French SW, Dawson DW, Miner MD, Doerr JR, Malone CS, Wall R, et al. DNA methylation profiling: a new tool for evaluating hematologic malignancies. *Clin Immunol.* 2002;103:217-30.

Friedberg EC, Meira LB. Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage Version 7. *DNA Repair (Amst).* 2006;5:189-209.

Fu KK, Pajak TF, Trotti A, Jones CU, Spencer SA, Phillips TL, et al. A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;48:7-16.

Furuta T, Ueda T, Aune G, Sarasin A, Kraemer KH, Pommier Y. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res.* 2002, 62:4899-902.

Gawecki W, Kostrzevska-Poczekaj M, Gajecka M, Milecki P, Szyfter K, Szyfter W. The role of genetic factor in etiopathogenesis of squamous cell carcinoma of the head and neck in young adults. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2007;264:1459-65.

Gay HA, Spencer CR, Lewis JS, Liu E, El Naqa I, Adkins D, Deasy JO, Nussenbaum B, Haughey BH, Thorstad WL. Outcomes of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with postoperative adjuvant IMRT chemotherapy: a retrospective analysis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 78 (2010) (Abstract 134).

Gillet LC, Schärer OD. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev.* 2006;106:253-76.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science.* 1999;286:531-7.

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

Gossage L, Madhusudan S. Current status of excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in cancer. *Cancer Treat Rev.* 2007;33:565-77.

Goto T, Mizukami H, Shirahata A, Sakata M, Saito M, Ishibashi K, et al. Aberrant methylation of the p16 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2009;29:275-7.

Goyal S, Parikh RR, Green C, Schiff D, Moran MS, Yang Q, et al. Clinicopathologic significance of excision repair cross-complementation 1 expression in patients treated with breast-conserving surgery and radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;76:679-84.

Grabenbauer GG, Suckorada O, Niedobitek G, Rödel F, Iro H, Sauer R, et al. Imbalance between proliferation and apoptosis may be responsible for treatment failure after postoperative radiotherapy in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Oral Oncol.* 2003;39:459-69.

Griffiths JFA, Mileer HJ, Suzuki TD, Lewontin CR, Gelbart MW. *An Introduction to Genetic Analysis*. 6th ed. New York: W.H. Freeman; 1996. 915p.

Grønbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS.* 2007;115:1039-59.

Hall EJ. Current practice and new horizons. Radiobiology in clinical radiation therapy - Part II. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1990;19(Supplement 1):97.

Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for Radiologist. 6nd. ed. Philadelphia: Lippincot Williams e Wilkins; 2006. 546p.

Hall EJ. Radiobiology in Clinical Radioterapy, Part I, Systems and Principles. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991;21(Supplement 1):81.

Handra-Luca A, Hernandez J, Mountzios G, Taranchon E, Lacau-St-Guily J, Soria JC, et al. Excision repair cross complementation group 1 immunohistochemical expression predicts objective response and cancer-specific survival in patients treated by Cisplatin-based induction chemotherapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13:3855-9.

Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, Ringstrom E, Posner M, Kelsey KT. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene*. 2002;21:4231-6.

Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003;349:2042-54.

Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:9821-6.

Hoeijmakers JH. Characterization of genes and proteins involved in excision repair of human cells. *J Cell Sci Suppl*. 1987; 6:111-25.

Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001;411:366-74.

Hoffmann M, Görögh T, Gottschlich S, Lohrey C, Rittgen W, Ambrosch P, Schwarz E, Kahn T. Human papillomaviruses in head and neck cancer: 8-year survival analysis of 73 patients. *Cancer Letter*. Volume 218, Issue 2, (2005) 199–206.

Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. New York: John Wiley e Sons; 1989. 307p.

Instituto Nacional do Câncer-INCa. Ministério da Saúde. *Estimativa 2010/Incidência de Câncer no Brasil*, 2010.

Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001;293:1074-80.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002;3:415-28.

Joshi MB, Shirota Y, Danenberg KD, Conlon DH, Salonga DS, Herndon JE 2nd, et al. High gene expression of TS1, GSTP1, and ERCC1 are risk factors for survival in patients treated with trimodality therapy for esophageal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:2215-21.

Jun HJ, Ahn MJ, Kim HS, Yi SY, Han J, Lee SK, et al. ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation. *Br J Cancer*. 2008;99:167-72.

Kannan K, Latha PN, Shanmugam G. Expression of bcl-2 oncoprotein in Indian oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 1998;34:373-6.

Kim MK, Cho KJ, Kwon GY, Park SI, Kim YH, Kim JH, et al. ERCC1 predicting chemoradiation resistance and poor outcome in oesophageal cancer. *Eur J Cancer*. 2008;44:54-60.

Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1997;24:72-7.

Kirchner JA, Som ML. Clinical significance of fixed vocal cord. *Laryngoscope* 1971;81:1029–1044.

Koskinen, W.J. et al. *Prognostic markers in head and neck carcinoma*. Helsinki: Academic Dissertation Haartman Institute; 2006.

Kowalski LP, Bagietto R, Lara JR, Santos RL, Silva JF Jr, Magrin J. Prognostic significance of the distribution of neck node metastasis from oral carcinoma. *Head Neck*. 2000;22:207-14.

Kowalski LP. Results of salvage treatment of the neck in patients with oral cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;128:58-62.

Kreimer AR, Clifford, GM, Boyle P, Franceschi S, Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev*. 2005; 14: 467–475.

Kwon HC, Roh MS, Oh SY, Kim SH, Kim MC, Kim JS, Kim HJ. Prognostic value of expression of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase P1 for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced gastric cancer. *Ann Oncol*. 2007;18:504-9.

Lehmann AR. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie*. 2003;85:1101-11.

Lemaire F, Millon R, Young J, Cromer A, Wasylyk C, Schultz I, et al. Differential expression profiling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Br J Cancer*. 2003;89:1940-9.

Leon Barnes, JW, Eveson, PR, David S. Pathology and Genetic of Head and Neck Tumours. In: *World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon: IARC; 2005. p.111-23.

Liu Z, Wang L, Wang LE, Sturgis EM, Wei Q. Polymorphisms of the DNMT3B gene and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Lett*. 2008;268:158-65.

Liu ZG, Chen HY, Cheng JJ, Chen ZP, Li XN, Xia YF. Relationship between methylation status of ERCC1 promoter and radiosensitivity in glioma cell lines. *Cell Biol Int*. 2009;33:1111-7.

Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. *Oral Oncol*. 2003;39:106-14.

Manuel S, Raghavan SK, Pandey M, Sebastian P. Survival in patients under 45 years with squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2003;32:167-73.

Miller MC 3rd, Mohrenweiser HW, Bell DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol Lett*. 2001;120:269-80.

Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2001;97:1172-9.

Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene*. 2003;22:6479-83.

