



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA,  
BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO – PPGGBC**

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE  
BIOTRANSFORMAÇÃO E REPARO DE DNA COM A SOBREVIVÊNCIA DE  
PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM CARCINOMA DAS VIAS  
AERODIGESTIVAS SUPERIORES**

**PEDRO AMORIM NOVAIS**

**Jequié-BA  
2018**

**PEDRO AMORIM NOVAIS**

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE  
BIOTRANSFORMAÇÃO E REPARO DE DNA COM A SOBREVIVÊNCIA DE  
PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM CARCINOMA DAS VIAS  
AERODIGESTIVAS SUPERIORES**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Diniz Bezerra.  
Coorientadores: Profa. Dra. Ana Angélica Leal Barbosa e Prof. Dr. Thiago Magalhães da Silva.

**Jequié-BA**

**2018**

N814a Novais, Pedro Amorim.

Associação de polimorfismos em genes de biotransformação e reparo de dna com a sobrevida de pacientes diagnosticados com carcinoma das vias aerodigestivas superiores / Pedro Amorim Novais.- Jequié, 2018.  
59f.

(Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Profa. Dra. Profa. Dra. Débora Diniz Bezerra e co-orientadoras Profa. Dra. Ana Angélica Leal Barbosa e Prof. Dr. Thiago Magalhães da Silva)

1.Câncer 2.Região sul da Bahia Reparo do DNA 3.Sobrevida 4.Variantes genéticas  
5.Xenobióticos I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título

CDD – 616.994071

Rafaella Cância Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO

Campus Jequié-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** "Análise de associação de polimorfismos em genes de biotransformação e reparo de DNA com a sobrevivência de pacientes diagnosticados com carcinoma das vias aerodigestivas superiores".

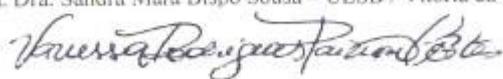
**Autor (a):** Pedro Amorim Novais

**Orientador (a):** Profa. Débora Diniz Bezerra

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, pela Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Débora Diniz Bezerra – UESB / Jequié-BA

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Sandra Mara Bispo Sousa – UESB / Vitória da Conquista-BA

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Vanessa Rodrigues Paixão Côrtes – UFBA / Salvador-BA

Data de realização: 21 de março de 2018.

Dedico este trabalho a minha querida e saudosa  
avó Nina.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, em especial a minha mãe Elizabete, a minha irmã Denise, ao meu sobrinho Marcos Antônio e a minha tia Terezinha, por todo o apoio.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação pelos ensinamentos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Débora Diniz Bezerra, pela atenção e suporte.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Ana Angélica Leal Barbosa, pelos ensinamentos e disponibilidade.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Thiago Magalhães da Silva, pela orientação.

À Profa. Me. Jamille Silva Oliveira pelos ensinamentos sobre a rotina laboratorial e técnicas utilizadas nessa pesquisa.

Aos meus colegas da turma 2016, Camilla, Jennifer, Jéssica, Joaly, Lúcio, Nathana, Silvana e Stéfane, pelos bons momentos vivenciados.

Às professoras, Dra. Patrícia Santos Pereira Lima e Dra. Sandra Mara Bispo Sousa, pela oportunidade de continuar com os meus experimentos no laboratório de Genética da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Vitória da Conquista/BA.

Às discentes Inácia e Mariane que me ajudaram na rotina do laboratório de Genética da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Vitória da Conquista/BA.

Às colegas Alice, Jucineide e Taynara do grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Humana, *campus* de Jequié.

Às funcionárias dos setores de arquivo do Hospital Calixto Midlej Filho, Patrícia e Alice, e do Hospital São José, Odete e Tereza, pela ajuda na verificação dos prontuários dos pacientes.

Enfim, a todas as pessoas que participaram dessa minha jornada.

## BIOGRAFIA

Pedro Amorim Novais, filho de Elizabete de Amorim Bastos e Osmar Lima Novais, nasceu em Vitória da Conquista – Bahia, aos 13 dias do mês de agosto de 1980. Estudou no Instituto São Tarcísio onde concluiu o ensino médio. Coursou Biomedicina na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, localizada no município de Ilhéus – Bahia. Em 2008 formou-se Bacharel em Biomedicina. Em 2016 foi aprovado no Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Jequié. Nele desenvolveu projeto de pesquisa relacionado à associação de polimorfismos em genes de biotransformação e reparo de DNA com a sobrevida de pacientes diagnosticados com carcinoma das vias aerodigestivas superiores na região sul do estado da Bahia. Durante a Pós-Graduação, teve como orientadora a Profa. Dra. Débora Diniz Bezerra e como coorientadores a Profa. Dra. Ana Angélica Leal Barbosa e o Prof. Dr. Thiago Magalhães da Silva. A defesa da dissertação do mestrado ocorreu no dia 21 de março de 2018, às 9h, na sala de reunião do PPGGBC, *campus* de Jequié.

## RESUMO

O carcinoma das vias aerodigestivas superiores (CVAS) é responsável por alta incidência de óbitos e baixa sobrevida. Variáveis epidemiológicas como sexo masculino, idade avançada, baixa escolaridade, cor da pele não branca e estágio avançado do tumor estão associadas a um pior prognóstico. O tabagismo e o etilismo são fatores de risco bem estabelecidos para o CVAS. Fatores genéticos do hospedeiro também podem estar implicados no desenvolvimento do câncer como os polimorfismos em genes de biotransformação e reparo de DNA. Variantes genéticas nesses genes podem interferir nas atividades das enzimas envolvidas nas vias de metabolismo de xenobióticos e nas vias de reparo de DNA desempenhando um importante papel na suscetibilidade à doença e na taxa de sobrevida. Este trabalho teve por objetivo analisar a associação entre os polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*, *XRCC1*, *HOGG1* e *NAT2* com a sobrevida global, intervalo entre a data do diagnóstico e a data do óbito por qualquer causa, e sobrevida livre de doença, intervalo entre a data do diagnóstico e a data da recorrência do tumor, em pacientes diagnosticados com CVAS na região sul do estado da Bahia. Através da análise dos prontuários médicos, foram obtidas as informações referentes à data do diagnóstico, à data do óbito e à data da recorrência do tumor de 101 pacientes, com idades variando entre 30 e 92 anos, sendo 89 homens. Com relação à sobrevida global, as maiores diferenças médias foram observadas na comparação entre os genótipos do gene *GSTT1* e entre os genótipos combinados dos genes *GSTM1* e *GSTT1*. Pacientes com genótipo *GSTT1 Não Nulo* ou com combinação dos genótipos *GSTM1 Nulo* e *GSTT1 Não Nulo* apresentaram maiores valores de sobrevida global. Com relação à sobrevida livre de doença, as maiores diferenças médias foram observadas na comparação entre os fenótipos do gene *NAT2* e entre os genótipos/fenótipos combinados dos genes *CYP1A1* e *NAT2*. Pacientes com fenótipo *NAT2 acetilador rápido ou intermediário* ou com combinação dos genótipos/fenótipos *CYP1A1 TT* e *NAT2 acetilador rápido ou intermediário*, *CYP1A1 TT* e *NAT2 acetilador lento*, *CYP1A1 TC* ou *CC* e *NAT2 acetilador rápido ou intermediário* apresentaram maiores valores de sobrevida livre de doença. Embora consideráveis, as diferenças observadas não foram estatisticamente significantes.

**PALAVRAS-CHAVE:** Câncer, região sul da Bahia, reparo do DNA, sobrevida, variantes genéticas, xenobióticos.

## ABSTRACT

Squamous cell carcinoma upper aerodigestive is responsible for high incidence of death and low survival. Epidemiological variables such as male sex, advanced age, low schooling, non-white skin color and advanced stage of the tumor are associated with a worse prognosis. Smoking and alcoholism are well-established risk factors for squamous cell carcinoma upper aerodigestive. Genetic factors of the host may also be implicated in the development of cancer as the polymorphisms in biotransformation and DNA repair genes. Genetic variants in these genes may interfere with the activities of the enzymes involved in xenobiotic metabolism pathways and DNA repair pathways, playing an important role in disease susceptibility and survival rate. The aim of this study was to analyze the association between the *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*, *XRCC1*, *HOGG1* and *NAT2* gene polymorphisms with overall survival (interval between the date of diagnosis and the date of death from any cause) and disease-free survival (interval between the date of diagnosis and the date of tumor recurrence) in patients diagnosed with squamous cell carcinoma upper aerodigestive in the southern region of the state of Bahia. Through the analysis of the medical records, the information regarding the date of diagnosis, the date of death and the date of tumor recurrence were obtained from 101 patients, ranging in age from 30 to 92 years, being 89 men. Regarding overall survival, the largest mean differences were observed in the comparison between the genotypes of the *GSTT1* gene and between the combined genotypes of the *GSTM1* and *GSTT1* genes. Patients with *GSTT1 No Null* genotype or with combination of *GSTM1 Null* and *GSTT1 No Null* genotypes had higher overall survival values. Regarding disease-free survival, the largest mean differences were observed in the comparison between the phenotype of the *NAT2* gene and between the combined genotypes/phenotype of the *CYP1A1* and *NAT2* genes. Patients with phenotype *NAT2 rapid or intermediate acetylator* or with combination genotypes/phenotype of *CYP1A1 TT* and *NAT2 rapid or intermediate acetylator*, *CYP1A1 TT* and *NAT2 slow acetylator*, *CYP1A1 TC or CC* and *NAT2 rapid or intermediate acetylator* had higher disease-free survival values. Although considerable, the observed differences were not statistically significant.

**KEYWORDS:** Cancer, southern region of Bahia, DNA repair, survival, genetic, xenobiotics.

## LISTAS DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1.</b> Curvas de sobrevida global: 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G.....	50
<b>Figura 2.</b> Curvas de sobrevida livre de doença: 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G.....	51
<b>Figura 3.</b> Curvas de sobrevida global (Genes combinados): 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, 3G, 3H.....	52
<b>Figura 4.</b> Curvas de sobrevida livre de doença (Genes combinados): 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F, 4G, 4H.....	53

## LISTAS DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.</b> Reagentes utilizados nas reações da Reação em Cadeia da Polimerase.....	54
<b>Tabela 2.</b> Primers utilizados nas reações da Reação em Cadeia da Polimerase.....	54
<b>Tabela 3.</b> Enzimas de restrição utilizadas na digestão dos materiais amplificados nas reações da Reação em Cadeia da Polimerase.....	55
<b>Tabela 4.</b> Características dos pacientes diagnosticados com CVAS.....	56
<b>Tabela 5.</b> Tempo médio de sobrevida global dos pacientes diagnosticados com CVAS.....	57
<b>Tabela 6.</b> Tempo médio de sobrevida livre de doença dos pacientes diagnosticados com CVAS.....	57
<b>Tabela 7.</b> Tempo médio de sobrevida global dos pacientes diagnosticados com CVAS (Genes combinados).....	58
<b>Tabela 8.</b> Tempo médio de sobrevida livre de doença dos pacientes diagnosticados com CVAS (Genes Combinados).....	58

## LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**BER:** Base Excision Repair (Reparo por Excisão de Base)

**CACON:** Centro de Alta Complexidade em Oncologia da Santa Casa de Itabuna

**Clioni:** Clínica Oncológica de Ilhéus

**CVAS:** Carcinoma das Vias Aerodigestivas Superiores

**CYP1A1:** Enzima do complexo citocromo P450

**GST:** Enzima glutationa-S-transferase

**HOGG1:** Enzima 8-oxiguanina DNA glicosilase humana

**HPV:** Human Papiloma Virus (Vírus Papiloma Humano)

**IARC:** International Agency for Research on Cancer (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer)

**INCA:** Instituto Nacional do Câncer

**NAT2:** Enzima N-acetil-transferase2

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PAH:** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos)

**SNP:** Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Nucleotídeo Simples)

**XRCC1:** Enzima de reparo de raios-X por complementação cruzada

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>21</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>22</b>
<b>5. CAPÍTULO 1: ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE BIOTRANSFORMAÇÃO E REPARO DE DNA COM A SOBREVIVÊNCIA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM CARCINOMA DAS VIAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES. ....</b>	<b>31</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>RECRUTAMENTO DOS VOLUNTÁRIOS .....</b>	<b>35</b>
<b>EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO .....</b>	<b>35</b>
<b>GENOTIPAGEM DOS GENES <i>XRCCI</i> E <i>HOGGI</i> POR PCR-RFLP .....</b>	<b>35</b>
<b>ANÁLISE DO POLIMORFISMO <i>MspI</i> DO GENE <i>CYP1A1</i> POR PCR-RFLP .....</b>	<b>35</b>
<b>AMPLIFICAÇÃO DE DNA ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O GENE <i>NAT2</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTITUIÇÕES DE SIMPLES NUCLEOTÍDEOS COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO (RFLP) PARA O GENE <i>NAT2</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>GSTM1</i> E <i>GSTT1</i> ATRAVÉS DE MULTIPLEX PCR.....</b>	<b>36</b>
<b>ANÁLISE DO POLIMORFISMO <i>BsmI</i> DO GENE <i>GSTP1</i> POR PCR-RFLP .....</b>	<b>36</b>
<b>ANÁLISES DE INTERAÇÃO GENE-GENE .....</b>	<b>36</b>
<b>MEDIDAS DE SOBREVIVÊNCIA .....</b>	<b>38</b>
<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....</b>	<b>39</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>59</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de tecnologias de manipulação e análise do DNA proporcionou aos cientistas localizar e identificar os genes responsáveis pela codificação de proteínas humanas essenciais, assim como analisar possíveis mutações. Além disso, evidências científicas mostraram que hábitos de vida e ambiente social podem alterar a expressão dos genes.

Todo esse conhecimento trouxe valiosas informações sobre diversas doenças, em especial, o câncer. Dessa forma, esses estudos contribuíram na prevenção, na melhora do diagnóstico e no aumento da sobrevida dos pacientes diagnosticado com essa enfermidade. A maioria dos cânceres de células somáticas ocorre devido a uma série de mutações a nível celular.

O câncer das vias aerodigestivas superiores é um dos carcinomas mais incidentes na população mundial ocorrendo na região da cabeça e pescoço. O risco de desenvolvimento desse tipo de câncer pode estar associado a fatores ambientais e à presença de polimorfismos nos genes que participam do reparo do DNA por excisão de base e nos genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos.

Os principais fatores ambientais associados à doença são o tabagismo e o etilismo. A fumaça do cigarro apresenta em sua constituição substâncias mutagênicas e carcinogênicas. O álcool consumido em excesso pode desencadear processos mutagênicos devido à presença de acetaldeído, substância carcinogênica resultante da metabolização do etanol.

Alguns dos polimorfismos genéticos mais estudados em relação a esses tipos de cânceres são os presentes nos genes da enzima de reparo de raios-X por complementação cruzada (*XRCC1*), da enzima 8-oxiguanina DNA glicosilase humana (*HOGG1*), da enzima N-acetil-transferase2 (*NAT2*), da enzima glutationa-S-transferase (*GST*) e da enzima do complexo citocromo P450 (*CYP1A1*).

O sistema de reparo por excisão de bases (BER) é um dos mecanismos mais importantes utilizados pela célula para remover bases incorretas ou danificadas. Com a ação de enzimas específicas, a base modificada é substituída por outra, restabelecendo o sistema de complementaridade.