Montgomery KG, Liu MC, Eccles DM, Campbell IG. The DNMT3B C-->T promoter polymorphism and risk of breast cancer in a British population: a case-control study. *Breast Cancer Res*. 2004;6:R390-4.

Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM, Smerick JB, Budowle B. Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J Forensic Sci*. 2001;46:647-60.

Mort R, Mo L, McEwan C, Melton DW. Lack of involvement of nucleotide excision repair gene polymorphisms in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2003;89:333-7.

Moser J, Kool H, Giakzidis I, Caldecott K, Mullenders LH, Foustieri MI. Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol Cell*. 2007;27:311-23.

Mu D, Park CH, Matsunaga T, Hsu DS, Reardon JT, Sancar A. Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *J Biol Chem*. 1995;270:2415-8.

Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;122:44-51.

Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell.* 1997;88:471-81.

Nephew KP, Huang TH. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Lett.* 2003;190:125-33.

Nexø BA, Vogel U, Olsen A, Ketelsen T, Bukowy Z, Thomsen BL, et al. A specific haplotype of single nucleotide polymorphisms on chromosome 19q13.2-3 encompassing the gene RAI is indicative of post-menopausal breast cancer before age 55. *Carcinogenesis.* 2003;24:899-904

Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, et al. IALT Bio Investigators. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med.* 2006;355:983-91.

O'Sullivan B, Huang S, Perez-Ordóñez B, Liu F, Massey C, Weinreb I, Chen E, Cummings B, Kim J, Waldron J. Outcome of radiotherapy alone in HPV associated oropharyngeal cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2010;78 (Abstract 132).

Ota S, Ishii G, Goto K, Kubota K, Kim YH, Kojika M, et al. Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy. *Lung Cancer.* 2009;64:98-104.

Palitti F, Tanzarella C, Degrassi F, De Salvia R, Fiore M, Natarajan AT. Formation of chromatid-type aberrations in G2 stage of the cell cycle. *Mutat Res.* 1983;110:343-50.

Pâques F, Haber JE. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63:349-404.

Parkhill JM, Hennig BJ, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000;27:682-9.

Peacock J H, Nahum A E, Steel G G. Normal-tissue effects in radiotherapy: physics meets biology. Report on a workshop held at hartsfield manor, betchworth, surrey, uk, 14-16 july 1997. *Int J Radiat Biol.* 1998;73:341-4

Proietti De Santis L, Garcia CL, Balajee AS, Brea Calvo GT, Bassi L, Palitti F. Transcription coupled repair deficiency results in increased chromosomal aberrations and apoptotic death in the UV61 cell line, the Chinese hamster homologue of Cockayne's syndrome B. *Mutat Res.* 2001;485:121-32.

Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *EMBO J.* 1998;17:4905-8.

Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stutzer H, Preuss SF, Hoffmann TK, Speel EJ, Dienes HP, Pfister HJ, Guntinas-Lichius O, Klussmann JP. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer, *Int. J. Cancer.* 120 (2007) 1731–1738.

Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:2291-8.

Rosell R, Lord RV, Taron M, Reguart N. DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2002;38:217-27.

Rosenquist K. Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Swed Dent J Suppl.* 2005;179:1-66.

Rush LJ, Plass C. Alterations of DNA methylation in hematologic malignancies. *Cancer Lett.* 2002;185:1-12.

Sargent RG, Brenneman MA, Wilson JH. Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination. *Mol Cell Biol.* 1997;17:267-77.

Sargent RG, Meservy JL, Perkins BD, Kilburn AE, Intody Z, Adair GM, et al. Role of the nucleotide excision repair gene ERCC1 in formation of recombination-dependent rearrangements in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:3771-8.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* 2000;36:256-63.

Shaw RJ, Hall GL, Woolgar JA, Lowe D, Rogers SN, Field JK, et al. Quantitative methylation analysis of resection margins and lymph nodes in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2007;45:617-22.

Shellard SA, Fichtinger-Schepman AM, Lazo JS, et al: Evidence of differential cisplatin-DNA adduct formation, removal and tolerance of DNA damage in three human lung carcinoma cell lines. *Anticancer Drugs.* 1993;4:491-500.

Shen H, Wang L, Spitz MR, Hong WK, Mao L, Wei Q. A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer Res.* 2002;62:4992-5.

Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. *Cancer.* 2005;103:1843-9.

Singal R, Das PM, Manoharan M, Reis IM, Schlesselman JJ. Polymorphisms in the DNA methyltransferase 3b gene and prostate cancer risk. *Oncol Rep.* 2005;14:569-73.

Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood.* 1999;93:4059-70.

Smeets SJ, Brakenhoff RH, Ylstra B, van Wieringen WN, van de Wiel MA, Leemans CR, Braakhuis BJ. Genetic classification of oral and oropharyngeal carcinomas identifies subgroups with a different prognosis. *Cell Oncol.* 2009;31:291-300.

Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Groshen S, Tsao-Wei DD, Yu MC, et al. Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism

and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:936-42.

Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Yang D, Groshen S, Zahedy S, et al. A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2004;91:344-54.

Sturgis EM, Dahlstrom KR, Spitz MR, Wei Q. DNA repair gene ERCC1 and ERCC2/XPD polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128:1084-8.

Sturgis EM, Miller RH. Second primary malignancies in the head and neck cancer patient. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995;104:946-54.

Tan LK, Ogden GR. p53 over-expression in laryngeal carcinoma is not predictive of response to radiotherapy. *Oral Oncol.* 1997 May;33:177-81

Tanemura A, Terando AM, Sim MS, van Hoesel AQ, de Maat MF, Morton DL, et al. CpG island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15:1801-7.

Tankéré F, Camproux A, Barry B, Guedon C, Depondt J, Gehanno P. Prognostic value of lymph node involvement in oral cancers: a study of 137 cases. *Laryngoscope.* 2000;110:2061-5.

Teodoridis JM, Strathdee G, Brown R. Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker. *Drug Resist Updat*. 2004;7:267-78.

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

Toruner GA, Ulger C, Alkan M, Galante AT, Rinaggio J, Wilk R, et al. Soteropoulos P, Hameed MR, Schwalb MN, Dermody JJ. Association between gene expression profile and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004;154:27-35.

Tripsianes K, Folkers G, Ab E, Das D, Odijk H, Jaspers NG, et al. The structure of the human ERCC1/XPF interaction domains reveals a complementary role for the two proteins in nucleotide excision repair. *Structure*. 2005;13:1849-58.

Tsodikov OV, Enzlin JH, Schärer OD, Ellenberger T. Crystal structure and DNA binding functions of ERCC1, a subunit of the DNA structure-specific endonuclease XPF-ERCC1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:11236-41.

Tsuchiya K, Shirato H, Nishioka T, Yamazaki A, Hashimoto S, Kagei K, et al. Pretreatment apoptotic scores do not predict response to radiation therapy in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2001;37:159-63.

Tuyns AJ. Alcohol-related cancers in Mediterranean countries. *Tumori*. 1990 31;76:315-20.

Vaissière T, Hung RJ, Zaridze D, Moukeria A, Cuenin C, Fasolo V, et al. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res.* 2009;69:243-52.

van de Vaart PJ, Belderbos J, de Jong D, Sneeuw KC, Majoor D, Bartelink H, et al. DNA-adduct levels as a predictor of outcome for NSCLC patients receiving daily cisplatin and radiotherapy. *Int J Cancer.* 2000;89:160-6.

Vasilatos SN, Broadwater G, Barry WT, Baker JC Jr, Lem S, Dietze EC, et al. CpG island tumor suppressor promoter methylation in non-BRCA-associated early mammary carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:901-14.

Vikram B, Strong EW, Shah JP, Spiro R. Second malignant neoplasms in patients successfully treated with multimodality treatment for advanced head and neck cancer. *Head Neck Surg.* 1984;6:734-7.

Vilmar A, Sørensen JB. Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) in platinum-based treatment of non-small cell lung cancer with special emphasis on carboplatin: a review of current literature. *Lung Cancer.* 2009;64:131-9.

Vogel U, Laros I, Jacobsen NR, Thomsen BL, Bak H, Olsen A, et al. Two regions in chromosome 19q13.2-3 are associated with risk of lung cancer. *Mutat Res.* 2004;546:65-74.

Wang SL, Zhao H, Zhou B, Chen YL, Zou Y, Zhu XF, et al. Polymorphisms in ERCC1 and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population. *Leuk Res.* 2006;30:1341-5.

Wang Y, Spitz MR, Lee JJ, Huang M, Lippman SM, Wu X. Nucleotide excision repair pathway genes and oral premalignant lesions. *Clin Cancer Res.* 2007;13:3753-8.

Warnecke-Eberz U, Metzger R, Miyazono F, Baldus SE, Neiss S, Brabender J, et al. High specificity of quantitative excision repair cross-complementing 1 messenger RNA expression for prediction of minor histopathological response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10:3794-9.

Warren S; Gates O. Multiple primary malignant tumors: a survey of the literature and a statistical study. *Am J Cancer.* 1932;16:1358-403.

Weissbach A. A chronicle of DNA methylation (1948-1975). *EXS.* 1993;64:1-10.

Winsey SL, Haldar NA, Marsh HP, Bunce M, Marshall SE, Harris AL, et al. A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res.* 2000;60:5612-6.

World Health Organization-WHO. *World Cancer Report*, 2008. Lyon: IARC; 2009.

Wreesmann VB, Shi W, Thaler HT, Poluri A, Kraus DH, Pfister D, Shaha AR, Shah JP, Rao PH, Singh B. Identification of novel prognosticators of outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2004 Oct 1;22:3965-72.

Wu Y, Lin JS. DNA methyltransferase 3B promoter polymorphism and its susceptibility to primary hepatocellular carcinoma in the Chinese Han nationality population: a case-control study. *World J Gastroenterol*. 2007;13:6082-6.

Wunsch-Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol*. 2002;38:737-46.

Yin J, Rockenbauer E, Hedayati M, Jacobsen NR, Vogel U, Grossman L, et al. Multiple single nucleotide polymorphisms on human chromosome 19q13.2-3 associate with risk of Basal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11:1449-53.

Yin J, Vogel U, Gerdes LU, Dybdahl M, Bolund L, Nexø BA. Twelve single nucleotide polymorphisms on chromosome 19q13.2-13.3: linkage disequilibria and associations with basal cell carcinoma in Danish psoriatic patients. *Biochem Genet*. 2003;41:27-37.

Yin J, Vogel U, Guo L, Ma Y, Wang H. Lack of association between DNA repair gene ERCC1 polymorphism and risk of lung cancer in a Chinese population. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;164:66-70.

Yu JJ, Lee KB, Mu C, Li Q, Abernathy TV, Bostick-Bruton F, et al. Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene. *Int J Oncol*. 2000;16:555-60.

Yu JJ, Mu C, Lee KB, Okamoto A, Reed EL, Bostick-Bruton F, et al. A nucleotide polymorphism in ERCC1 in human ovarian cancer cell lines and tumor tissues. *Mutat Res.* 1997;382:13-20.

Apêndice A

GRADAÇÃO HISTOLÓGICA DOS CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Organização Mundial da Saúde (OMS / WHO, 2009)

Grau 1	Bem diferenciado: arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso
Grau 2	Moderadamente diferenciado: certo grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica. Pouca ceratinização.
Grau 3	Pouco diferenciado: predomínio de células imaturas. Numerosas mitoses típicas e atípicas. Mínima ceratinização.

Apêndice B

CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DE TUMORES MALIGNOS *American Joint Committee on Cancer AJCC, (2003) - 6ª EDIÇÃO* TUMORES DA CABEÇA E DO PESCOÇO

T - Tumor Primário

Todas as localizações:

- TX O tumor primário não pode ser avaliado
T0 Não há evidência de tumor primário
Tis Carcinoma *in situ*

Lábio, Cavidade Oral, Orofaringe, Hipofaringe*

- T1 Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
* limitado a uma sub-localização anatômica.
- T2 Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
* ou mais de uma sub-localização anatômica, sem fixação da hemilaringe.
- T3 Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
* ou com fixação da hemilaringe.
- T4a Tumor que invade estruturas adjacentes
- *Lábio*: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, ou pele da face (queixo ou nariz).
 - *Cavidade oral*: cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face.
 - *Orofaringe*: laringe, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), pterigoide medial, palato duro e mandíbula.

- *Hipofaringe*: cartilagem tireoide/cricoide, osso hioide, glândula tireoide, esôfago, compartimento central de partes moles.

T4b Tumor que invade estruturas adjacentes

- *Lábio e cavidade oral*: espaço mastigador, lâminas pterigoides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna.
- *Orofaringe*: músculo pterigoide lateral, lâminas pterigoides, nasofaringe lateral, base do crânio ou adjacentes a artéria carótida.
- *Hipofaringe*: fáscia pré-vertebral, envolve artéria carótida ou invade estruturas mediastinais.

Nota: *As partes moles do compartimento central incluem a alça muscular pré-laríngea (NT - omo-hioideo, esterno-hioideo, esterno-tireo-hioideo e tireohioideo) e gordura subcutânea.

Nota: A erosão superficial isolada do osso/alvéolo dentário por um tumor primário de gengiva não é suficiente para classificá-lo como T4.

Laringe

T1

- *Supraglote*: tumor limitado a uma sub-localização anatômica da supraglote, com mobilidade normal da corda vocal.
- *Glote*: tumor limitado à(s) corda(s) vocal(ais) (pode envolver a comissura anterior ou posterior), com mobilidade normal da(s) corda(s).