A via de metabolização de xenobióticos remove os compostos químicos estranhos ao organismo. Essa via metabólica ocorre principalmente no fígado e é dividida em duas fases. Na fase I, o xenobiótico é ativado principalmente pela ação de enzimas do complexo *CYP450*,

a exemplo da *CYP1A1*, transformando-o em composto intermediário reativo. Na fase II, o composto intermediário reativo sofre detoxificação pelas enzimas de segunda passagem, como as *GSTs* e *NAT2*, para posterior excreção. Caso esses processos não ocorram, o intermediário reativo poderá interagir com o DNA, desencadeando processos mutacionais que poderão ocasionar no desenvolvimento do câncer. Estudos realizados na região sudeste de Brasil sugeriram que polimorfismos genéticos nos genes da fase I e II do metabolismo de xenobióticos estão associados ao risco e à recorrência de tumores no CVAS.

Com análise dos prontuários médicos dos pacientes diagnosticados com CVAS foi possível calcular a sobrevida global, compreendida entre o intervalo da data do diagnóstico da doença e a data do óbito por qualquer motivo, e a sobrevida livre de doença, compreendida entre a data do diagnóstico da doença e a data de recorrência do tumor.

A associação de polimorfismos nesses genes com a sobrevida de pacientes diagnosticados com carcinoma das vias aerodigestivas superiores vem sendo realizada em algumas regiões do Brasil e do mundo. Esta é a primeira vez em que foi feita essa mesma investigação com indivíduos da região sul do estado da Bahia. Esse empenho inicial objetivou determinar o impacto de variações genotípicas nesses diferentes genes nas medidas de sobrevida dessa amostra populacional, incentivando o desenvolvimento de novas pesquisas em localidades que estão fora das regiões sul e sudeste do Brasil.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O câncer se tornou uma importante questão de saúde global. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que, no ano de 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos de câncer, com 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivendo com a doença (Instituto Oncoguia, 2015). Em todo o mundo, o câncer de pulmão é o tipo mais comum no sexo masculino, seguido do câncer de próstata. No sexo feminino a maior incidência é o câncer de mama, seguido do câncer colorretal. Quando comparada a incidência entre os dois sexos, o câncer de pulmão é o de maior prevalência (IARC, 2012).

O carcinoma das vias aerodigestivas superiores (CVAS) é o sexto carcinoma mais comum em todo o mundo (Braakhuis *et al.*, 2012). O tipo predominante consiste em carcinoma de células escamosas (95,5%), enquanto que 4,5% são adenocarcinomas da glândula salivar ou melanomas. Dentro da família do CVAS, o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço é um tipo particularmente agressivo de tumor que se desenvolve no revestimento epitelial das mucosas da cavidade oral e do trato aerodigestivo superior. É uma doença clínica, patológica, fenotípica e biologicamente heterogênea derivada de múltiplas alterações celulares e moleculares do epitélio escamoso (Vikram *et al.*, 1984; Vitelli *et al.*, 2018).

O CVAS ocorre em mais de 550.000 pessoas em todo o mundo. É um tipo de câncer frequente nos Estados Unidos com aproximadamente 50.000 pacientes diagnosticados por ano e causa mais de 12.000 mortes anualmente (Singh *et al.*, 2017; Vougiouklakis *et al.*, 2017). O número de casos desse tipo de câncer vem crescendo nos últimos anos. No Brasil essa realidade não é diferente. Segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para 2018, cerca de 600 mil novos casos da doença são esperados no país. Neste período, estima-se 14.700 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e mulheres (Instituto Nacional do Câncer, 2018).

Os principais sítios anatômicos primários do CVAS são a cavidade oral, a orofaringe, a nasofaringe, a hipofaringe e a laringe (Hopkins *et al.*, 2008). O câncer na cavidade oral e na orofaringe constitui a maioria dos casos do CVAS (Adilbay *et al.*, 2018). O carcinoma na laringe é um dos tumores mais malignos de células escamosas de cabeça e pescoço e geralmente apresenta prognóstico ruim. O tempo de sobrevivência do câncer de laringe não aumentou, apesar dos progressos no desenvolvimento da cirurgia e da radioterapia (Cai *et al.*, 2017).

Ao longo da década passada, houve uma redução do câncer de laringe e hipofaringe, mudança observada em paralelo com a diminuição no consumo do cigarro, e um aumento constante de câncer de orofaringe, relacionado à exposição de alto risco ao vírus papiloma

humano (HPV) (Marur & Forastiere, 2016; Singh *et al.*, 2017). O CVAS ocorre mais frequentemente nos homens que nas mulheres, mas estudos recentes têm demonstrado o aumento da incidência no sexo feminino e uma redução no número dos casos no sexo masculino em certos grupos demográficos. Nos países nórdicos, carcinomas da cavidade oral e da faringe têm crescido rapidamente entre as mulheres. Nos Estados Unidos, as mulheres negras têm apresentado aumento na incidência desses tipos de cânceres. Uma explicação para isso seria que elas vêm adotando os hábitos que antes eram predominantes entre os homens, como o consumo exagerado de bebida alcoólica e de cigarro, além dos fatores genéticos (Curado & Hashibe, 2009; Farnebo *et al.*, 2015).

Cirurgia, radioterapia e quimioterapia em várias combinações são utilizadas no gerenciamento do CVAS, dependendo do estágio do tumor e do sítio primário (Marur & Forastiere, 2016). Apesar do uso de terapias multimodais em contextos clínicos, incluindo cirurgia, radioterapia, quimioterapia e, mais recentemente, a imunoterapia, a qualidade de vida e a taxa de sobrevivência estão longe de ser satisfatórias em pacientes com CVAS (Tan *et al.*, 2017; Vitelli *et al.*, 2018). Tratamentos visando receptores específicos de fatores de crescimento na membrana celular ou mutações na via de sinalização em pacientes com metástase estão em investigação (Marur & Forastiere, 2016).

Aproximadamente 60% dos pacientes com CVAS são diagnosticados com a doença já em estágio avançado e a taxa de sobrevivência de 5 anos fica em torno dos 30% (Leduc *et al.*, 2018). Análises mostraram que a adição de cisplatina, um importante agente antineoplásico, simultaneamente à radioterapia aumentou a sobrevida global e a preservação dos órgãos, e aproximadamente 50% dos pacientes sobreviveram mais de 5 anos (Ang *et al.*, 2014). Pacientes com recorrência de CVAS tratados com quimioterapia à base de platina tiveram prognóstico ruim com média de sobrevida global de aproximadamente 10 meses (Vermorken *et al.*, 2008).

As causas do câncer podem ser internas e externas. O tabagismo e o etilismo são considerados um dos principais fatores ambientais de risco, pois a fumaça do cigarro e o álcool apresentam substâncias carcinogênicas em suas composições (Khelifi *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2017). A exposição ao tabaco, seja ativa ou passiva, é o principal fator de risco para o CVAS (Ansary-Moghddam *et al.*, 2009; Adilbay *et al.*, 2018). Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), N-nitrosaminas e aminas aromáticas heterocíclicas estão presentes no tabaco. O etanol e o seu metabólito acetaldeído são conhecidos carcinógenos presentes nas bebidas alcoólicas. Esses compostos formam adutos de DNA que podem levar ao início da carcinogênese (Singh & Ghosh, 2017). Medidas de controle e programas de combate ao consumo dessas substâncias buscam reduzir o desenvolvimento dessa enfermidade.

Além disso, fatores genéticos também podem predispor indivíduos ao surgimento do carcinoma e influenciar na taxa de sobrevivência. No caso do CVAS, pesquisas têm analisado o papel de variantes polimórficas em diferentes desfechos relacionados a esses cânceres. Polimorfismos nos genes da enzima de reparo de raios-X por complementação cruzada (*XRCCI*) e da enzima 8-oxiguanina DNA glicosilase humana (*HOGGI*), estes envolvidos no reparo do DNA, e polimorfismos nos genes da enzima N-acetil-transferase2 (*NAT2*), das enzimas Glutathione-S-transferases (*GSTs*) e da enzima do complexo Citocromo P450 (*CYP1A1*), estes relacionados ao metabolismo de xenobióticos, são alguns exemplos de fatores genéticos estudados no contexto do CVAS (Weiss *et al.*, 2005; Hopkins *et al.*, 2008; Khelifi *et al.*, 2014; Choudhury *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Feki-Tounsi *et al.*, 2017). Os resultados desses estudos sugerem que a variabilidade na sobrevivência de pacientes diagnosticados com tipos variados de carcinoma pode ser explicada, em parte, por polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas na via de reparo do DNA e na via de metabolização de xenobióticos (Ekhart *et al.*, 2009; Osian *et al.*, 2010; Ang *et al.*, 2011; Farnebo *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2015; Pasqualetti *et al.*, 2017).

Tem sido proposta uma ligação entre a capacidade do indivíduo em reparar o dano do DNA com o desenvolvimento, a resposta à terapia e a progressão do carcinoma (Jalal *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016). Os genes que codificam as enzimas *XRCCI* e *HOGGI* são componentes chave na via de reparo do DNA por excisão de bases e necessários para a estabilidade genética (Mitra *et al.*, 2011; Wang; Xu & Duan, 2017). Discrepâncias na via BER ocasionadas por variações polimórficas podem reduzir a atividade desses genes, causando reparo insuficiente do DNA, instabilidade genômica e aumento no risco individual de pior prognóstico em termos de sobrevivência (Mitra *et al.*, 2011).

O gene da enzima de reparo de raios-X por complementação cruzada (*XRCCI*) foi o primeiro gene comprovado a influenciar a sensibilidade das células de mamíferos à radiação ionizante. O *XRCCI* codifica uma proteína que interage com DNA polimerase e DNA ligase, sendo uma peça chave na via que repara lesões no DNA causadas por essa radiação. Polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) podem atuar como um tipo de variação genética importante no *XRCCI* no contexto de processos carcinogênicos, podendo afetar essa via de reparo do DNA através da mudança na estrutura dessa proteína. O *XRCCI* tem três principais SNPs localizados na região codificante do gene: Arg194Tr (éxon 6), Arg280His (éxon 9) e Arg399Gln (éxon 10). Dentre eles, o Arg399Gln é o que possivelmente mais influencia na via de reparo celular do DNA (Zhang *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017). O genótipo *XRCCI* Arg280His AA (Homozigoto Variante) e o alelo variante A do *XRCCI* foram associados ao

aumento no risco de câncer de laringe na população chinesa (Wu *et al.*, 2016). O genótipo *XRCC1 Arg399Gln AA* (Homozigoto Variante) foi considerado fator de risco para o carcinoma de células escamosas orais em indivíduos turcos, e o genótipo *XRCC1 Arg399Gln GG* (Homozigoto Selvagem) teve efeito protetor contra a doença (Avci *et al.*, 2017). A baixa expressão gênica de *XRCC1* foi relacionada a um fator de risco para o CVAS em pacientes no norte da Índia (Kumar *et al.*, 2012). A alta expressão da proteína *XRCC1* foi associada à redução na sobrevida de pacientes diagnosticados com CVAS em Singapura (Ang *et al.*, 2011). Estudo envolvendo pacientes com carcinoma hepático demonstrou que aqueles com genótipo *XRCC1 Arg280His AA* (Homozigoto Variante) tiveram um aumento na sobrevida quando comparados aos de genótipo *XRCC1 Arg280His GG* (Homozigoto Selvagem) (Guan *et al.*, 2017).

Ademais, SNPs em genes relacionados à via de reparo do DNA por excisão de base, incluindo o *HOGG1*, têm sido associados a um maior risco de desenvolvimento de tumores malignos (Xie *et al.*, 2016). A proteína *HOGG1*, produto do gene *HOGG1*, é uma glicosilase que pode remover 8-oxoG resultante do dano oxidativo ao DNA (Radicella *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2015). O polimorfismo *Ser326Cys* do gene *HOGG1* resulta em substituição do aminoácido Serina (*Ser*) pela Cisteína (*Cys*) no códon 326 (Park *et al.*, 2007). Resultados mostraram que os genótipos *HOGG1 Ser326Cys CG* (Heterozigoto) e *HOGG1 Ser326Cys GG* (Homozigoto Variante) foram associados ao aumento no risco de câncer em células hepáticas (Yuan *et al.*, 2012; Ban *et al.*, 2017). A reduzida expressão do gene *HOGG1* foi associada a pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço na Índia (Kumar *et al.*, 2012). A presença do alelo variante *G* no polimorfismo *Ser326Cys* do gene *HOGG1* foi relacionada a uma baixa sobrevida global em pacientes com câncer no pulmão (Su *et al.*, 2015).

Resultados de estudos anteriores indicaram que a ativação ou a desativação das enzimas que metabolizam carcinógenos pode desempenhar importante papel na suscetibilidade do indivíduo ao câncer. Os xenobióticos podem sofrer bioativação por enzimas da fase I do metabolismo e posterior detoxificação por enzimas da fase II. Polimorfismos nos genes que codificam essas enzimas podem aumentar ou diminuir a ativação/detoxificação dos carcinógenos (Zhang *et al.*, 2014).

Os genes da família *CYP450* apresentam muitos SNPs importantes que podem influenciar a suscetibilidade individual a diferentes tipos de câncer. Dentre esses genes, o *CYP1A1* tem sido foco de vários estudos de metanálise (Gong *et al.*, 2014). A enzima *CYP1A1* participa do metabolismo da fase I, ativando ou inativando quimioterapêuticos, atuando na biotransformação de pró-carcinógenos ambientais em carcinógenos reativos intermediários que são detoxificados por enzimas da fase II (Abo-Bakr *et al.*, 2017; Jain *et al.*, 2017). A maior

atividade enzimática resultaria em aumento nos níveis de carcinógenos intermediários, levando ao maior risco de desenvolvimento do câncer (Singh & Ghosh, 2017). A associação de SNPs de *CYP1A1* com a suscetibilidade ao câncer colorretal, ao câncer de próstata e ao câncer cervical tem sido documentada (Cho *et al.*, 2017; Jain *et al.*, 2017; Koda *et al.*, 2017). A expressão aumentada de *CYP1A1* foi relacionada ao aumento na sobrevida de pacientes fumantes norte-americanos com câncer de mama (Andres *et al.*, 2015). Em contrapartida, não foi demonstrada a associação entre a expressão da proteína *CYP1A1* com a sobrevida global e a sobrevida livre de doença em pacientes jovens brasileiros diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas (Kaminagakura *et al.*, 2016).

Os genes *NAT* expressam duas importantes isoenzimas polimórficas (*NAT1* e *NAT2*) com diferentes papéis funcionais. Nos seres humanos, os produtos desses dois genes parecem ter funções distintas dependendo de suas expressões nos tecidos e da expressão de diferentes genes durante o desenvolvimento. Eles foram associados como fenótipo acetilador rápido, acetilador intermediário e acetilador lento (Khlifi *et al.*, 2013). A *NAT2* é uma enzima relacionada ao metabolismo de xenobióticos da fase II que acetila e detoxifica aminas heterocíclicas, hidrazinas e metabólitos aromáticos. Polimorfismos no gene *NAT2* podem reduzir a atividade enzimática, alterando o estado do acetilador *NAT2*, diminuindo a eficiência na detoxificação e, conseqüentemente, aumentando a suscetibilidade ao câncer (Zhang *et al.*, 2014; Hara *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). Análises mostraram que os indivíduos asiáticos acetiladores lentos podem ter risco aumentado de desenvolver CVAS em comparação com os acetiladores rápidos (Zhang *et al.*, 2014). Os fenótipos *NAT2* demonstraram influenciar a sobrevida de pacientes romenos com câncer colorretal (Osian *et al.*, 2010). Análises de polimorfismos demonstraram que indivíduos norte-americanos com fenótipo acetilador rápido apresentaram maiores taxa de sobrevida de 5 anos que indivíduos com fenótipo acetilador lento nos casos de câncer oral e orofaringe, pois aqueles apresentaram maior eficiência no processo de detoxificação que estes (Troy *et al.*, 2013).

As Glutathionas S-Transferases (*GSTs*) são enzimas metabolizadoras da fase II que desempenham um importante papel na detoxificação celular. Das oito classes de *GSTs* reconhecidas, os genes mais comumente estudados em relação ao risco e sobrevida no CVAS são *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*, sendo que vários tipos de variações alélicas são identificados neles. Polimorfismos no gene *GST* têm sido associados ao maior risco de câncer e a resposta diversificada ao tratamento (Makhtar *et al.*, 2017). Deleção nos genes *GSTM1* ou *GSTT1*, por exemplo, podem afetar a expressão e a atividade das enzimas, prejudicando a detoxificação celular, podendo levar ao desenvolvimento do câncer (Chen; Xian & Luo, 2017). O *GSTP1*

codifica uma enzima da fase II envolvida na inativação de xenobióticos por conjugação com a glutationa, facilitando a excreção de moléculas que são potencialmente tóxicas ao fígado (Goodrich & Basu, 2012). O polimorfismo *Ala113Val* em *GSTP1* foi significativamente associado à redução no risco de câncer do fígado em população caucasiana (De Mattia *et al.*, 2017). A variação alélica *Ile105Val* no gene *GSTP1*, que leva a substituição do aminoácido Isoleucina (*Ile*) pela Valina (*Val*), foi relacionada à diminuição da atividade enzimática (Ansari *et al.*, 2017). A atividade reduzida da *GSTP1* foi associada a uma maior sobrevida ao câncer de orofaringe em indivíduos do sexo masculino (Troy *et al.*, 2013).

A utilização desses biomarcadores de tumores para a detecção precoce visa auxiliar no prognóstico da doença, o que pode contribuir para o aumento na taxa de sobrevida dos pacientes (Bonfante *et al.*, 2014). Apesar dos avanços que esses conhecimentos trouxeram na prevenção, na detecção e no diagnóstico, a taxa de sobrevida global de 5 anos para os pacientes com CVAS está entre as mais baixas dentre os principais cânceres (Farnebo *et al.*, 2015). A maior incidência do CVAS ocorre em indivíduos de baixa escolaridade que têm menos acesso aos sistemas de saúde. O início tardio no tratamento do CVAS é um dos obstáculos para que a taxa de sobrevivência desses pacientes aumente.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Analisar a associação de polimorfismos em genes envolvidos na biotransformação de xenobióticos e no de reparo de DNA com a sobrevida de pacientes diagnosticados com CVAS na região sul do estado da Bahia.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o impacto de polimorfismos nos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*, *XRCC1*, *HOGG1* e *NAT2* na sobrevida global em pacientes diagnosticados com CVAS;

Avaliar o impacto de polimorfismos nos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*, *XRCC1*, *HOGG1* e *NAT2* na sobrevida livre de doença em pacientes diagnosticados com CVAS.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO-BAKR, A.; MOSSALLAM, G.; EL AZHARY, N.; HAFEZ, H. & BADAWY, R. 2017. Impact of CYP1A1, GSTP1 and XRCC1 genes polymorphisms on toxicity and response to chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, vol. 29, no. 3, p. 127-133.

ADILBAY, D.; ADILBAYEV, G.; KIDIRBAYEVA, G.; SHIPILOVA, V.; SADYK, Z.; KOYANBEKOVA, G.; SOKOLENKO, E. & KLOZAR, J. 2018. HPV infection and P16 expression in oral and oropharyngeal cancer in Kazakhstan. *Infectious Agents and Cancer*, vol. 13, p. 2.

ANDRES, SA.; BICKETT, KE.; ALATOUM, MA.; KALBFLEISCH, TS.; BROCK, GN. & WITTLIFF, JL. 2015. Interaction between smoking history and gene expression levels impacts survival of breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 152, no. 3, p. 545-556.

ANG, KK.; ZHANG, Q.; ROSENTHAL, DI.; NGUYEN-TAN, PF.; SHERMAN, EJ.; WEBER, RS.; GALVIN, JM.; BONNER, JA.; HARRIS, J.; EL-NAGGAR, AK.; GILLISON, ML.; JORDAN, RC.; KONSKI, AA.; THORSTAD, WL.; TROTTI, A.; BEITLER, JJ.; GARDEN, AS.; SPANOS, WJ.; YOM, SS. & AXELROD, RS. 2014. Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 32, no. 27, p. 2940-2950.

ANG, MK.; PATEL, MR.; YIN, XY.; SUNDARAM, S.; FRITCHIE, K.; ZHAO, N.; LIU, Y.; FREEMERMAN, AJ.; WILKERSON, MD.; WALTER, V.; WEISSLER, MC.; SHOCKLEY, WW.; COUCH, ME.; ZANATION, AM.; HACKMAN, T.; CHERA, BS.; HARRIS, SL.; MILLER, CR.; THORNE, LB.; HAYWARD, MC.; FUNKHOUSER, WK.; OLSHAN, AF.; SHORES, CG.; MAKOWSKI, L. & HAYES, DN. 2011. High XRCC1 protein expression is associated with poorer survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, vol. 17, no. 20, p. 6542-6552.

ANSARI, M.; CURTIS, PH.; UPPUGUNDURI, CRS.; REZGUI, MA.; NAVA, T.; MLAKAR, V.; LESNE, L.; THÉORET, Y.; CHALANDON, Y.; DUPUIS, LL.; SCHECHTER, T.;

BARTELINK, IH.; BOELENS, JJ.; BREDIUS, R.; DALLE, JH.; AZARNOUSH, S.; SEDLACEK, P.; LEWIS, V.; CHAMPAGNE, M.; PETERS, C.; BITTENCOURT, H. & KRAJINOVIC, M. 2017. GSTA1 diplotypes affect busulfan clearance and toxicity in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a multicenter study. *Oncotarget*, vol. 8, no. 53, p. 90852-9867.

ANSARY-MOGHADDAM, A.; HUXLEY, RR.; LAM, TH. & WOODWARD, M. 2009. The risk of upper aero digestive tract cancer associated with smoking, with and without concurrent alcohol consumption. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, vol. 76, no. 4, p. 392-403.

AVCI, H.; ERGEN, A.; BIRELLER, ES.; ERTUGRUL, B. & CAKMAKOGLU, B. 2017. A strong relationship between oral squamous cell carcinoma and DNA repair genes. *Biochemical Genetics*, vol. 55, no. 5-6, p. 378-386.

BAN, EZ.; LYE, MS.; CHONG, PP.; YAP, YY.; LIM, SYC. & ADBUL RAHMAN, H. 2017. Haplotype CGC from XPD, hOGG1 and ITGA2 polymorphisms increases the risk of nasopharyngeal carcinoma in Malaysia. *Plos One*, vol. 12, no. 11.

BRAAKHUIS, BJ.; BRAKENHOFF, RH. & LEEMANS, CR. 2012. Treatment choice for locally advanced head and neck cancers on the basis of risk factors: biological risk factors. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, vol. 23, p. 173-177.

BONFANTE, GM da S.; MACHADO, CJ.; SOUZA, PEA de.; ANDRADE, EIG.; ACURCIO, F de A. & CHERCHIGLIA, ML. 2014. Sobrevida de cinco anos e fatores associados ao câncer de boca para pacientes em tratamento oncológico ambulatorial pelo Sistema Único de Saúde, Brasil. *Cadernos de Saúde Publica*, vol. 30, no. 5, p. 983-997.

CAI, CF.; LIU, CS.; SHANG-GUAN, HJ.; YANG, CH.; LUO, XY.; SHEN, DY. & YANG, SY. 2017. An oncogenic function of retinoic acid receptor- $\alpha$  in the development of laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, vol. 14, no. 6, p. 7896-7902.

CHEN, H.; WU, M.; LI, G.; HUA, L.; CHEN, S. & HUANG, H. 2017. Association between XRCC1 single-nucleotide polymorphism and acute radiation reaction in patients with nasopharyngeal carcinoma: A cohort study. *Medicine*, vol. 96, no. 44.

CHEN, ZH.; XIAN, JF. & LUO, LP. 2017. Association between GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and gastric cancer risk, and their interactions with environmental factors. *Genetics and Molecular Research*, vol. 16, no. 1.

CHO, YA.; LEE, J.; OH, JH.; CHANG, HJ.; SOHN, DK.; SHIN, A. & KIM, J. 2017. Dietary flavonoids, CYP1A1 genetic variants, and the risk of colorectal cancer in a Korean population. *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 128.

CHOUDHURY, JH.; SINGH, SA.; KUNDU, S.; CHOUDHURY, B.; TALUKDAR, FR.; SRIVASTA, S.; LASKAR, RS.; DHAR, B.; DAS, R.; LASKAR, S.; KUMAR, M.; KAPFO, W.; MONDAL, R. & GHOSH, SK. 2015. Tobacco carcinogen-metabolizing genes CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and their interaction with tobacco exposure influence the risk of head and neck cancer in Northeast Indian population. *Tumour Biology*, vol. 36, no. 8, p. 5773-5783.

CURADO, MP. & HASHIBE, M. 2009. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Current Opinion in Oncology*, vol. 21, no. 3, p. 194-200.

DE MATTIA, E.; CECCHIN, E.; POLESEL, J.; BIGNUCOLO, A.; RONCATO, R.; LUPO, F.; CROVATTO, M.; BUONADONNA, A.; TIRIBELLI, C. & TOFFOLI, G. 2017. Genetic biomarkers for hepatocellular cancer risk in a caucasian population. *World Journal of Gastroenterology*, vol. 23, no. 36, p. 6674-6684.

EKHART, C.; RODENHUIS, S.; SMITS, PH.; BEIJNEN, JH. & HUITEMA, AD. 2009. An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. *Cancer Treatment Reviews*, vol. 35, no. 1, p. 18-31.

FARNEBO, L.; STJERNSTROM, A.; FREDRIKSON, M.; ANSELL, A.; GRAVIN, S. & THUNELL, LK. 2015. DNA repair genes XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 are associated with risk and survival of squamous cell carcinoma of the head and neck. *DNA Repair (Amst)*, vol. 31, p. 64-72.

FEKI-TOUNSI, M.; KHLIFI, R.; LOUATI, I.; FOURATLM.; MHIRI, MN.; HAMZA-CHAFFAI, A. & REBAI, A. 2017. Polymorphisms in XRCC1, ERCC2, and ERCC3 DNA repair genes, CYP1A1 xenobiotic metabolism gene, and tobacco are associated with bladder

cancer susceptibility in Tunisian population. *Environmental Science and Pollution Research International*, vol. 24, no. 28, p. 22476-22484.

GONG, FF.; LU, SS.; HU, CY.; QIAN, ZZ.; FENG, F.; WU, YL.; YANG, HY. & SUN, YH. 2014. Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) polymorphism and susceptibility to esophageal cancer: an updated meta-analysis of 27 studies. *Tumour Biology*, vol. 35, no. 10, p. 10351-10361.

GOODRICH, JM. & BASU, N. 2012. Variants of glutathione s-transferase pi 1 exhibit differential enzymatic activity and inhibition by heavy metals. *Toxicology in Vitro*, vol. 26, no. 4, p. 630-635.

GUAN, Q.; CHEN, Z.; CHEN, Q. & ZHI, X. 2017. XRCC1 and XPD polymorphisms and their relation to the clinical course in hepatocarcinoma patients. *Oncology Letters*, vol. 14, no. 3, p. 2783-2788.

GUPTA, B.; BRAY, F.; KUMAR, N. & JOHNSON, NW. 2017. Associations between oral hygiene habits, diet, tobacco and alcohol and risk of oral cancer: a case-control study from India. *Cancer Epidemiology*, vol. 51, p. 7-14.

GUPTA, B.; JOHNSON, NW. & KUMAR, N. 2016. Global epidemiology of head and neck cancers: a continuing challenge. *Oncology*, vol. 91, no.1, p. 13-23.

HARA, A.; TAIRA, N.; MIZOO, T.; NISHIYAMA, K.; NOGAMI, T.; IWAMOTO, T.; MOTOKI, T.; SHIEN, T.; MATSUOKA, J.; DOIHARA, H.; ISHIHARA, S.; KAWAI, H.; KAWASAKI, K.; ISHIBE, Y.; OGASAWARA, Y. & MIYOSHI, S. 2017. N-acetyltransferase 2 polymorphism and breast cancer risk with smoking: a case control study in Japanese women. *Breast Cancer*, vol. 24, no. 2, p. 254-262.

HOPKINS, J.; CESCONE, DW.; TSE, D.; BRADBURY, P.; XU, W.; MA, C.; WHEATLEY-PRICE, P.; WALDRON, J.; GOLDSTEIN, D.; MEYER, F.; BAIRATI, I. & LIU, G. 2008. Genetic polymorphisms and head and neck cancer outcomes: a review. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, vol. 17, no. 3, p. 490-499.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2018/inca-estima-cerca-600-mil-casos-novos-cancer-para-2018>>. Acesso em 03 de fevereiro de 2018.

INSTITUTO ONCOGUIA. Estimativas de câncer no mundo. Disponível em:<<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estimativas-no-mundo/1706/1/>>. Acessado em 25 de janeiro de 2018.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Estimated number of incident cases, both sexes, worldwide (top 10 cancer sites) in 2012. Disponível em:<[http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&sex=0&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color\\_palette=default](http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?mode=cancer&mode_population=continents&population=900&sex=0&cancer=29&type=0&statistic=0&prevalence=0&color_palette=default)>. Acessado em 18 de janeiro de 2018.

JAIN, V.; RATRE, YK.; AMLE, D.; MISHRA, PK. & PATRA, PK. 2017. Polymorphism of CYP1A1 gene variants rs4646903 and rs1048943 relation to the incidence of cervical cancer in Chhattisgarh. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 52, p. 188-192.

JALAL, S.; EARLEY, JN. & TURCHI, JJ. 2011. DNA repair: from genome maintenance to biomarker and therapeutic target. *Clinical Cancer Research*, vol. 17, no. 22, p. 6973-6984.

KAMINAGAKURA, E.; CARIS, A.; COUTINHO-CAMILLO, C.; SOARES, FA.; TAKAHAMA-JÚNIOR, A. & KOWALSKI, LP. 2016. Protein expression of CYP1A1, CYP1B1, ALDH1A1, and ALDH2 in young patients with oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 45, no. 6, p. 706-712.

KHLIFI, R.; CHAKROUN, A.; HAMZA-CHAFFAI, A. & REBAI, A. 2014. Association of CYP1A1 and CYP2D6 gene polymorphisms with head and neck cancer in Tunisian patients. *Molecular Biology Reports*, vol. 41, no. 4, p. 2591-2600.

KHLIFI, R.; MESSAOUD, O.; REBAI, A. & HAMZA-CHAFFAI, A. 2013. Polymorphisms in the human cytochrome P450 and arylamine N-acetyltransferase: susceptibility to head and neck cancers. *BioMed Research International*, vol. 2013, p. 582768.