T1a Tumor limitado a uma corda vocal.

T1b Tumor que envolve ambas as cordas vocais.

- *Subglote*: tumor limitado à subglote.

T2

- *Supraglote*: tumor que invade a mucosa de mais de uma sublocalização anatômica adjacente da supraglote ou a glote ou região externa à supraglote (p. ex., a mucosa da base da língua, a valécula, a parede medial do seio piriforme), sem fixação da laringe.
- *Glote*: tumor que se estende à supraglote e/ou subglote, e/ou com mobilidade diminuída da corda vocal.

- *Subglote*: tumor que se estende à(s) corda(s) vocal(ais), com mobilidade normal ou reduzida

T3

- *Supraglote*: tumor limitado à laringe com fixação da corda vocal e/ou invasão de qualquer uma das seguintes estruturas: área pós-cricoide, tecidos pré-epiglóticos, espaço para-glótico, e/ou com erosão mínima da cartilagem tireoide (p. ex., córtex interna).
- *Glote*: tumor limitado à laringe, com fixação da corda vocal e/ou que invade o espaço para-glótico, e/ou com erosão mínima da cartilagem tireoide (p.ex., córtex interna).
- *Subglote*: tumor limitado à laringe, com fixação da corda vocal.

T4a Tumor que invade estruturas adjacentes

- *Supraglote, glote e subglote*: toda a cartilagem tireoide e/ou estende-se aos tecidos além da laringe, p. ex., traqueia, partes moles do pescoço, incluindo músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), alça muscular, tireoide e esôfago.

T4b Tumor que invade estruturas adjacentes

- *Supraglote, glote e subglote*: espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacente à artéria carótida

N - Linfonodos Regionais

Todas as localizações:

- NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.
- N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais.
- N1 Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão.
- N2 Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão.
- N2a Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão.

- N2b Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão.
- N2c Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão.
- N3 Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão.

Nota: Os linfonodos de linha média são considerados linfonodos homolaterais.

M - Metástase à Distância

Todas as localizações:

MX A presença de metástase à distância não pode ser avaliada

M0 Ausência de metástase à distância

M1 Metástase à distância

Grupamento por Estádio

Estádio 0	Tis N0 M0
Estádio I	T1 N0 M0
Estádio II	T2 N0 M0
Estádio III	T1, T2 N1 M0 T3 N0, N1 M0
Estádio IVA	T1, T2, T3 N2 M0 T4a N0, N1, N2 M0
Estádio IVB	Qualquer T N3 M0 T4b Qualquer N M0
Estádio IVC	Qualquer T Qualquer N M1

Apêndice C

Ao
Departamento de Radiologia

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 28.08.07, tomou ciência da execução do Protocolo de Pesquisa nº **0720/07**, intitulado: **"AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE ERCC1 E IMUNOLOCALIZAÇÃO DE SUA PROTEÍNA NO CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO. CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS, RESPOSTA À RADIOTERAPIA, EFEITOS COLATERAIS E SOBREVIVÊNCIA"**.

No que tange sua parte empírica será desenvolvida na **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS-UNIMONTES**, tendo seu Comitê de Ética aprovado o estudo em 18.05.07.

Pesquisadora Responsável: **Dra. Heloisa de Andrade Carvalho**

Pesquisadora Executante: **Luciane Costa Lima**

CAPPesq, 28 de agosto de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Apêndice D

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
COMITÊ DE ÉTICA

PARECER CONSUBSTANCIADO

Montes Claros, 18 de maio de 2007.

Processo N.º 614/07.

Título do Projeto: Avaliação do Polimorfismo do Gene ERCC1 e Imunolocalização de sua Proteína no Carcinoma Espinocelular de Cabeça e Pescoço.

Orientadora: Profa. Dra. Heloísa Andrade Carvalho.

Relatora: Profa. Ms Vânia Silva Vilas Boas Vieira Lopes.

Histórico

O câncer de cabeça e pescoço abrange um grupo heterogêneo de neoplasias malignas. Sua abordagem exige profundo conhecimento da topografia e a fisiologia da região, pois tanto as doenças, quanto seus tratamentos padrões, podem promover importantes alterações morfofuncionais. O Carcinoma epidermóide representa mais de 90% das malignidades encontradas na região de cabeça e pescoço (Neville et al., 1998). A doença representa um dos principais problemas de saúde pública em muitas partes do mundo em especial no Brasil.

Mérito

Esse projeto tem por objetivo avaliar se a imunolocalização da proteína ERCC1 e o polimorfismo do gene ERCC1 podem representar algum valor preditivo quanto à resposta ao tratamento radioterápico, influenciar o comportamento biológico das lesões de CECP e definir a sobrevida dos pacientes portadores da doença. O trabalho evolvera a coleta de dados clínico-epidemiológicos e análise de 599 amostras de biópsias ou peças cirúrgicas de pacientes portadores de CECP submetidos ao tratamento cirúrgico, radioterápico ou quimioterápico, dos quais espera-se obter aproximadamente 100 amostras caracterizando um grupo mais homogêneo possível dentro dos critérios de categorização dos pacientes. Os achados da pesquisa poderão beneficiar outros pacientes com o mesmo tipo de tumor, pois subsidiará mais informações sobre a reação do organismo em pessoas com a doença.

Parecer

A presidência do Comitê de Ética da Unimontes analisou o processo 614, e entende que o mesmo está completo e dentro das normas do Comitê e das Resoluções do Conselho Nacional da Saúde/Ministério da Saúde. Sendo assim, somos pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa.

Profª. Vânia Silva Vilas Boas Vieira Lopes
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Unimontes

DNA repair gene ERCC1 in head and neck squamous cell carcinoma: analysis of methylation and polymorphism (G19007A), protein expression, and association with epidemiological and clinicopathological factors.

Lucianne Maia Costa Lima¹, Alfredo Maurício Batista de Paula², Ludmilla Regina de Souza³, Thiago Fonseca da Silva³, Camila Santos Pereira³, André Luiz Sena Guimarães², Heloisa de Andrade Carvalho⁴.

¹ MD, Post-graduation. Departamento de Radiologia – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, Brazil.

² DDS, PhD. Health Sciences Programme. Department of Dentistry. State University of Montes Claros, Montes Claros, Brazil.

³ Postgraduation. Health Sciences Programme. Department of Dentistry. State University of Montes Claros, Montes Claros, Brazil.