KODA, M.; IWASAKI, M.; YAMANO, Y.; LU, X. & KATOH, T. 2017. Association between NAT2, CYP1A1, and CYP1A2 genotypes, heterocyclic aromatic amines, and prostate cancer

risk: a case study in Japan. *Environmental Health and Preventive Medicine*, vol. 22, no. 22, p. 72.

KUMAR, A.; PANT, MC.; SINGH, HS. & KHANDELWAL, S. 2012. Reduced expression of DNA repair gene (XRCC1, XPD, and OGG1) in squamous cell carcinoma of head and neck in North India. *Tumour Biology*, vol. 33, no. 1, p. 111-119.

LEDUC, C.; ADAM, J.; LOUVET, E.; SOURISSEAU, T.; DORVAULT, N.; BERNARD, M.; MAINGOT, E.; FAIVRE, L.; CASSIN-KUO, MS.; BOISSIER, E.; DESSOLIERS, MC.; ROBIN, A.; CASIRAGHI, O.; EVEN, C.; TEMAN, S.; OLAUSSEN, KA.; SORIA, JC. & POSTEL-VINAY, S. 2018. TPF induction chemotherapy increases PD-L1 expression in tumour cells and immune cells in head and neck squamous cell carcinoma. *ESMO Open*, vol. 3, no. 1.

LI, F.; WANG, J. & CHEN, M. 2016. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and the risk of laryngeal cancer: A meta-analysis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 78, p. 92-100.

MAKHTAR, SM.; HUSIN, A.; BABA, AA. & ANKATHIL, R. 2017. Association of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Ile105Val polymorphisms with clinical response to imatinib mesylate treatment among Malaysian chronic myeloid leukaemia patients. *Journal of Genetics*, vol. 96, no. 4, p. 633-639.

MARUR, S. & FORASTIERE, AA. 2016. Head and neck squamous cell carcinoma: update on epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 91, no. 3, p. 386-396.

MITRA, AK.; SINGH, SV.; GARG, VK.; SHARMA, M.; CHATURVEDI, R. & RATH, SK. 2011. Protective association exhibited by the single nucleotide polymorphism (SNP) rs1052133 in the gene human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOGG1) with the risk of squamous cell carcinomas of the head & neck (SCCHN) among north Indians. *The Indian Journal of Medical Research*, vol. 133, p. 605-612.

OSIAN, G.; PROCOPCIUC, L.; VLAD, L.; LANCU, C.; CRISTEA, PG.; MOCAN, T. & MOCAN, L. 2010. NAT2 polymorphisms and sporadic colorectal cancer survival. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, vol. 19, no. 4, p. 361-368.

PARK, HW.; KIM, IJ.; KANG, HC.; JANG, SG.; AHN, SA.; LEE, JS.; SHIN, HR. & PARK, JG. 2007. The hOGG1 Ser326Cys polymorphism is not associated with colorectal cancer risk. *Journal of Epidemiology*, vol. 17, no. 5, p. 156-160.

PASQUALETTI, F.; GONNELI, A.; CANTARELLA, M.; DELISHAJ, D.; MOLINARI, A.; ORTENZI, V.; CARBONE, F.; MONTRONE, S.; URSINO, S.; FRANCESHI, S.; MORGANTI, R.; ORLANDI, P.; DI DESIDERO, T.; MAZZANTI, CM.; ZAVAGLIA, K.; NACCARATO, AG.; BOCCI, G. & PAIAR, F. 2017. Association of Glutathione S-Transferase P-1 (GSTP-1) rs1695 polymorphism with overall survival in glioblastoma patients treated with combined radio-chemotherapy. *Investigational New Drugs*.

RADICELLA, JP.; DHERIN, C.; DESMAZE, C.; FOX, MS. & BOITEUX, S. 1997. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 15, p. 8010-8015.

SINGH, AK.; MIMIKOS, C.; GROMAN, A.; DIBAJ, S.; PLATEK, AJ.; COHAN, DM.; HICKS WL JR.; GUPTA, V.; ARSHAD, H.; KURIAKOSE, MA.; WARREN, GW. & PLATEK, ME. 2017. Combined surgery and radiation improves survival of tonsil squamous cell cancers. *Oncotarget*, vol. 8, no. 68, p. 112442-112450.

SINGH, SA. & GHOSH, SK. 2017. Metabolic Phase I (CYPs) and Phase II (GSTs) Gene Polymorphisms and Their Interaction with Environmental Factors in Nasopharyngeal Cancer from the Ethnic Population of Northeast India. *Pathology Oncology Research*.

SU, Y.; ZHANG, H.; XU, F.; KONG, J.; YU, H. & QIAN, B. 2015. DNA Repair Gene Polymorphisms in Relation to Non-Small Cell Lung Cancer Survival. *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 36, no. 4, p. 1419-1429.

TAN, H.; ZHU, G.; SHE, L.; WEI, M.; WANG, Y.; PI, L.; CHEN, C.; ZHANG, D.; TAN, P.; CHEN, J.; HUANG, D.; TIAN, Y.; LIU, Y. & ZHANG, X. 2017. MIR-98 inhibits malignant progression via targeting MTDH in squamous cell carcinoma of the head and neck. *American Journal of Cancer Research*, vol. 7, no. 12, p. 2554-2565.

TROY, JD.; WEISSFELD, JL.; DIERGAARDE, B.; YOUK, AO.; BUCH, SC.; ROMKES, M. & GRANDIS, JR. 2013. Polymorphisms in NAT2 and GSTP1 are associated with survival in oral and oropharyngeal cancer. *Cancer Epidemiology*, vol. 37, no. 4, p. 505-511.

VERMORKEN, JB.; MESIA, R.; RIVERA, F.; REMENAR, E.; KAWECKI, A.; ROTTEY, S.; ERFAN, J.; ZABOLOTNY, D.; KIENZER, HR.; CUPISSOL, D.; PEYRADE, F.; BENASSO, M.; VYNNYCHENKO, I.; DE RAUCOURT, D.; BOKEMEYER, C.; SCHUELER, A.; AMELLAL, N. & HITT, R. 2008. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *The New England Journal of Medicine*, vol. 359, no. 11, p. 1116-1127.

VIKRAM, B.; STRONG, EW.; SHAH, JP. & SPIRO, R. 1984. Failure at distant sites following multimodality treatment for advanced head and neck cancer. *Head & Neck Surgery*, vol. 6, no. 3, p. 730-733.

VITELLI, V.; FALVO, P.; G NERGADZE, S.; SANTAGOSTINI, M.; KHORIAULI, L.; PELLANDA, P.; BERTINO, G.; OCCHINI, A.; BENAZZO, M.; MORBINI, P.; PAULLI, M.; PORTA, C. & GIULOTTO, E. 2018. Telomeric repeat-containing RNAs (TERRA) decrease in squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with worsened clinical outcome. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 1.

VOUGIOUKLAKIS, T.; BAO, R.; NAKAMURA, Y. & SALOURA, V. 2017. Protein methyltransferases and demethylases dictate CD8<sup>+</sup> T-cell exclusion in squamous cell carcinoma of the head and neck. 2017. *Oncotarget*, vol. 8, no. 68, p. 112797-112808.

WANG, F.; QIN, Z.; SI, S.; TANG, J.; XU, L.; XU, H.; LI, R.; HAN, P. & YANG, H. 2017. Lack of association between NAT2 polymorphism and prostate cancer risk: a meta-analysis and trial sequential analysis. *Oncotarget*, vol. 8, no. 34, p. 57440-57450.

WANG, L.; XU, J. & DUAN, B. 2017. Association between polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 and non-melanoma skin cancer risk: a meta-analysis. *Onco Targets and Therapy*, vol. 10, p. 3475-3483.

WANG, Y.; GAO, X.; WEI, F.; ZHANG, X.; YU, J.; ZHAO, H.; SUN, Q.; YAN, F.; YAN, C.; LI, H. & REN, X. 2015. The hOGG1 Ser326Cys polymorphism contributes to digestive system

cancer susceptibility: evidence from 48 case-control studies. *Tumour Biology*, vol. 36, no. 2, p. 1029-1038.

WEISS, JM.; GOODE, EL.; LADIGES, WC & ULRICH, CM. 2005. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. *Molecular Carcinogenesis*, vol. 42, no. 3, p. 127-141.

WU, WQ.; ZHANG, LS.; LIAO, SP.; LIN, XL.; ZENG, J. & DU, D. 2016. Association between XRCC1 polymorphisms and laryngeal cancer susceptibility in a chinese sample population. *Genetics and Molecular Research*, vol. 15, no. 4.

XIE, Y.; WU, Y.; ZHOU, X.; YAO, M.; NING, S. & WEI, Z. 2016. Association of polymorphisms hOGG1 rs1052133 and hMUTYH rs3219472 with risk of nasopharyngeal carcinoma in a Chinese population. *Onco Targets and Therapy*, vol. 9, p. 755-760.

YUAN, T.; WEI, J.; LUO, J.; LIU, M.; DENG, S. & CHEN, P. 2012. Polymorphisms of base-excision repair genes hOGG1 326Cys and XRCC1 280His increase hepatocellular carcinoma risk. *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 57, no. 9, p. 2451-2457.

ZHANG, L.; XIANG, Z.; HAO, R.; LI, R. & ZHU, Y. 2014. N-acetyltransferase 2 genetic variants confer the susceptibility to head and neck carcinoma: evidence from 23 case-control studies. *Tumour Biology*, vol. 35, no. 4, p. 3585-3595.

ZHANG, Y.; LUO, Z.; YANG, L.; CHEN, S.; CHEN, C. & LIN, Z. 2016. The association between four SNPs of X-ray repair cross complementing protein 1 and the sensitivity to radiotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, vol. 11, no. 5, p. 3508-3514.

## **5. CAPÍTULO 1: ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE BIOTRANSFORMAÇÃO E REPARO DE DNA COM A SOBREVIDA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM CARCINOMA DAS VIAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES.**

Artigo a ser submetido à revista Cancer Genetics

Pedro Amorim Novais<sup>1\*</sup>, Thiago Magalhães da Silva<sup>1</sup>, Débora Diniz Bezerra<sup>1</sup>, Ana Angélica Leal Barbosa<sup>1</sup>, Cintia Rodrigues Marques<sup>2</sup>, Marcílio Ferreira Marques Filho<sup>3</sup>, Fabrício Rios Santos<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, BA, BR

<sup>2</sup> Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, BA, BR

<sup>3</sup> Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, BR

<sup>4</sup> Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, BA, BR

\*e-mail: pedroamor.1308@gmail.com

### **RESUMO**

O carcinoma das vias aerodigestivas superiores (CVAS) é responsável por alta incidência de óbitos e baixa sobrevida. Variáveis epidemiológicas como sexo masculino, idade avançada, baixa escolaridade, cor da pele não branca e estágio avançado do tumor estão associadas a um pior prognóstico. O tabagismo e o etilismo são fatores de risco bem estabelecidos para o CVAS. Fatores genéticos do hospedeiro também podem estar implicados no desenvolvimento do câncer como os polimorfismos em genes de biotransformação e reparo de DNA. Variantes genéticas nesses genes podem interferir nas atividades das enzimas envolvidas nas vias de metabolismo de xenobióticos e nas vias de reparo de DNA, desempenhando um importante papel na suscetibilidade à doença e na taxa de sobrevida. Este trabalho teve por objetivo analisar a associação entre os polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*, *XRCC1*, *HOGG1* e *NAT2* com a sobrevida global, intervalo entre a data do diagnóstico e a data do óbito por qualquer causa, e sobrevida livre de doença, intervalo entre a data do diagnóstico e a data da recorrência do tumor, em pacientes diagnosticados com CVAS na região sul do estado da Bahia. Através da análise dos prontuários médicos, foram obtidas as informações referentes à data do diagnóstico, à data do óbito e à data da recorrência do tumor de 101 pacientes, com idades variando entre 30 e 92 anos, sendo 89 homens. Com relação à sobrevida global, as maiores diferenças médias foram observadas na comparação entre os genótipos do gene *GSTT1* e entre os genótipos combinados dos genes *GSTM1* e *GSTT1*. Pacientes com genótipo *GSTT1*

*Não Nulo* ou com combinação dos genótipos *GSTM1 Nulo* e *GSTT1 Não Nulo* apresentaram maiores valores de sobrevida global. Com relação à sobrevida livre de doença, as maiores diferenças médias foram observadas na comparação entre os fenótipos do gene *NAT2* e entre os genótipos/fenótipos combinados dos genes *CYP1A1* e *NAT2*. Pacientes com fenótipo *NAT2 acetilador rápido ou intermediário* ou com combinação dos genótipos/fenótipos *CYP1A1 TT* e *NAT2 acetilador rápido ou intermediário*, *CYP1A1 TT* e *NAT2 acetilador lento*, *CYP1A1 TC* ou *CC* e *NAT2 acetilador rápido ou intermediário* apresentaram maiores valores de sobrevida livre de doença. Embora consideráveis, as diferenças observadas não foram estatisticamente significantes.

**Palavras-chave** Carcinoma das vias aerodigestivas superiores, polimorfismos genéticos, sobrevida.

## INTRODUÇÃO

O carcinoma das vias aerodigestivas superiores (CVAS) é o sexto carcinoma mais comum em todo o mundo [1]. Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para 2018, cerca de 600 mil novos casos de câncer são esperados no Brasil. Neste período, estima-se 14.700 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e mulheres [2]. Os principais sítios anatômicos primários do CVAS são a cavidade oral, a orofaringe, a nasofaringe, a hipofaringe e a laringe [3]. Esse tipo de câncer ocorre mais frequentemente nos homens que nas mulheres, mas estudos recentes têm demonstrado o aumento da incidência no sexo feminino e uma redução no número dos casos no sexo masculino em certos grupos demográficos [4,5]. O tabagismo e o etilismo são considerados um dos principais fatores ambientais de risco, pois a fumaça do cigarro e o álcool apresentam substâncias carcinogênicas em suas composições [6,7,8]. Além disso, fatores genéticos também podem predispor os indivíduos ao surgimento do carcinoma e influenciar na taxa de sobrevida. No caso do CVAS, várias pesquisas têm analisado o papel de variantes polimórficas em diferentes desfechos relacionados a esses cânceres. Polimorfismos nos genes da enzima de reparo de raios-X por complementação cruzada (*XRCCI*) e da enzima 8-oxiguanina DNA glicosilase humana (*HOGGI*), estes envolvidos na via de reparo do DNA, e polimorfismos nos genes da enzima N-acetil-transferase2 (*NAT2*), das enzimas Glutationa-S-transferases (*GSTs*) e da enzima do complexo Citocromo P450 (*CYP1A1*), estes relacionados à via do metabolismo de xenobióticos, são alguns exemplos de fatores genéticos estudados no contexto do CVAS [3,8,9,10,11,12]. Os resultados sugerem que a variabilidade na sobrevida de pacientes diagnosticados com carcinoma pode ser explicada, em parte, por polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas nessas vias biológicas [4,13,14,15,16,17]. Tem sido proposta uma ligação entre a capacidade do indivíduo em reparar o dano do DNA celular com o desenvolvimento, a resposta à terapia e a progressão do carcinoma [12,18]. Os genes que codificam as enzimas *XRCCI* e *HOGGI* são componentes chave na via de reparo do DNA por excisão de bases (BER) e necessários para a estabilidade genética [19,20]. Mutações em genes na via BER podem reduzir a atividade genética, causando reparo insuficiente do DNA, instabilidade genética e, conseqüentemente, influenciar a suscetibilidade individual ao desenvolvimento de neoplasias malignas [20]. Ademais, a alta expressão da proteína *XRCCI* foi associada à redução na sobrevida de pacientes diagnosticados com CVAS [14]. Com relação aos genes que codificam enzimas envolvidas na via do metabolismo de xenobióticos, resultados de estudos anteriores indicaram que a ativação ou a desativação dessas enzimas pode desempenhar importante papel não apenas na suscetibilidade

individual ao câncer, como também nas taxas de sobrevida [13,16,21,22,23]. A enzima *CYP1A1* participa do metabolismo da fase I, ativando e inativando quimioterapêuticos, atuando na biotransformação de pró-carcinógenos ambientais em carcinógenos reativos intermediários que são detoxificados por enzimas da fase II [24,25]. A expressão aumentada do *CYP1A1* foi relacionada a um aumento na sobrevida de pacientes com câncer de mama que eram fumantes [23]. A *NAT2* é uma enzima relacionada ao metabolismo de xenobióticos da fase II que acetila e detoxifica aminas heterocíclicas, hidrazinas e metabólitos aromáticos. Polimorfismos no gene *NAT2* podem reduzir a atividade enzimática, diminuindo a eficiência na detoxificação, aumentando a suscetibilidade ao câncer [26,27]. Os fenótipos *NAT2* demonstraram influenciar a sobrevida de pacientes com câncer colorretal [13]. A *GST* é uma enzima metabolizadora da fase II que desempenha um importante papel na detoxificação celular. Polimorfismos no gene *GST* estão associados ao maior risco de câncer e a resposta diversificada ao tratamento [28]. A atividade reduzida da *GSTP1* foi associada a uma maior sobrevida ao câncer de orofaringe em indivíduos do sexo masculino [29]. Apesar dos recentes avanços alcançados na prevenção, detecção e diagnóstico, a taxa de sobrevida global de 5 anos para os pacientes com CVAS está entre as mais baixas dentre os principais cânceres [4]. Estudos investigando a influência de polimorfismos em genes de reparo de DNA e metabolismo de xenobióticos sobre as taxas de sobrevida no CVAS ainda são escassos para as populações brasileiras. O objetivo desse artigo foi avaliar o impacto dos polimorfismos em genes de biotransformação e reparo de DNA na sobrevida global, intervalo entre a data do diagnóstico e a data do óbito por qualquer causa, e sobrevida livre de doença, intervalo entre a data do diagnóstico e a data da recorrência do tumor, de pacientes diagnosticados com esse tipo de carcinoma na região sul do estado da Bahia. Até o presente momento, trata-se do primeiro estudo desse tipo conduzido em uma população do nordeste brasileiro, incentivando o desenvolvimento de novas pesquisas em localidades que estão fora das regiões sul e sudeste do Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **RECRUTAMENTO DOS VOLUNTÁRIOS**

Os 101 voluntários foram recrutados no Centro de Alta Complexidade em Oncologia da Santa Casa de Itabuna (CACON) e na Clínica Oncológica de Ilhéus (Clioni) entre os anos de 2008 e 2009, conforme Silva *et al.*, 2014.

### **EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO**

Três mililitros de sangue periférico foram obtidos de uma única punção em sistema de coleta a vácuo, conforme Silva *et al.*, 2014.

### **GENOTIPAGEM DOS GENES *XRCC1* E *HOGG1* POR PCR-RFLP**

Os genes *XRCC1* e *HOGG1* foram amplificados cada um em uma reação de PCR, conforme Marques *et al.*, 2014. (Tabelas 1 e 2).

### **ANÁLISE DO POLIMORFISMO *MspI* DO GENE *CYP1A1* POR PCR-RFLP**

O gene *CYP1A1* foi amplificado em uma reação de PCR. O produto da amplificação foi digerido pela enzima *MspI*, gerando uma única banda de 343pb para o alelo selvagem e duas bandas (uma de 134pb e outra de 209pb) para o alelo mutante. (Tabelas 1, 2 e 3).

### **AMPLIFICAÇÃO DE DNA ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O GENE *NAT2***

O gene *NAT2* foi amplificado em uma reação de PCR, conforme Marques *et al.*, 2014. (Tabelas 1 e 2).

## **IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTITUIÇÕES DE SIMPLES NUCLEOTÍDEOS COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO (RFLP) PARA O GENE *NAT2***

Após amplificação, os perfis de metabolização para o *NAT2* foram determinados por análise haplotípica, conforme Marques *et al.*, 2014. (Tabela 3).

## **DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE *GSTM1* E *GSTT1* ATRAVÉS DE MULTIPLEX PCR**

Os genes *GSTM1* e *GSTT1* foram amplificados em uma reação multiplex PCR, conforme Silva *et al.*, 2014. (Tabelas 1 e 2).

## **ANÁLISE DO POLIMORFISMO *BsmI* DO GENE *GSTP1* POR PCR-RFLP**

A reação de amplificação por PCR e o polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) *BsmI* no gene *GSTP1* foram obtidos segundo Harries *et al.*, 1997. (Tabelas 1, 2 e 3).

## **ANÁLISES DE INTERAÇÃO GENE-GENE**

Foram feitas combinações entre genótipos e genótipos/fenótipos dos genes analisados. Essa interação foi estabelecida entre genes que participam da mesma via biológica.

Os genes *GSTM1* e *GSTT1* tiveram os genótipos combinados divididos em duas categorias: Uma categoria composta pelos genótipos combinados *GSTM1 Nulo* e *GSTT1 Não Nulo*, e outra categoria composta por *Outras combinações genotípicas* desses genes. Esta última categoria continha os genótipos combinados *GSTM1 Nulo* e *GSTT1 Nulo*, *GSTM1 Não Nulo* e *GSTT1 Não Nulo*, *GSTM1 Não Nulo* e *GSTT1 Nulo*. (Figuras 3A e 4A. Tabelas 7 e 8).

Os genes *GSTM1* e *GSTP1* tiveram os genótipos combinados divididos em duas categorias: Uma categoria composta pelos genótipos combinados *GSTM1 Nulo* e *GSTP1 Ile/Val* ou *Val/Val* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante), e outra categoria composta por *Outras combinações genotípicas* desses genes. Esta última categoria continha os genótipos combinados *GSTM1 Nulo* e *GSTP1 Ile/Ile* (Homozigoto Selvagem), *GSTM1 Não Nulo* e *GSTP1 Ile/Ile* (Homozigoto Selvagem), *GSTM1 Não Nulo* e *GSTP1 Ile/Val* ou *Val/Val* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante). (Figuras 3B e 4B. Tabelas 7 e 8).

Os genes *GSTT1* e *GSTP1* tiveram os genótipos combinados divididos em duas categorias: Uma categoria composta pelos genótipos combinados *GSTT1 Não Nulo* e *GSTP1 Ile/Val* ou *Val/Val* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante), e outra categoria composta por *Outras combinações genótípicas* desses genes. Esta última categoria continha os genótipos combinados *GSTT1 Nulo* e *GSTP1 Ile/Ile* (Homozigoto Selvagem), *GSTT1 Nulo* e *GSTP1 Ile/Val* ou *Val/Val* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante), *GSTT1 Não Nulo* e *GSTP1 Ile/Ile* (Homozigoto Selvagem). (Figuras 3C e 4C. Tabelas 7 e 8).

Os genes *CYP1A1* e *NAT2* tiveram os genótipos/fenótipos combinados divididos em duas categorias: Uma categoria composta pelos genótipos/fenótipos combinados *CYP1A1 TC* ou *CC* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante) e *NAT2 acetilador lento*, e outra categoria composta por *Outras combinações genótípicas/fenótípicas* desses genes. Esta última categoria continha os genótipos/fenótipos *CYP1A1 TT* (Homozigoto Selvagem) e *NAT2 acetilador rápido ou intermediário*, *CYP1A1 TT* (Homozigoto Selvagem) e *NAT2 acetilador lento*, *CYP1A1 TC* ou *CC* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante) e *NAT2 acetilador rápido ou intermediário*. (Figuras 3D e 4D. Tabelas 7 e 8).

Os genes *XRCC1* e *HOGG1* tiveram os genótipos combinados divididos em duas categorias: Uma categoria composta pelos genótipos combinados *XRCC1 Arg399Gln GA* ou *AA* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante) e *HOGG1 Ser326Cys CG* ou *GG* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante), e outra categoria composta por *Outras combinações genótípicas* desses genes. Esta última categoria continha os genótipos combinados *XRCC1 Arg399Gln GG* (Homozigoto Selvagem) e *HOGG1 Ser326Cys CC* (Homozigoto Selvagem), *XRCC1 Arg399Gln GG* (Homozigoto Selvagem) e *HOGG1 Ser326Cys CG* ou *GG* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante), *XRCC1 Arg399Gln GA* ou *AA* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante) e *HOGG1 Ser326Cys CC* (Homozigoto Selvagem). (Figura 3E e 4E. Tabelas 7 e 8).

Os genes *GSTM1* e *CYP1A1* tiveram os genótipos combinados divididos em duas categorias: Uma categoria composta pelos genótipos combinados *GSTM1 Nulo* e *CYP1A1 TC* ou *CC* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante), e outra categoria composta por *Outras combinações genótípicas* desses genes. Esta última categoria continha os genótipos combinados *GSTM1 Nulo* e *CYP1A1 TT* (Homozigoto Selvagem), *GSTM1 Não Nulo* e *CYP1A1 TT* (Homozigoto Selvagem), *GSTM1 Não Nulo* e *CYP1A1 TC* ou *CC* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante). (Figura 3F e 4F. Tabelas 7 e 8).

Os genes *GSTT1* e *CYP1A1* tiveram os genótipos combinados divididos em duas categorias: Uma categoria composta pelos genótipos combinados *GSTT1 Não Nulo* e *CYP1A1 TC* ou *CC* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante), e outra categoria composta por *Outras combinações*

*genotípicas* desses genes. Esta última categoria continha os genótipos combinados *GSTT1 Nulo* e *CYP1A1 TT* (Homozigoto Selvagem), *GSTT1 Não Nulo* e *CYP1A1 TT* (Homozigoto Selvagem), *GSTT1 Nulo* e *CYP1A1 TC* ou *CC* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante). (Figura 3G e 4G. Tabelas 7 e 8).

Os genes *GSTP1* e *CYP1A1* tiveram os genótipos combinados divididos em duas categorias: Uma categoria composta pelos genótipos combinados *GSTP1 Ile/Val* ou *Val/Val* (Heterozigoto e Homozigoto Variante) e *CYP1A1 TC* ou *CC* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante), e outra categoria composta por *Outras combinações genotípicas* desses genes. Esta última categoria continha os genótipos combinados *GSTP1 Ile/Ile* (Homozigoto Selvagem) e *CYP1A1 TT* (Homozigoto Selvagem), *GSTP1 Ile/Val* ou *Val/Val* (Heterozigoto e Homozigoto Variante) e *CYP1A1 TT* (Homozigoto Selvagem), *GSTP1 Ile/Ile* (Homozigoto Selvagem) e *CYP1A1 TC* ou *CC* (Heterozigoto ou Homozigoto Variante). (Figura 3H e 4H. Tabelas 7 e 8).

## **MEDIDAS DE SOBREVIDA**

A fonte dos dados utilizada foram os prontuários médicos dos pacientes participantes da pesquisa atendidos no Centro de Alta Complexidade em Oncologia da Santa Casa de Itabuna (CACON) e na Clínica Oncológica de Ilhéus (Clioni). A partir deles, foram obtidas as informações referentes à data do diagnóstico da doença, à data do óbito por qualquer causa e à data da recorrência do tumor. Isso permitiu a recomposição da trajetória do tratamento oncológico dos pacientes diagnosticados com CVAS no período de 2008 a 2014. No CACON, todos os prontuários estavam digitalizados, facilitando o acesso às informações contidas neles. Na Clioni, a análise foi feita através dos prontuários físicos. Esta investigação foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB (Número do parecer: 2.296.998). A sobrevida global foi definida como o intervalo entre a data do diagnóstico da doença e a data de óbito por qualquer causa. A sobrevida livre de doença foi mensurada como o intervalo entre a data do diagnóstico da doença e a data da recorrência do tumor. Alguns indivíduos foram censurados devido a não ocorrência do evento (óbito por qualquer motivo para a sobrevida global e recorrência do tumor para a sobrevida livre de doença) ou a não continuação do tratamento.

## **ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

As probabilidades de sobrevida global e sobrevida livre de doença foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier. O teste de log-rank foi aplicado para avaliar a significância estatística das diferenças entre os tempos de sobrevida com os respectivos intervalos de confiança de 95%, de acordo com as variáveis analisadas. Todas as análises foram conduzidas no pacote estatístico SPSS versão 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

## RESULTADOS

A população do estudo foi composta de 101 pacientes diagnosticados com CVAS. Ao final das análises, 72 pacientes encontravam-se vivos e 12 deles tiveram recorrência do tumor. Do total da população estudada, a média de idade foi de 60,3 anos (intervalo entre 30 e 92 anos), 88% eram do sexo masculino, 85% se autodeclararam não brancos, 95% se declararam sempre tabagistas, 76% se declararam sempre etilistas, 88% possuíam baixa escolaridade (Analfabeto – 1º Grau Completo), 65% apresentaram tumor em estágio IV. Os pacientes tiveram como sítio primário do tumor a cavidade oral (26%), a orofaringe (34%), a hipofaringe (8%) e a laringe (32%). O tempo médio de seguimento foi de 30,4 meses. O tempo médio entre o diagnóstico e o início do tratamento foi de 3,2 meses. O percentual de óbitos gerais foi de 28,7%. O percentual de recorrência foi de 11,9%. A média geral da sobrevida global foi de 77,2 meses (IC 95%: 65,2 meses – 89,2 meses). A média geral da sobrevida livre de doença foi de 94,6 meses (IC 95%: 81,5 meses – 107,6 meses). A taxa de sobrevida global em 5 anos foi de 64,4%. A taxa de sobrevida livre de doença em 5 anos foi de 81,4%. (Tabela 4).

Os tempos médios de sobrevida global e sobrevida livre de doença dos genótipos analisados e dos genótipos combinados são demonstrados nas Tabelas 5, 6, 7 e 8.

Com relação à sobrevida global, os indivíduos com genótipos *GSTT1 Nulo* apresentaram um valor de sobrevida global média de 39,2 meses (IC 95%: 16,8 meses – 62 meses), enquanto que aqueles com genótipos *GSTT1 Não Nulo* o valor de sobrevida global média foi de 80,1 meses (IC 95%: 67,6 meses – 92,6 meses),  $p = 0,109$ . (Figura 1B e Tabela 5). Com relação à sobrevida livre de doença, os indivíduos com fenótipo *NAT2 acetilador lento* apresentaram um valor de sobrevida livre de doença média de 86,4 meses (IC 95%: 64,7 meses – 108,1 meses), enquanto que aqueles com fenótipo *NAT2 acetilador rápido ou intermediário* o valor de sobrevida livre de doença média foi de 94 meses (IC 95%: 80,5 meses – 107,5 meses),  $p = 0,125$ . (Figura 2G e Tabela 6). Embora consideráveis, as diferenças observadas não foram estatisticamente significantes.