⁴ MD, PhD. Departamento de Radiologia – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Heloisa de Andrade Carvalho, MD, PhD
Divisão de Oncologia – Serviço de Radioterapia - InRad
Hospital das Clínicas – University of São Paulo
Av. Prof. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 – INRAD - Radioterapia
CEP – 05413-000 São Paulo, SP - Brazil
Fax: (55 11) 3885-7036 Phone: (55 11) 3069-6722
handrade@hcnet.usp.br / heloisa-carvalho@uol.com.br

Running title: ERCC1 DNA repair gene in head and neck cancer

Keywords: Head and neck neoplasms; Squamous cell carcinoma; DNA repair; Methylation; Polymorphism, genetic; Immunohistochemistry; Radiotherapy, adjuvant.

Abstract

Aims: to evaluate the associations of ERCC1 (G19007A) polymorphism, methylation, and immunohistochemical expression with epidemiological and clinicopathological factors in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients. **Methods and Results:** 84 patients with HNSCC, who underwent surgery and adjuvant radiotherapy, without chemotherapy. Bivariate and multivariate analyses were used ($p \leq 0.05$). The allele A genotype variant was observed in 79.8% of the samples, GG in 20.2%, GA in 28.6%, and AA in 51.2%. Individuals over 45 years had a higher prevalence of the allelic A variant and a high (83.3%) immunohistochemical expression of ERCC1 protein (OR=4.86, 95%CI=1.2-19.7, $p=0.027$) which was also high in patients with advanced stage (OR=5.04, 95%CI=1.07-23.7, $p=0.041$). Methylated status was found in 51.2% of the samples, and was higher in patients that did not present distant metastasis (OR=6.67, 95%CI=1.40-33.33, $p=0.019$), and in patients with advanced stage (OR=5.04, 95%CI=1.07-23.7, $p=0.041$). **Conclusion** A high frequency of allele A of ERCC1 G19007A, mainly in individuals over 45 years, was observed. The methylated status was more frequent in patients who did not evolve with distant metastases, and in individuals with locally advanced disease. Immunohistochemical expression of ERCC1 was high in this population, mostly in patients with advanced stage.

INTRODUCTION

Head and neck cancer comprises about 6% of all malignancies¹ and is the fifth cause of cancer worldwide. Squamous cell carcinomas of the head and neck (HNSCC) are the most common type of malignancies of the upper aerodigestive tract. Each year there are approximately 560,000 new cases and 300,000 deaths due to head and neck cancer. About 40% of these tumors occur in the oral cavity, 15% in pharynx and 25% in the larynx². Classically, the etiopathogenesis of cancer is associated with progressive genetic disorders³. Evidence indicates that not only genetic but also epigenetic changes are related to the expression of genes involved in the regulation of carcinogenesis⁴. It seems clear that epigenetic changes are similarly relevant and closely linked to disruption of cell signaling related to carcinogenesis⁵.

Radiotherapy has traditionally been used in the treatment of these malignancies, producing injury to genetic material and leading tumor cells to apoptosis. The influence of the expression of ERCC1 (*Excision Repair Cross Complementation Group 1*) DNA repair protein in the resistance that some patients have to cisplatin-based chemotherapy appears to be well established in some malignancies⁶, including HNSCC⁷. Apart from this, genetic polymorphism in ERCC1 has been shown to influence the response to radiotherapy in early head-and-neck cancers⁸, implying a role of ERCC1 in the repair of radiotherapy-induced DNA damage. However, it is unclear if there is a correlation of ERCC1 gene expression, the polymorphism and the status of methylation of the promoter gene with the clinical and morpho-functional features of head and neck cancer involving patients undergoing radiotherapy. This understanding could be useful to establish a parallel between the prognostic value of ERCC1 and tumor resistance in patients undergoing treatments based on ionizing radiation.

The aim of this study was to verify the frequency of methylation and GA polymorphism of ERCC1 gene and immunohistochemical expression of its protein in individuals with HNSCC that underwent surgery followed by radiotherapy as the only adjuvant treatment. Also, to correlate the findings with epidemiological, clinical and morphological parameters.

MATERIAL AND METHODS

Ethical approval for this study was obtained from the relevant local ethics committees (*UNIMONTES/CEP-614/2007 and FMUSP/CAPpesq 0720/2007*).

A retrospective study of 84 patients with surgically resected primary HNSCC was performed. Inclusion criteria were confirmed primary site in oral cavity, oropharynx, hypopharynx or larynx and availability of archived tissue blocks. All patients underwent postoperative radiotherapy. Patients undergoing chemotherapy were excluded. Clinical data were obtained from the records of reference centers for cancer treatment at Montes Claros city, Brazil, from August 1999 to April 2006.

The male-to-female ratio was 5:1 and the median age, 60 years (range: 32 to 94). Histopathological diagnosis was confirmed by morphological analysis in all patients. Anatomical sites of the lesions were: oral cavity (37/44.0%), oropharynx (29/34.5%), hypopharynx (7/8.3%), and larynx (11/13.1%). According to the TNM - American Joint Committee on Cancer (AJCC) 2003 staging system, there were 1 (1.2%) patient stage I, 8 (9.5%) stage II, 37 (44.0%) stage III and 38 (45.5%) stage IV patients.

Positive or close margins, perineural or lymphovascular infiltration, lymph node involvement, and Stage T3 or T4 were all indications for adjuvant irradiation. Standard radiotherapy with conventional two-dimensional technique was delivered with megavoltage (Cobalt-60 or 6MV linear accelerator). Total doses ranged from 50 to 70 Gy in daily fractions of 2 Gy, 5 times a week.

Morphological analysis

Histological analysis was performed on the initially biopsied specimens and surgical tissues obtained by excisional biopsy. Five- μ m-thick sections of the archived HNSCC lesions were cut, deparaffinized, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for morphological examination. All slices were oriented perpendicular to the base the tumor surface. Only biopsy specimens with proven tumor infiltration into the connective tissue were included. This analysis was carried out by an oral pathologist (AMBP) with no prior knowledge of the demographic or clinical characteristics of the patients from whom the samples were obtained. The epidemiological, clinical, and morphological features of the patients are presented in table 1.

Table 1. Epidemiological, clinical and morphological characteristics of the patients.

Variables	Number of patients (%)
Age	
≤ 45 years	12 (14.3%)
> 45 years	72 (85.7%)
Gender	
Male	71 (84.5%)
Female	13 (15.5%)
Family history of cancer	
Present	38 (45.2%)
Absent	45 (53.6%)
Primary site	
Oral cavity	37 (44.0%)
Oropharynx	29 (34.5%)
Larynx	11 (13.1%)
Hipopharynx	7 (8.3%)
Smoker	
No	3 (03.6%)
Yes / former smokers	81 (96.4%)
Alcohol user	
No	8 (9.5%)
Yes / former drinkers	76 (90.5%)
Histopathological grading (WHO)	
I	24 (28.6%)
II	33 (39.3%)
III	27 (32.1%)
Stage	
I	1 (1.2%)
II	8 (9.5%)
III	37 (44.0%)
IV	38 (45.5%)
T stage	
T1	3 (3.6%)
T2	19 (26.6%)
T3	41 (48.8%)
T4	21 (25.0%)
N stage	
N0	31 (36.9%)
N1	22 (26.2%)
N2	26 (31.0%)
N3	5 (6.0%)

DNA Extraction

DNA was isolated from ten 10- μ m-thick tissue sections from each tissue block of HNSCC specimens, using the DNeasy Tissue kit (Qiagen, Chatsworth, CA) according to the manufacturer's protocol.

ERCC1 Genotyping

The ERCC1 (G19007A) polymorphisms were determined by PCR–RFLP (restriction fragment length polymorphism)⁹. PCR was performed in a volume of 25 μ L containing 400 ng of DNA template, 0.5 μ L (20 pmol/ μ L) of each primer of sense primer (5'-TCA TCC CTA TTG ATG GCT TCT GCC C 3') and antisense primer (5'-GGC CCA GCA CAT AGT CGG GA 3'), 2.5 μ L dNTP-mix (25 mM of each, Amresco, Ohio, CA, USA), 2.5 μ L 10X PCR buffer, 1.25 μ L magnesium chloride (50 mM), and 2.5 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The PCR reaction was performed for 40 cycles (95 °C for 60 s, 57.5 °C for 30 s and 72 °C for 60 s) into a thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

The 252-bp PCR product from the ERCC1 gene was digested with BsrD1 (Fermentas Life Sciences) as follows: GG (252 bp), GA (252, 179, 73 bp) and AA (179, 73 bp). Thus, 10 μ L amplified DNA was digested with 2.5 U of BsrD1 for 12-16 h at 37°C. The restriction reactions were performed into a thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The PCR products were verified on 6.5% polyacrylamide gel electrophoresis at 180V of constant voltage for 1.5 h and visualized under ultraviolet (UV) light with ethidium bromide staining. Electrophoresis results were estimated regarding a 100-bp ladder.

DNA isolation and bisulfite conversion of DNA for methylation-specific PCR (MSP)

The ERCC1 gene methylation profile was evaluated through methylation-specific PCR (MSP)^{10, 11}. With bisulfate treatment, unmethylated cytosines of DNA are converted to uracil while methylated cytosines remain unmodified. About 1 ng of DNA of each sample was denatured by incubation with 2 μ L of 3M NaOH for 20 min at 50 °C. Then the samples were treated with sodium bisulfite (2.5 M) and hydroquinone (1 M) for 3 h at 70 °C. Modified DNA samples were purified with Wizard DNA purification resin according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA) and eluted in distilled H₂O; 3M NaOH were added to complete the modification and this

was followed by ethanol precipitation. The pellets were resuspended and 100 ng of DNA were used for the PCR assay.

PCR was performed in a volume of 25 μ L containing 100 ng of DNA template, 0.5 μ L (20 pmol/ μ L) of primer ERCC1 unmethylated: sense primer (5'- GTG GAG TTT TAT TGG TTT AT 3') and antisense primer (5'- AAA CAC CTT CTC AAA AAA T 3'); and primer ERCC1 methylated: sense primer (5'- GCG GAG TTT TAT CGG TTT AC 3') and antisense primer (5'-AAA CGC CTT CTC GAA AAA T 3'); 2.5 μ L dNTP-mix (25 mM of each, Amresco, Ohio, CA, USA), 2.5 μ L 10X PCR buffer, 1.25 μ L magnesium chloride (50 mM), and 2.5 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The PCR reaction was performed for 40 cycles (95 °C for 60 s, 56.5 °C for 30 s and 72 °C for 60 s) into a thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The PCR products for methylation fragments of the 167bp were verified on 6.5% polyacrylamide gel electrophoresis at 180 V of constant voltage for 1.5 h and stained with silver nitrate. Electrophoresis results were estimated regarding a 100-bp ladder.

Immunohistochemical reactions

Paraffin sections of 3 μ m-thick were mounted in slides, treated and submitted to immunohistochemical method for ERCC1 proteins. The primary antibodies against mouse monoclonal antibody ERCC1 (clone 8F1, Abcam, Cambridge, UK) were detected with the aid of an LSAB™ visualisation kit (K0690; Dako, Glostrup, Denmark) employing the chromogen diaminobenzidine for colour development. Slices were finally counterstained with Mayer's hematoxylin and mounted. Positive controls were sections of oral carcinoma that previously shown to be positives for investigated antibodies. Negative controls were obtained by substituting normal whole rabbit serum (X0902; Dako) by the primary antibodies. Only cells that presented brown nuclear staining were considered positive.

The immunohistochemical expression of the biomarker was evaluated in an Olympus® binocular optical microscope, BH2x10 ocular and x40 objective lens. An ocular lattice (grid) with 100 points composed of 10 horizontal and 10 vertical test lines measuring 0.092 mm² was superimposed on the fields to be measured. Immunohistochemical analyses of ERCC1 proteins were performed by the percentage of positively staining cells in all counted fields (12 fields for each specimen). Immunolocalization of the ERCC1 protein was evaluated in the invasive front of tumors

and also in their surface and central areas. The percentages of positive nuclei were calculated for each sample, and a proportion score was assigned $\leq 30\%$ as low expression and $> 30\%$ as high expression, adapted from a previous study¹².

Statistical analysis

Analyses among clinicopathological variables, methylation status, polymorphism (G19007A), and immunohistochemical expression of ERCC1 were performed by bivariate (Chi-square and Fisher exact tests) and multivariate (binary logistic regression models) statistical tests. The data were fit to the best-fit models. Associations among variables were considered to be significant when the confidence level was $> 95\%$ ($p \leq 0.05$). Software SPSS® 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for the analyses.

RESULTS

The allele A genotype variant for the ERCC1 gene was observed in 79.8% of the samples and the GG genotype occurred in 17 (20.2%) patients. The GA genotype was observed in 24 (28.6%), and the AA genotype in 43 (51.2%) cases. Regarding the status of methylation of the promoter region of ERCC1, we found that 43 (51.2%) patients showed methylated status and 41 (48.8%) had non-methylated status. With respect to the expression of ERCC1, 14 (16.7%) patients with low immunohistochemical expression of ERCC1 protein were observed, whereas 70 (83.3%) patients showed high expression of ERCC1 protein. The immunohistochemical expression showed strong nuclear staining, predominantly localized in the invasive front of the lesion (Figure 1).