Com relação à sobrevida global, quando os genótipos foram combinados, os indivíduos *GSTM1 Nulo* e *GSTT1 Não Nulo* apresentaram um valor de sobrevida global média de 77,6 meses (IC 95%: 61 meses – 94,3 meses), enquanto que os indivíduos *Outras combinações genotípicas* apresentaram um valor de sobrevida global média de 71,1 meses (IC 95%: 55,8 meses – 86,4 meses),  $p = 0,189$ . (Figura 3A e Tabela 7). Com relação à sobrevida livre de doença, quando os genótipos/fenótipos foram combinados, os indivíduos *CYP1A1 TC* ou *CC* e *NAT2 acetilador lento* apresentaram um valor de sobrevida livre de doença média de 74,2 meses (IC 95%: 35

meses – 113,6 meses), enquanto que os indivíduos *Outras combinações genotípicas* apresentaram um valor de sobrevida livre de doença média de 91 meses (IC 95%: 78,5 meses – 103,2 meses),  $p = 0,063$ . (Figura 4D e Tabela 8). Embora consideráveis, as diferenças observadas não foram estatisticamente significantes.

As distribuições das curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com polimorfismos em genes de biotransformação e reparo de DNA são mostradas nas Figuras 1, 2, 3 e 4.

## DISCUSSÃO

Nesse estudo nós investigamos a associação de polimorfismos em genes de biotransformação e reparo de DNA com a sobrevida de pacientes diagnosticados com câncer das vias aerodigestivas superiores. O método de Kaplan-Meier foi utilizado para produzir curvas de sobrevivência e as comparações entre as curvas foram feitas usando o teste log-rank.

Embora no presente trabalho não tenham sido verificadas associações significantes entre os polimorfismos nos diferentes genes de biotransformação e reparo de DNA avaliados e as medidas de sobrevida no CVAS, o impacto de variantes nesses genes sobre esses desfechos foi anteriormente relatado por outros autores [13,14,15,25,29,30,31,32,33,34].

A sobrevivência, assim como em nossos achados, não diferiu significativamente para os genótipos *GSTM1 Nulo* e *GSTM1 Não Nulo* em 106 pacientes chineses diagnosticados com câncer no ovário e tratados com quimioterapia. O genótipo *GSTP1 Ile105Val Ile/Val* (Heterozigoto) não apresentou risco aumentado de morte em comparação com o genótipo *GSTP1 Ile105Val Ile/Ile* (Homozigoto Selvagem) [30].

O genótipo *GSTT1 Não Nulo* pode conferir uma menor proteção contra o desenvolvimento de tumores cerebrais e uma possível relação pode ocorrer entre esse genótipo e o aumento da sobrevida em pacientes portadores de gliomas malignos [31]. Nesse estudo, marcador associado positivamente ao risco de câncer pode apresentar uma relação inversa com a sobrevida. Essa tendência foi observada nos nossos achados, pois uma associação pode ocorrer entre os indivíduos com genótipo *GSTT1 Não Nulo* e o aumento da sobrevida global em pacientes diagnosticados com CVAS, ainda que o resultado não tenha sido estatisticamente significativo. E esse mesmo genótipo foi considerado um fator de risco para o CVAS em estudo anterior que teve como população amostral os mesmos indivíduos analisados em nossa pesquisa [32].

Num estudo conduzido em uma população indiana não foi observada uma associação significativa entre o polimorfismo de *CYP1A1 rs4646903* e o risco de câncer cervical [25]. Em nossos achados não foi encontrada associação significativa entre os polimorfismos em *GSTM1 Nulo* e o *CYP1A1 rs4646903* com a sobrevida global de pacientes com CVAS. Esse mesmo resultado foi obtido em um estudo de uma população da região sudeste do Brasil envolvendo 153 pacientes diagnosticados com CVAS [33].

Nos Estados Unidos, uma forte relação foi demonstrada entre a expressão da enzima *XRCC1* e a sobrevida global de pacientes diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço. A expressão elevada da enzima *XRCC1* foi associada com uma sobrevida mais baixa, particularmente em pacientes tratados com quimioterapia [14]. Pacientes com câncer de pulmão de uma população

do norte da Índia com genótipo *XRCC1 Arg399Gln AA* (Homozigoto Variante) tiveram aumento da sobrevida global se comparados com os portadores de genótipos *XRCC1 Arg399Gln GG* (Homozigoto Selvagem) e *XRCC1 Arg399Gln GA* (Heterozigoto) [34]. Por sua vez, pacientes chineses diagnosticados com câncer de pulmão de genótipos *HOGG1 Ser326Cys CG* (Heterozigoto) e *HOGG1 Ser326Cys GG* (Homozigoto Variante) apresentaram uma sobrevida global reduzida se comparados com aqueles com o genótipo *HOGG1 Ser326Cys CC* (Homozigoto Selvagem), especialmente no sexo feminino [15].

Existem pelo menos sessenta polimorfismos *NAT2* conhecidos agrupados em fenótipos de acetiladores lentos, intermediários e rápidos que foram associados ao risco de câncer [29]. O gene *NAT2* pode ser considerado como fator prognóstico para a sobrevivência de pacientes em outros tipos de cânceres [13]. Análise de polimorfismos mostrou que indivíduos *NAT2 acetilador rápido* apresentaram taxa de sobrevida global de 5 anos 19,7% superior a dos *NAT2 acetilador lento* diagnosticados tanto com câncer de orofaringe quanto com câncer da cavidade oral [29].

O reduzido valor amostral ocorreu devido às dificuldades de se realizar um seguimento de pacientes oncológicos residentes no interior do Brasil. Apesar disso, importantes associações foram encontradas, ainda que não tenham sido estatisticamente significantes.

A comparação das curvas de sobrevida global para os genótipos *GSTT1*, juntamente com a comparação das curvas de sobrevida livre de doença para os fenótipos *NAT2* foram as que apresentaram diferenças mais destacadas. Na primeira, pacientes com o genótipo *GSTT1 Não Nulo* apresentaram sobrevida global superior àqueles com o genótipo *GSTT1 Nulo*, ainda que estatisticamente não significante (Figura 1B). Na segunda, pacientes com o fenótipo *NAT2 acetilador rápido ou intermediário* apresentaram sobrevida livre de doença superior àqueles com o fenótipo *NAT2 acetilador lento*, ainda que estatisticamente não significante (Figura 2G). Além disso, a comparação da curva de sobrevida global para os genótipos combinados *GSTM1* e *GSTT1*, juntamente com a comparação da curva de sobrevida livre de doença para os genótipos/fenótipos *CYP1A1* e *NAT2* foram as que apresentaram diferenças mais destacadas. Na primeira, pacientes com os genótipos combinados *GSTM1 Nulo* e *GSTT1 Não Nulo* apresentaram sobrevida global superior àqueles indivíduos com *Outras combinações genotípicas* para esses dois genes, ainda que estatisticamente não significante (Figura 3A). Na segunda, pacientes com *Outras combinações genotípicas/fenotípicas* para os genes *CYP1A1* e *NAT2* apresentaram sobrevida livre de doença superior àqueles indivíduos com genótipo/fenótipo *CYP1A1 TC* ou *CC* e *NAT2 acetilador lento*, ainda que estatisticamente não significante (Figura 4D). Isso demonstra a importância dos nossos achados e a necessidade de

realização de novas pesquisas envolvendo pacientes diagnosticados com CVAS na região sul do estado da Bahia.

## **AGRADECIMENTOS**

A todos que colaboraram para a realização dessa pesquisa que envolveu a participação das equipes da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC e da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

**REFERÊNCIAS**

- [1] Braakhuis BJM, Brakenhoff RH, Leemans CR. Treatment choice for locally advanced head and neck cancers on the basis of risk factors: biological risk factors. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2012;23 Suppl 10:x173-7. doi:10.1093/annonc/mds299.
- [2] Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil, [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2018/inc-a-estima-cerca-600-mil-casos-novos-cancer-para-2018; 2018](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2018/inc-a-estima-cerca-600-mil-casos-novos-cancer-para-2018;_2018) [acessado em 03 de fevereiro de 2018].
- [3] Hopkins J, Cescon DW, Tse D, Bradbury P, Xu W, Ma C, et al. Genetic polymorphisms and head and neck cancer outcomes: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:490–9. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-2714.
- [4] Farnebo L, Stjernstrom A, Fredrikson M, Ansell A, Garvin S, Thunell LK. DNA repair genes XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 are associated with risk and survival of squamous cell carcinoma of the head and neck. *DNA Repair (Amst)* 2015;31:64–72. doi:10.1016/j.dnarep.2015.05.003.
- [5] Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 2009;21:194–200. doi:10.1097/CCO.0b013e32832a68ca.
- [6] Gupta B, Johnson NW, Kumar N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology* 2016;91:13–23. doi:10.1159/000446117.
- [7] Gupta B, Bray F, Kumar N, Johnson NW. Associations between oral hygiene habits, diet, tobacco and alcohol and risk of oral cancer: A case-control study from India. *Cancer Epidemiol* 2017;51:7–14. doi:10.1016/j.canep.2017.09.003.
- [8] Khlifi R, Chakroun A, Hamza-Chaffai A, Rebai A. Association of CYP1A1 and CYP2D6 gene polymorphisms with head and neck cancer in Tunisian patients. *Mol Biol Rep* 2014;41:2591–600. doi:10.1007/s11033-014-3117-6.
- [9] Feki-Tounsi M, Khlifi R, Louati I, Fourati M, Mhiri M-N, Hamza-Chaffai A, et al. Polymorphisms in XRCC1, ERCC2, and ERCC3 DNA repair genes, CYP1A1

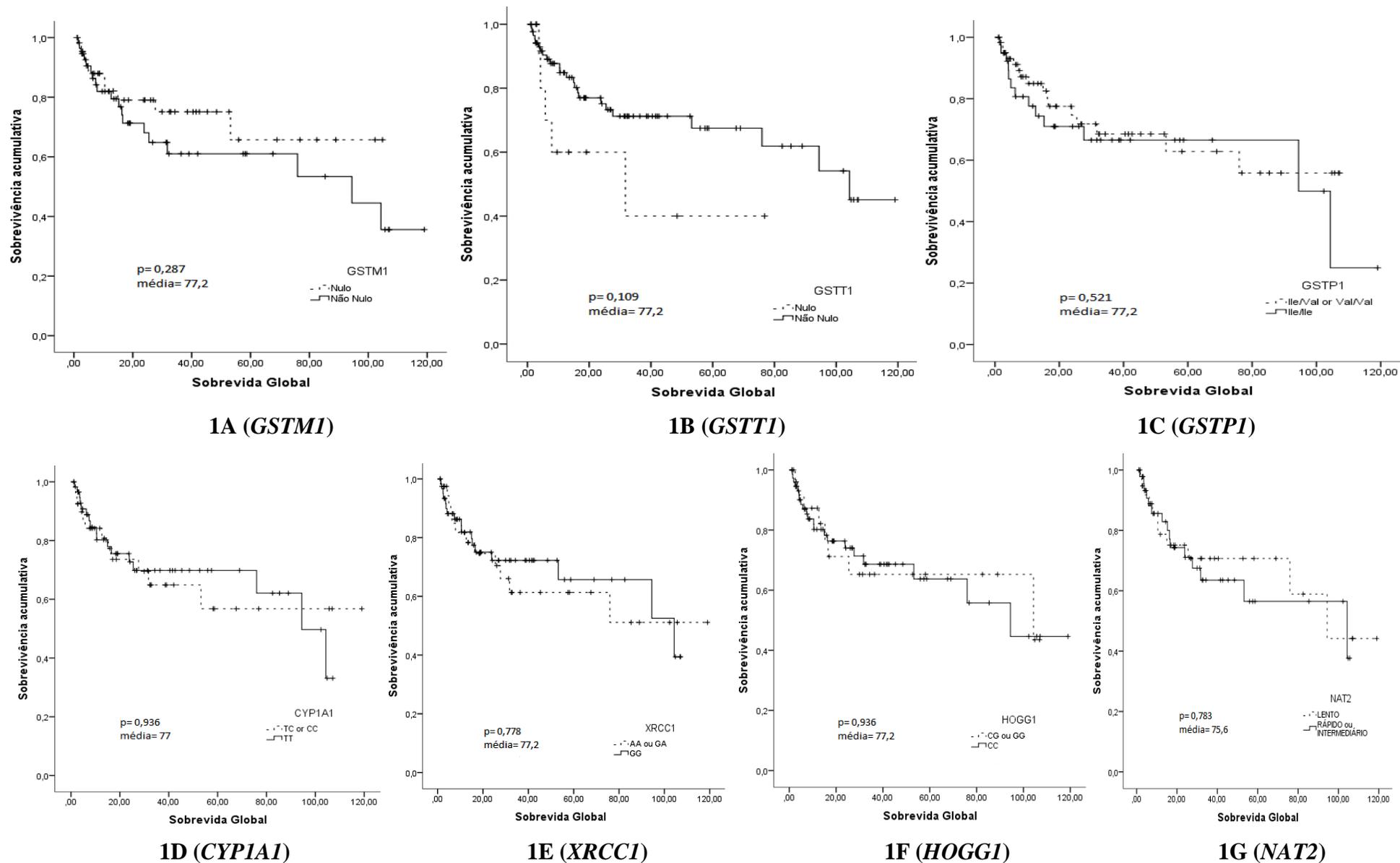
- xenobiotic metabolism gene, and tobacco are associated with bladder cancer susceptibility in Tunisian population. *Environ Sci Pollut Res Int* 2017;24:22476–84. doi:10.1007/s11356-017-9767-x.
- [10] Weiss JM, Goode EL, Ladiges WC, Ulrich CM. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. *Mol Carcinog* 2005;42:127–41. doi:10.1002/mc.20067.
- [11] Choudhury JH, Singh SA, Kundu S, Choudhury B, Talukdar FR, Srivasta S, et al. Tobacco carcinogen-metabolizing genes CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and their interaction with tobacco exposure influence the risk of head and neck cancer in Northeast Indian population. *Tumour Biol* 2015;36:5773–83. doi:10.1007/s13277-015-3246-0.
- [12] Li F, Wang J, Chen M. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and the risk of laryngeal cancer: A meta-analysis. *Biomed Pharmacother* 2016;78:92–100. doi:10.1016/j.biopha.2015.12.019.
- [13] Osian G, Procopciuc L, Vlad L, Iancu C, Cristea PG, Mocan T, et al. NAT2 polymorphisms and sporadic colorectal cancer survival. *J Gastrointestin Liver Dis* 2010;19:361–8.
- [14] Ang M-K, Patel MR, Yin X-Y, Sundaram S, Fritchie K, Zhao N, et al. High XRCC1 protein expression is associated with poorer survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2011;17:6542–52. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1604.
- [15] Su Y, Zhang H, Xu F, Kong J, Yu H, Qian B. DNA Repair Gene Polymorphisms in Relation to Non-Small Cell Lung Cancer Survival. *Cell Physiol Biochem* 2015;36:1419–29. doi:10.1159/000430307.
- [16] Ekhardt C, Rodenhuis S, Smits PHM, Beijnen JH, Huitema ADR. An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. *Cancer Treat Rev* 2009;35:18–31. doi:10.1016/j.ctrv.2008.07.003.

- [17] Pasqualetti F, Gonnelli A, Cantarella M, Delishaj D, Molinari A, Ortenzi V, et al. Association of Glutathione S-Transferase P-1 (GSTP-1) rs1695 polymorphism with overall survival in glioblastoma patients treated with combined radio-chemotherapy. *Invest New Drugs* 2017. doi:10.1007/s10637-017-0516-2.
- [18] Jalal S, Earley JN, Turchi JJ. DNA repair: from genome maintenance to biomarker and therapeutic target. *Clin Cancer Res* 2011;17:6973–84. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0761.
- [19] Wang L, Xu J, Duan B. Association between polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 and non-melanoma skin cancer risk: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 2017;10:3475–83. doi:10.2147/OTT.S133978.
- [20] Mitra AK, Singh SV, Garg VK, Sharma M, Chaturvedi R, Rath SK. Protective association exhibited by the single nucleotide polymorphism (SNP) rs1052133 in the gene human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOGG1) with the risk of squamous cell carcinomas of the head & neck (SCCHN) among north Indians. *Indian J Med Res* 2011;133:605–12.
- [21] Singh SA, Ghosh SK. Metabolic Phase I (CYPs) and Phase II (GSTs) Gene Polymorphisms and Their Interaction with Environmental Factors in Nasopharyngeal Cancer from the Ethnic Population of Northeast India. *Pathol Oncol Res* 2017. doi:10.1007/s12253-017-0309-0.
- [22] Zhang L, Xiang Z, Hao R, Li R, Zhu Y. N-acetyltransferase 2 genetic variants confer the susceptibility to head and neck carcinoma: evidence from 23 case-control studies. *Tumour Biol* 2014;35:3585–95. doi:10.1007/s13277-013-1473-9.
- [23] Andres SA, Bickett KE, Alatoum MA, Kalbfleisch TS, Brock GN, Wittliff JL. Interaction between smoking history and gene expression levels impacts survival of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2015;152:545–56. doi:10.1007/s10549-015-3507-z.
- [24] Abo-Bakr A, Mossallam G, El Azhary N, Hafez H, Badawy R. Impact of CYP1A1, GSTP1 and XRCC1 genes polymorphisms on toxicity and response to chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Egypt Natl Canc Inst* 2017;29:127–33.

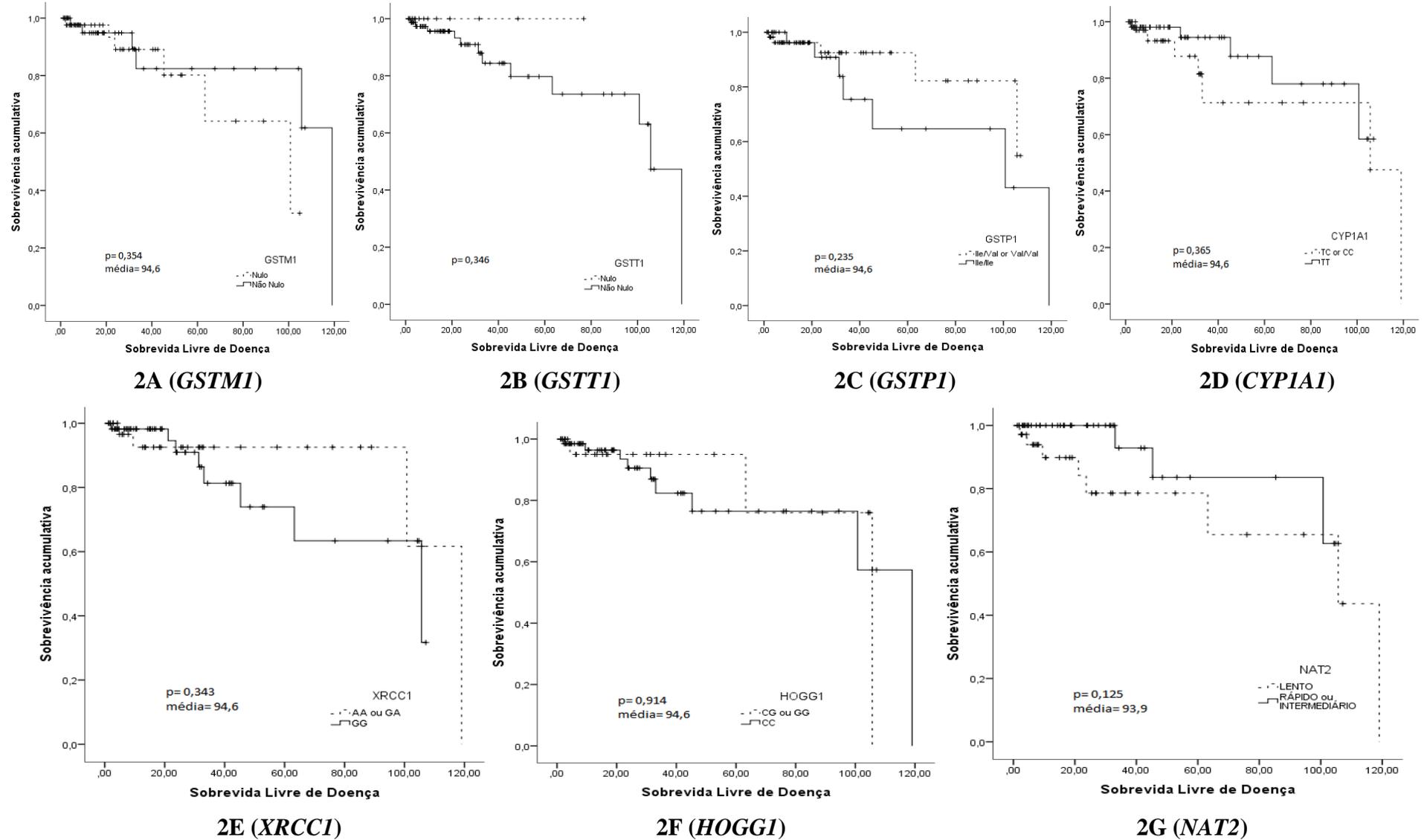
doi:10.1016/j.jnci.2017.07.002.

- [25] Jain V, Ratre YK, Amle D, Mishra PK, Patra PK. Polymorphism of CYP1A1 gene variants rs4646903 and rs1048943 relation to the incidence of cervical cancer in Chhattisgarh. *Environ Toxicol Pharmacol* 2017;52:188–92. doi:10.1016/j.etap.2017.04.009.
- [26] Wang F, Qin Z, Si S, Tang J, Xu L, Xu H, et al. Lack of association between NAT2 polymorphism and prostate cancer risk: a meta-analysis and trial sequential analysis. *Oncotarget* 2017;8:57440–50. doi:10.18632/oncotarget.19023.
- [27] Hara A, Taira N, Mizoo T, Nishiyama K, Nogami T, Iwamoto T, et al. N-acetyltransferase 2 polymorphism and breast cancer risk with smoking: a case control study in Japanese women. *Breast Cancer* 2017;24:254–62. doi:10.1007/s12282-016-0696-1.
- [28] Makhtar SM, Husin A, Baba AA, Ankathil R. Association of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Ile105Val polymorphisms with clinical response to imatinib mesylate treatment among Malaysian chronic myeloid leukaemia patients. *J Genet* 2017;96:633–9.
- [29] Troy JD, Weissfeld JL, Diergaarde B, Youk AO, Buch SC, Romkes M, et al. Polymorphisms in NAT2 and GSTP1 are associated with survival in oral and oropharyngeal cancer. *Cancer Epidemiol* 2013;37:505–11. doi:10.1016/j.canep.2013.02.009.
- [30] Zhai X-H, Huang J, Wu F-X, Zhu D-Y, Wang A-C. Impact of XRCC1, GSTP1, and GSTM1 Polymorphisms on the Survival of Ovarian Carcinoma Patients Treated with Chemotherapy. *Oncol Res Treat* 2016;39:440–6. doi:10.1159/000447337.
- [31] Silva MS da M e, Carvalho M da G lovis orlando da F, Santos TQ, Bucco BM. Estudo do polimorfismo dos genes GSTT1 e GSTM1 em pacientes de gliomas malignos. *Rev Ciências Médicas E Biológicas* 2010;9:200–3.
- [32] Silva TM, Marques CR, Marques Filho MF, Marques AB, Di Pietro G, Rios-Santos F. Association of the GSTT1 polymorphism in upper aerodigestive tract cancer with tobacco smoking. *Genet Mol Res* 2014;13:528–37. doi:10.4238/2014.January.21.22.

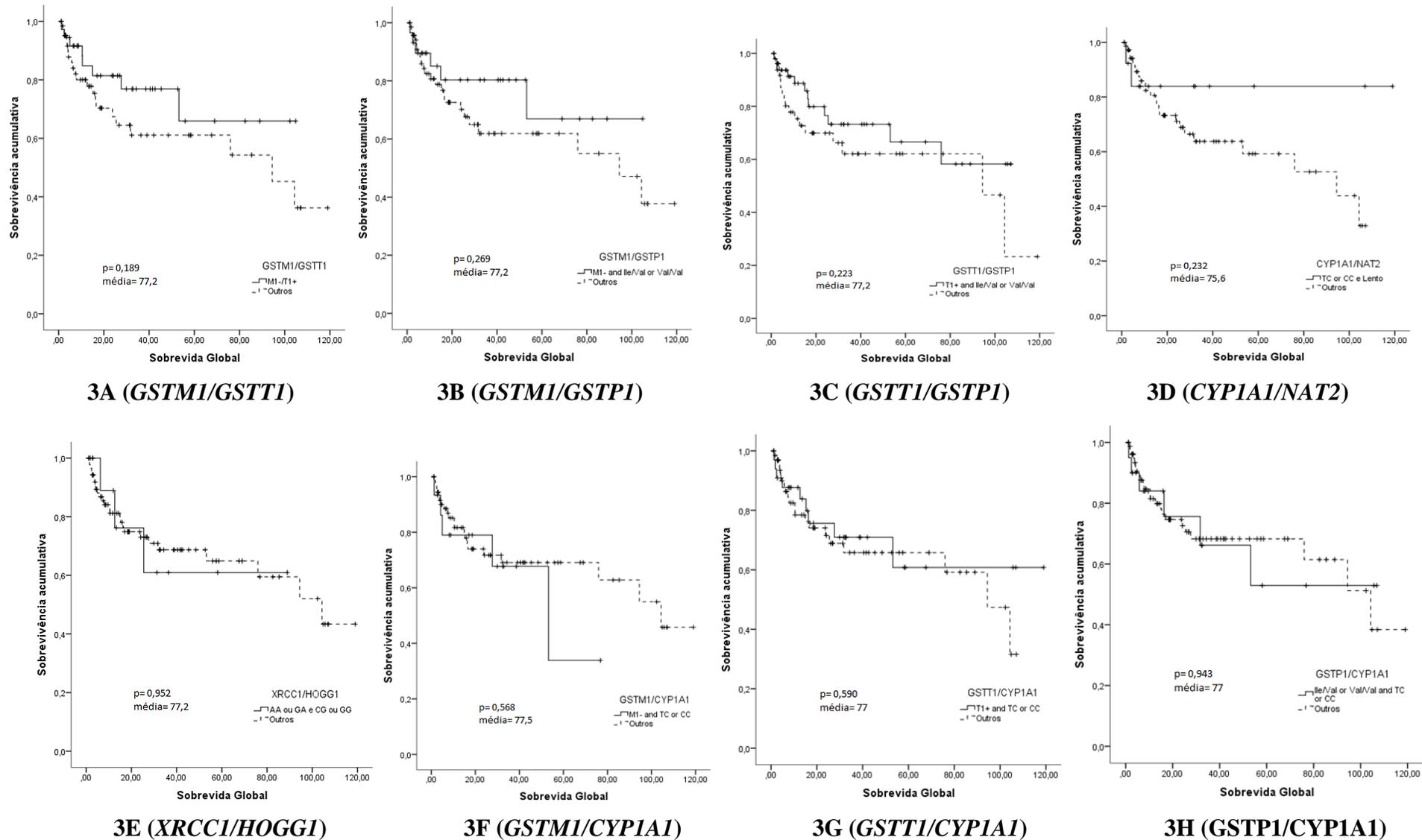
- [33] Olivieri EHR, da Silva SD, Mendonca FF, Urata YN, Vidal DO, Faria M de AM, et al. CYP1A2\*1C, CYP2E1\*5B, and GSTM1 polymorphisms are predictors of risk and poor outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 2009;45:e73-9. doi:10.1016/j.oraloncology.2009.03.004.
- [34] Singh A, Singh N, Behera D, Sharma S. Polymorphism in XRCC1 gene modulates survival and clinical outcomes of advanced North Indian lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy. *Med Oncol* 2017;34:64. doi:10.1007/s12032-017-0923-4.



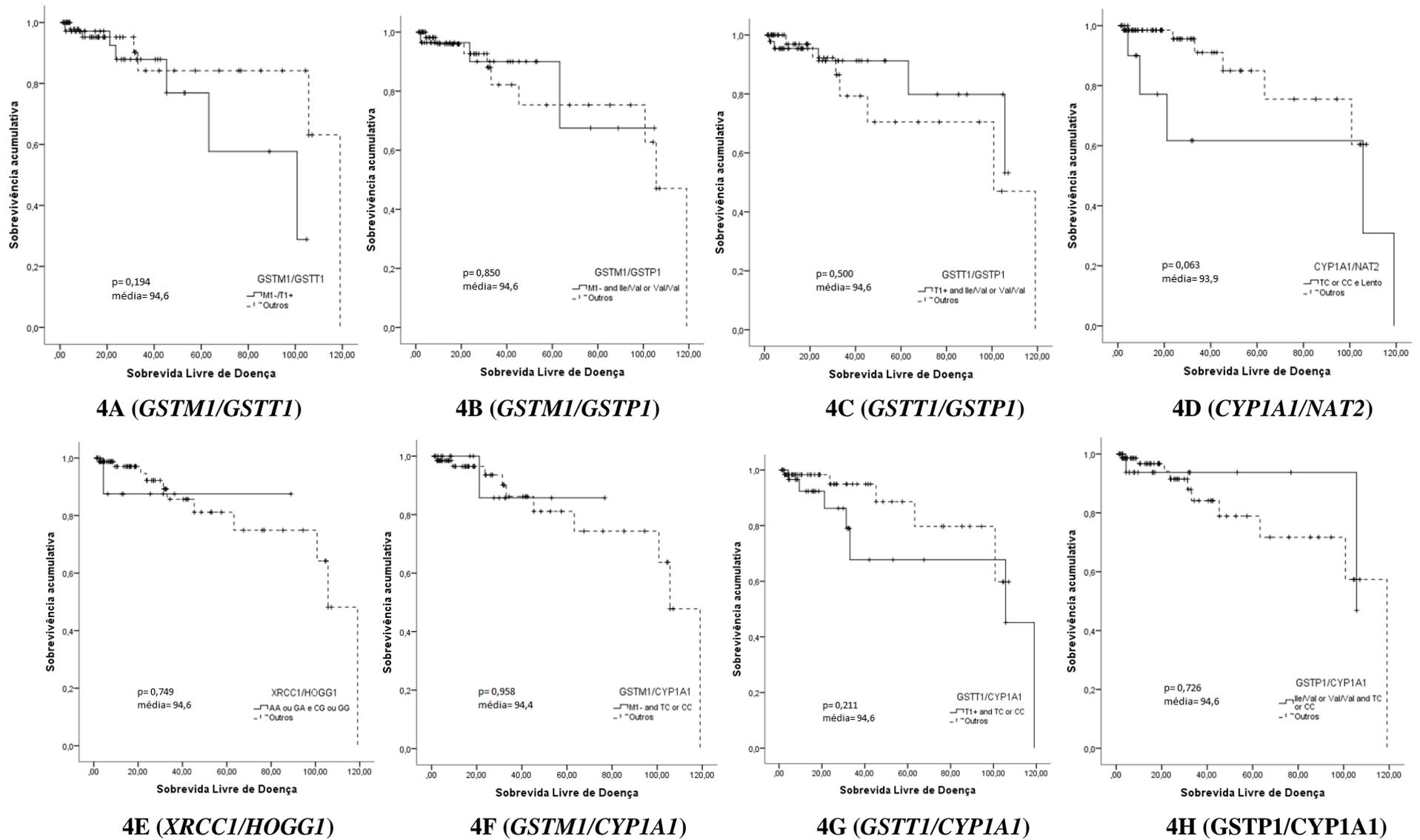
**Figura 1.** Curvas de sobrevida global: 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G.