Figure 1

A) Analysis of ERCC1 polymorphisms: Lane 0, 100bp molecular marker; Lane 1 represents GA (252bp, 179bp and 73bp) heterozygous polymorphic genotype; Lane 2, AA (179bp and 73bp) homozygous genotype, and Lane 3, GG (252bp) homozygous genotype. **B)** Methylation-specific PCR of ERCC1 gene. ‘M’ (167bp) and ‘U’ (167bp) represent primer sets specific to methylated and unmethylated DNA, respectively. Lane 0, 100bp molecular marker; Samples 1 and 2 contain methylated DNA indicative of the presence ERCC1 methylation; Sample 3 shows the unmethylated status of ERCC1 gene due to the absence of methylated reaction. **C)** Positive immunostaining of ERCC1 protein (magnification X400).

The polymorphism and methylation status of the ERCC1 gene were not associated with the tissue expression of ERCC1 protein ($p > 0.05$) (Table 2).

There was a higher prevalence of the allele A variant of the ERCC1 gene in patients over 45 years ($p = 0.059$). Also, a higher proportion of patients aged over 45 years in the HNSCC samples that showed high immunohistochemistry expression of ERCC1 protein was observed ($p = 0.012$). A greater proportion of patients with advanced TNM stage was present among individuals with high expression of ERCC1 ($p = 0.018$). Associations among epidemiological, clinical and morphological variables are presented in table 3.

Multivariate analysis of the association of the methylation status of the ERCC1 with the studied variables showed that the prevalence of the methylated status was higher in individuals with advanced stage (III/IV) than in those with early disease (OR = 9.12; 95%CI: 1.04 – 80.38; $p = 0.047$), as well as in patients without distant

metastases (OR = 6.67; 95%CI: 1.40 – 33.33; p = 0.019). Multivariate analysis of immunohistochemical expression of ERCC1 demonstrated that patients aged over 45 showed a higher prevalence of HNSCC samples with high immunohistochemical expression (OR = 4.86; 95%CI: 1.2 – 19.7; p = 0.027), as well as in patients with advanced stage (OR = 5.04; 95%CI: 1.07 – 23.7; p = 0.041).

Table 2. Relationship between expression, methylation and polymorphisms of ERCC1 (Qui-square test).

Molecular parameters ERCC1		Polymorphisms		Immunoexpression	
		GG	GA/AA	Low	High
Methylation Status					
Un-Methylated		8 (47.1%)	33 (49.3%)	7 (50.0%)	34 (48.6%)
Methylated		9 (52.9%)	34 (50.7%)	7 (50.0%)	36 (51.4%)
p-value		(0.872)		0.922	
Immunoexpression					
Low		2 (11.8%)	4 (28.6%)	-	-
High		15 (88.2%)	20 (28.6%)	-	-
p-value		0.544		-	

Table 3. Associations of epidemiological, clinical and morphological variables with polymorphism, methylation status and immunohistochemical expression of ERCC1 protein (Qui-square and Fisher's exact tests).

Variables	ERCC1					
	Polymorphism		Methylation status		Expression	
	Number of patients (%)		Number of patients (%)		Number of patients (%)	
Age	GG	GA/AA	U	M	Low	High
≤ 45 years	0 (0%)	12 (17.9%)	6 (14.6%)	6 (14.0%)	5 (35.7%)	7 (10.0%)
> 45 years	17 (100%)	55 (82.1%)	35 (85.4%)	37 (86.0%)	9 (64.3%)	63 (90.0%)
p-value	0.059		0.587		0.012	
Gender						
Female	3 (17.6%)	10 (14.9%)	36 (87.8%)	35 (81.4%)	2 (14.3%)	11 (15.7%)
Male	14 (82.4%)	57 (85.1%)	5 (12.2%)	8 (18.6%)	12 (85.7%)	59 (84.3%)
p-value	0.782		0.306		0.893	
FHC						
Absent	11 (64.7%)	34 (51.5%)	20 (48.8%)	25 (59.5%)	8 (57.1%)	37 (53.6%)
Present	6 (35.3%)	32 (48.5%)	21 (51.2%)	17 (40.5%)	6 (42.9%)	32 (46.4%)
p-value	0.330		0.223		0.810	
T stage						
T1/T2	2 (11.8%)	20 (29.9%)	12 (29.3%)	10 (23.3%)	5 (35.7%)	17 (24.3%)
T3/T4	15 (88.2%)	47 (70.1%)	29 (70.7%)	33 (76.7%)	9 (64.3%)	53 (75.7%)
p-value	0.130		0.531		0.375	
N stage						
N0	6 (35.3%)	25 (37.3%)	17 (41.5%)	14 (32.6%)	8 (57.1%)	23 (32.9%)
N1/N2/N3	11 (64.7%)	42 (62.7%)	24 (58.5%)	29 (67.4%)	6 (42.9%)	47 (67.1%)
p-value	0.878		0.268		0.086	
Stage						
I/II	2 (11.8%)	7 (10.4%)	6 (14.6%)	3 (7.0%)	4 (28.6%)	5 (7.1%)
III/IV	15 (88.2%)	60 (89.6%)	35 (85.4%)	40 (93.0%)	10 (71.4%)	65 (92.9%)
p-value	0.875		0.218		0.018	
Primary site						
Anterior	6 (35.3%)	31 (46.3%)	20 (48.8%)	17 (39.5%)	7 (50%)	30 (42.9%)
Posterior	11 (64.7%)	36 (53.7%)	21 (51.2%)	26 (60.5%)	7 (50%)	40 (57.1%)
p-value	0.416		0.263		0.623	
WHO						
I	6 (35.3%)	18 (26.9%)	13 (31.7%)	11 (25.6%)	4 (28.6%)	20 (28.6%)
II/III	11 (64.7%)	49 (73.1%)	28 (68.3%)	32 (74.4%)	10 (71.4%)	50 (71.4%)
p-value	0.492		0.543		0.989	

DISCUSSION

ERCC1 is involved in both recognition of the damage, and the incision of the damaged part of DNA¹³. The analysis of allelic polymorphism of ERCC1 in HNSCC samples of this study revealed that the frequency of ERCC1 G19007A was 0.79 for the allele A. Some studies in the Caucasian population found an association between a polymorphism of ERCC1 G19007A and the occurrence of several types of malignancies¹⁴⁻¹⁹. Carriers of AA genotype in ERCC1 G19007A presented increased risk for basal cell carcinoma, breast cancer and lung cancer^{15, 17-19}. However, the same ERCC1 G9007A polymorphism was studied in colorectal cancer, and no clear association was found²⁰. The results published in the literature are conflicting and insufficient to clarify whether the allelic variation of the ERCC1 polymorphism determines directly the clinical pattern of disease.

Some of the allelic variants polymorphic of DNA repair genes may be associated with reduced repair capacity and increased susceptibility to cancer²¹. Because it is a DNA repair gene, we speculate that the occurrence of the A allele may be important in the early stages of carcinogenesis^{11, 21, 22}.

The allelic polymorphism of ERCC1 and its methylation status were not associated with the level of immunohistochemical expression of ERCC1 protein in our samples. Likewise, there was no association between the polymorphism and the methylation status of ERCC1. Nevertheless, the immunohistochemical expression of the protein was higher in patients aged over 45 years and among patients with advanced disease. In parallel, the methylated status of ERCC1 gene was predominantly evident among patients without distant metastases. The gene methylation is a random process and potentially reversible, whose impact on protein expression can not be predicted or measured^{23, 24}. Even in the presence of high expression of ERCC1 immunohistochemistry, we speculate that methylation of their promoters would be responsible for the inefficient repair, which could have increased the radiosensitivity of tissue, improving local control and decreasing the incidence of distant metastases. The real role of ERCC1 in the behavior of systemic disease is unclear and our results may have been only incidental. There are no clinical studies evaluating the prognostic value of ERCC1 methylation in head and neck cancer, especially in patients undergoing radiotherapy as the only adjuvant treatment. We consider this, the main feature of our study. However, keeping in mind the number of cases analyzed here and the lack of

comparative data with previous studies of the same nature, we can not say that the methylation of ERCC1 is the factor responsible for the systemic spreading pattern of disease in our patients.

Carles et al.⁸, in a study involving patients with early cancer of head and neck treated with radiotherapy alone with curative intent, demonstrated the influence of polymorphisms of ERCC1 in the therapeutic response and, therefore, time to disease progression and overall survival. This study provides important evidences that the pattern of response to radiotherapy can change according to the genotype of ERCC1. The incidence of locoregional recurrence could not be explained by any of the molecular factors evaluated in our study. A study of a population under controlled clinical and nutritional conditions could contribute to the evaluation of the radiosensitivity of patients according to the ERCC1 polymorphisms.

We found a high expression of ERCC1 in 83.3% of the samples of HNSCC. These values are consistent with previous studies in head and neck cancer^{7, 12}. The phenotype of the cancer may appear either due to the intrinsic or extrinsic mutations or to the persistence of mutations caused by environmental carcinogens as a result of insufficient repair of damaged DNA over time. This may be the cause of higher prevalence of patients aged over 45 years showing high expression of ERCC1 protein in our samples. However, it is important to note that although epidemiological studies can provide *in vivo* evidence of the relationship between the pattern of gene expression of DNA repair and cancer risk, association studies do not prove causality²⁵. The high expression of ERCC1 in more aggressive forms of HNSCC in our sample could be justified by the increased number of cells expressing ERCC1 protein in an attempt to contain the frequent damage to cellular DNA.

In conclusion, a high frequency of the allele A, and immunohistochemical expression of ERCC1 was observed in this population, mainly in individuals over 45 years. High immunohistochemical expression of ERCC1 was also related to patients with more advanced disease.

A higher proportion of methylated status was observed in patients with locally advanced disease and in patients without distant metastases.

The polymorphism and methylation status of the ERCC1 were not associated with the tissue expression of ERCC1 protein.

There was no correlation between histological grade of HNSCC and the studied molecular aspects of ERCC1 (GA allelic ERCC1 polymorphism, ERCC1 methylation and immunohistochemical expression of ERCC1 protein

REFERENCES

1. Koskinen WJ, Partanen J, Vaheri A, Aaltonen LM. HLA-DRB1, -DQB1 alleles in head and neck carcinoma patients. *Tissue Antigens* 2006;**67**;237-240.
2. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008;**371**;1695-1709.
3. Toruner GA, Ulger C, Alkan M *et al.* Association between gene expression profile and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;**154**;27-35.
4. Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T *et al.* Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2001;**97**;1172-1179.
5. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;**349**;2042-2054.
6. Olausson KA, Dunant A, Fouret P *et al.* DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006;**355**;983-991.
7. Handra-Luca A, Hernandez J, Mountzios G *et al.* Excision repair cross complementation group 1 immunohistochemical expression predicts objective response and cancer-specific survival in patients treated by Cisplatin-based induction chemotherapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;**13**;3855-3859.
8. Carles J, Monzo M, Amat M *et al.* Single-nucleotide polymorphisms in base excision repair, nucleotide excision repair, and double strand break genes as markers for response to radiotherapy in patients with Stage I to II head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;**66**;1022-1030.
9. Wang SL, Zhao H, Zhou B *et al.* Polymorphisms in ERCC1 and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population. *Leuk Res* 2006;**30**;1341-1345.
10. Chen HY, Shao CJ, Chen FR, Kwan AL, Chen ZP. Role of ERCC1 promoter hypermethylation in drug resistance to cisplatin in human gliomas. *Int J Cancer* 2010;**126**;1944-1954.
11. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**;9821-9826.
12. Jun HJ, Ahn MJ, Kim HS *et al.* ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation. *Br J Cancer* 2008;**99**;167-172.
13. Hoeijmakers JH. From xeroderma pigmentosum to the biological clock contributions of Dirk Bootsma to human genetics. *Mutat Res* 2001;**485**;43-59.
14. Winsey SL, Haldar NA, Marsh HP *et al.* A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res* 2000;**60**;5612-5616.

15. Nexø BA, Vogel U, Olsen A *et al.* A specific haplotype of single nucleotide polymorphisms on chromosome 19q13.2-3 encompassing the gene RAI is indicative of post-menopausal breast cancer before age 55. *Carcinogenesis* 2003;**24**;899-904.
16. Tomescu D, Kavanagh G, Ha T, Campbell H, Melton DW. Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. *Carcinogenesis* 2001;**22**;403-408.
17. Vogel U, Nexø BA, Wallin H, Overvad K, Tjønneland A, Raaschou-Nielsen O. No association between base excision repair gene polymorphisms and risk of lung cancer. *Biochem Genet* 2004;**42**;453-460.
18. Yin J, Hedayati MA, Grossman L, Bolund L, Nexø BA. Rapid genotyping of human ERCC1 exon 4 polymorphism with fluorescence analysis using fluorophore-labeled hybridization probes and a lightcycler. *Biochem Genet* 2002;**40**;143-148.
19. Yin J, Vogel U, Gerdes LU, Dybdahl M, Bolund L, Nexø BA. Twelve single nucleotide polymorphisms on chromosome 19q13.2-13.3: linkage disequilibria and associations with basal cell carcinoma in Danish psoriatic patients. *Biochem Genet* 2003;**41**;27-37.
20. Mort R, Mo L, McEwan C, Melton DW. Lack of involvement of nucleotide excision repair gene polymorphisms in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2003;**89**;333-337.
21. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;**11**;1513-1530.
22. Sturgis EM, Dahlstrom KR, Spitz MR, Wei Q. DNA repair gene ERCC1 and ERCC2/XPD polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;**128**;1084-1088.
23. Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol* 2004;**14**;427-432.
24. Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene* 2003;**22**;6479-6483.
25. Gossage L, Madhusudan S. Current status of excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in cancer. *Cancer Treat Rev* 2007;**33**;565-577.