**Figura 2.** Curvas de sobrevida livre de doença: 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G.



**Figura 3.** Curvas de sobrevida global (Genes combinados): 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, 3G, 3H.



**Figura 4.** Curvas de sobrevida livre de doença (Genes combinados): 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F, 4G, 4H.

**Tabela 1.** Reagentes utilizados nas reações da Reação em Cadeia da Polimerase

<i>XRCC1 e HOGG1</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>NAT2</i>	<i>GSTM1 e GSTT1</i>	<i>GSTP1</i>
DNA (100ng/20µg)	DNA (50ng/50µg)	DNA (50ng/50µg)	DNA (100ng/20µg)	DNA (100ng/25µg)
Tampão	Tampão	Tampão	Tampão	Tampão
MgCl <sub>2</sub> (1,5 mM)	MgCl <sub>2</sub> (1,5 mM)	MgCl <sub>2</sub> (1,5 mM)	MgCl <sub>2</sub> (1,5 mM)	MgCl <sub>2</sub> (1,5 mM)
dNTP's	dNTP's	dNTP's	dNTP's	dNTP's
DNA	DNA	DNA	DNA	DNA
Polimerase (1,0 U)	Polimerase (1,25 U)	Polimerase (1,25 U)	Polimerase (1,25 U)	Polimerase (1,25 U)
Primers (0,5µg)	Primers(0,5µg)	Primers (0,5µg)	Primers (0,5µg)	Primers (100ng/µl)

**Tabela 2.** Primers utilizados nas reações da Reação em Cadeia da Polimerase

Gene	Primers
<i>XRCC1</i>	F: 5'GGACTGTCACCGCATGCGTCCG3' R: 5'GGCTGGGACCACCTGTGTT3'
<i>HOGG1</i>	F: 5'CTGTTTCAGTGCCGACCTGCGCCGA3' R: 5'ATCTTGTTGTGCAAACCTGAC3'
<i>CYP1A1</i>	F: 5'CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT3' R: 5'AGGCATGAGACAAGACTCCTA3'
<i>NAT2</i>	F: 5'GGCTATAAGAACTCTAGGAAC3' R: 5'AAGGGTTTATTTTGTTCCTTATTCTAAAT3'
<i>GSTM1</i>	F: 5'TCACCGGATCATGGCCAGCA3' R: 5'GTTGGGCTCAAATATACGGTGG3'
<i>GSTT1</i>	F: 5'TCTCCTTACTGGTCCTCACAT3' R: 5'TCACGGGATCATGGCCAGCA3'
<i>GSTP1</i>	F: 5'ACCCAGGGCTCTATGGGAA3' R: 5'TGAGGGCACAAGAAGCCCCT3'

**Tabela 3.** Enzimas de restrição utilizadas na digestão dos materiais amplificados nas reações da Reação em Cadeia da Polimerase

Gene	Enzima de Restrição	Sítio de Restrição	Temperatura
<i>XRCC1</i>	<i>MspI</i>	...CCGG... ...GGCC...	37°C
<i>HOGG1</i>	<i>MboI</i>	...NGATCN... ...NCTAGN...	37°C
<i>CYP1A1</i>	<i>MspI</i>	...CCGG... ...GGCC...	37°C
	<i>MspI</i>	...CCGG... ...GGCC...	37°C
	<i>KpnI</i>	...GGTACC... ...CCATGG...	37°C
	<i>TaqI</i>	...TCGA... ...AGCT...	65°C
<i>NAT2</i>	<i>BamHI</i>	...GGATCC... ...CCTAGG...	37°C
	<i>FokI</i>	...GGATGNNNNNNNNNNNNNNNNNN... ...CCTACNNNNNNNNNNNNNNNNNN...	37°C
	<i>DraIII</i>	...CACNNNGTG... ...GTGNNNCAC...	37°C
<i>GSTP1</i>	<i>BsmI</i>	...GTCTCNNNNNNN... ...CAGAGNNNNNN...	55°C

**Tabela 4.** Características dos pacientes diagnosticados com CVAS

<b>Características</b>	<b>N (%)</b>
Sexo	
Masculino	89 (88,1%)
Feminino	12 (11,9%)
Idade, média (dp)	60,3 anos (12,5)
Cor	
Branco	15 (14,9%)
Não Branco	86 (85,1%)
Tabagista	
Sempre	96 (95%)
Nunca	5 (5%)
Etilista	
Sempre	77 (76,2%)
Nunca	24 (23,8%)
Escolaridade	
Analfabeto	17 (16,7%)
Assina Apenas o Nome	23 (22,8%)
Alfabetizado	13 (12,9%)
1º Grau Incompleto	33 (32,6%)
1º Grau Completo	3 (3%)
2º Grau Incompleto	1 (1%)
2º Grau Completo	7 (7%)
Superior Incompleto	2 (2%)
Superior Completo	2 (2%)
Estágio do Tumor *	
I	3 (3%)
II	5 (5%)
III	12 (11,9%)
IV	66 (65,3%)
Sítio Primário do Tumor*	
Cavidade Oral	26 (25,7%)
Orofaringe	34 (33,7%)
Hipofaringe	8 (7,9%)
Laringe	32 (31,7%)
Tempo de seguimento, média (dp)	30,4 meses (3,15)
Tempo entre diagnóstico e tratamento, média (dp)	3,2 meses (0,94)
Óbitos gerais	29(28,7%)
Recorrência	12(11,9%)
Sobrevida global, média (IC 95%)	77,2 meses (65,2 – 89,2)
Sobrevida livre de doença, média (IC 95%)	94,6 meses (81,5 – 107,6)
Sobrevida global em 5 anos	64,4%
Sobrevida livre de doença em 5 anos	81,4%

\*Alguns pacientes não tiveram os dados especificados

**Tabela 5.** Tempo médio de sobrevida global dos pacientes diagnosticados com CVAS

<b>Genótipos e Fenótipos</b>	<b>Tempo (meses)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>Valor de p</b>
<i>GSTM1 Nulo</i>	76,4	(61 – 92)	0,287
<i>GSTM1 Não Nulo</i>	71,1	(55,1 – 87,1)	
<i>GSTT1 Nulo</i>	39,2	(16,8 – 61,6)	0,109
<i>GSTT1 Não Nulo</i>	80,1	(67,6 – 92,6)	
<i>GSTP1 Ile/Val ou Val/Val</i>	72,6	(59 – 86,3)	0,521
<i>GSTP1 Ile/Ile</i>	74,6	(57,1 – 92,2)	
<i>CYP1A1 TC ou CC</i>	76,6	(57,2 – 96,0)	0,936
<i>CYP1A1 TT</i>	73,7	(60,7 – 86,6)	
<i>XRCC1 AA ou GA</i>	74,3	(55 – 93,8)	0,778
<i>XRCC1 GG</i>	74,5	(61,3 – 87,7)	
<i>HOGG1 CG ou GG</i>	73,6	(54 – 93,3)	0,936
<i>HOGG1 CC</i>	76,1	(61,5 – 90,7)	
<i>NAT2 lento</i>	78,5	(60 – 97,1)	0,783
<i>NAT2 rápido ou intermediário</i>	68,6	(53,3 – 83,8)	

**Tabela 6.** Tempo médio de sobrevida livre de doença dos pacientes diagnosticados com CVAS

<b>Genótipos e Fenótipos</b>	<b>Tempo (meses)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>Valor de p</b>
<i>GSTM1 Nulo</i>	82,1	(65,7 – 98,4)	0,354
<i>GSTM1 Não Nulo</i>	99,7	(82,3 – 117,1)	
<i>GSTT1 Nulo</i>	*	*	0,346
<i>GSTT1 Não Nulo</i>	*	*	
<i>GSTP1 Ile/Val ou Val/Val</i>	95,2	(84,1 – 106,3)	0,235
<i>GSTP1 Ile/Ile</i>	84,4	(60,4 – 108,3)	
<i>CYP1A1 TC ou CC</i>	88,7	(65,5 – 112)	0,365
<i>CYP1A1 TT</i>	92,4	(80,1 – 104,6)	
<i>XRCC1 AA ou GA</i>	105	(89 – 121)	0,343
<i>XRCC1 GG</i>	82,2	(66,7 – 97,7)	
<i>HOGG1 CG ou GG</i>	92,5	(72,1 – 113)	0,914
<i>HOGG1 CC</i>	94,4	(78,4 – 110,3)	
<i>NAT2 lento</i>	86,4	(64,7 – 108,1)	0,125
<i>NAT2 rápido ou intermediário</i>	94	(80,5 – 107,5)	

\* Não foi calculado, pois todos os casos foram censurados.

**Tabela 7.** Tempo médio de sobrevida global dos pacientes diagnosticados com CVAS (Genes combinados)

<b>Genótipos e Genótipos/Fenótipos Combinados</b>	<b>Tempo (meses)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>Valor de p</b>
<i>GSTM1 Nulo e GSTT1 Não Nulo</i>	77,6	(61 – 94,3)	0,189
<i>Outras combinações genóticas</i>	71,1	(55,8 – 86,4)	
<i>GSTM1 Nulo e GSTP1 Ile/Val ou Val/Val</i>	78,7	(60,1 – 97,3)	0,269
<i>Outras combinações genóticas</i>	72,5	(58,2 – 87)	
<i>GSTT1 Não Nulo e GSTP1 Ile/Val ou Val/Val</i>	76	(61,3 – 90,4)	0,223
<i>Outras combinações genóticas</i>	71	(54,6 – 87,3)	
<i>CYP1A1 TC ou CC e NAT2 lento</i>	100,4	(76,6 – 124,1)	0,232
<i>Outras combinações genóticas/fenóticas</i>	67,4	(55,1 – 79,7)	
<i>XRCC1 AA ou GA e HOGG1 CG ou GG</i>	60,4	(34,7 – 86,1)	0,952
<i>Outras combinações genóticas</i>	77,5	(64,5 – 90,1)	
<i>GSTM1 Nulo e CYP1A1 TC ou CC</i>	48	(30 – 66)	0,568
<i>Outras combinações genóticas</i>	79,8	(66,4 – 93,2)	
<i>GSTT Não Nulo e CYP1A1 TC ou CC</i>	81,1	(60,4 – 102)	0,590
<i>Outras combinações genóticas</i>	70,7	(58 – 83,4)	
<i>GSTP1 Ile/Val ou Val/Val e CYP1A1 TC ou CC</i>	68,5	(44,6 – 92,4)	0,943
<i>Outras combinações genóticas</i>	77,6	(64,4 – 90,8)	

**Tabela 8.** Tempo médio de sobrevida livre de doença dos pacientes diagnosticados com CVAS (Genes combinados)

<b>Genótipos e Genótipos/Fenótipos Combinados</b>	<b>Tempo (meses)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>Valor de p</b>
<i>GSTM1 Nulo e GSTT1 Não Nulo</i>	78,6	(60,1 – 97,1)	0,194
<i>Outras combinações genóticas</i>	101,3	(85,4 – 117,1)	
<i>GSTM1 Nulo e GSTP1 Ile/Val ou Val/Val</i>	86,6	(67,5 – 105,6)	0,850
<i>Outras combinações genóticas</i>	92,7	(75,7 – 109,7)	
<i>GSTT1 Não Nulo e GSTP1 Ile/Val ou Val/Val</i>	93,5	(81 – 106)	0,500
<i>Outras combinações genóticas</i>	89	(67,8 – 110,3)	
<i>CYP1A1 TC ou CC e NAT2 lento</i>	74,2	(35 – 113,6)	0,063
<i>Outras combinações genóticas/fenóticas</i>	91	(78,5 – 103,2)	
<i>XRCC1 AA ou GA e HOGG1 CG ou GG</i>	78,4	(59 – 97,8)	0,749
<i>Outras combinações genóticas</i>	94,4	(80,8 – 108,1)	
<i>GSTM1 Nulo e CYP1A1 TC ou CC</i>	68,8	(54,4 – 83,2)	0,958
<i>Outras combinações genóticas</i>	94,3	(79,7 – 108,8)	
<i>GSTT Não Nulo e CYP1A1 TC ou CC</i>	85,4	(60,1 – 110,7)	0,211
<i>Outras combinações genóticas</i>	93,4	(82 – 105)	
<i>GSTP1 Ile/Val ou Val/Val e CYP1A1 TC ou CC</i>	99,4	(82,3 – 116,4)	0,726
<i>Outras combinações genóticas</i>	93,4	(78 – 108,7)	

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

Esse estudo apresenta informações importantes a respeito de uma relação entre genótipos e genótipos/fenótipos e sobrevida global e sobrevida livre de doença de pacientes diagnosticados com carcinoma das vias aerodigestivas na região sul do estado da Bahia.

O número amostral reduzido somado ao número de indivíduos censurados pela não ocorrência do evento (óbito por qualquer motivo ou recorrência do tumor) ou pela interrupção no acompanhamento de alguns pacientes, foram alguns dos obstáculos encontrados. Entretanto, importantes associações foram encontradas, ainda que não estatisticamente significantes.

Os indivíduos com genótipo *GSTT1 Não Nulo*, ou seja, que não sofreram deleção em ambos os alelos, apresentaram um aumento da sobrevida global se comparados com os indivíduos de genótipo *GSTT1 Nulo*.

Os indivíduos com genótipo combinado *GSTM1 Nulo* e *GSTT1 Não Nulo*, ou seja, que sofreram deleção em ambos os alelos do *GSTM1* e não sofreram deleção no *GSTT1*, apresentaram um aumento da sobrevida global se comparados com os indivíduos de *Outras combinações genotípicas* entre esses dois genes.

Os indivíduos de fenótipo *NAT2 acetilador rápido ou intermediário* apresentaram um aumento da sobrevida livre de doença se comparados com aqueles de fenótipo *NAT2 acetilador lento*.

Os indivíduos de genótipo/fenótipo combinados *Outras combinações genotípicas/fenotípicas* apresentaram um aumento da sobrevida livre de doença se comparados com aqueles de genótipo/fenótipo combinado *CYP1A1 TC ou CC* e *NAT2 acetilador lento*.

Isso demonstra a importância na continuação dessa pesquisa, com a obtenção de uma maior população amostral e a necessidade de realização de novas análises genéticas na região sul do estado da Bahia.