



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

QUÉZIA ANDERS

**ANÁLISE DO GENE MTHFR EM RELAÇÃO À RADIOSSENSIBILIDADE
TUMORAL DE PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA
E PESCOÇO**

Vitória
2014

QUÉZIA ANDERS

**ANÁLISE DO GENE MTHFR EM RELAÇÃO À RADIOSSENSIBILIDADE
TUMORAL DE PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA
E PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Iúri Drumond Louro

Co-Orientador: Profa. Dra. Adriana Madeira
Alvares da Silva Conforti

Vitória
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

A544a Anders, Quézia Silva, 1987-
Análise do gene MTHFR em relação à radiosensibilidade tumoral de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço / Quézia Silva Anders – 2014.
68 f. : il.

Orientador: Lúri Drumond Louro.
Coorientador: Adriana Madeira Alvares da Silva Conforti.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Neoplasias de Cabeça e Pescoço. 2. Radioterapia.
I. Louro, Lúri Drumond. II. Conforti, Adriana Madeira Alvares da Silva. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

QUÉZIA ANDERS

**ANÁLISE DO GENE MTHFR EM RELAÇÃO À RADIOSENSIBILIDADE
TUMORAL DE PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA
E PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 31 de outubro de 2014.

Prof. Dr. Iúri Drumond Louro
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

**Profa. Dra. Adriana Madeira Alvares da
Silva Conforti**
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-Orientador

Profa. Dra. Greiciane Gaburro Panetto
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Miguel Angelo Martins Moreira
Instituto Nacional do Câncer

Vitória
2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por toda capacidade intelectual que somente Ele me proporciona. A Ele toda glória por essa vitória tão esperada!

Aos meus pais, irmãos e familiares, por sempre acreditarem em meu potencial e valorizarem meu esforço em estudar. Por serem a minha base forte, meu refúgio e meu alento... a vocês dedico essa realização!

Ao meu orientador, Dr. Lúri, por sempre me motivar e incentivar a crescer, me fazendo ver além do que posso no meio acadêmico. Por ter acreditado em mim e aberto as portas do Núcleo de Genética Humana e Molecular quando mais precisei. Você é um exemplo pra mim, obrigada!

Aos queridos parceiros de trabalho: Marcelo, Elaine, Lidiane e Fernanda, por me ensinarem tudo da radiogenômica, contribuindo tanto para que eu chegasse até aqui.

À minha grande parceira de turma, de confissões, de correções, de aprendizado, de uma amizade tão bem-vinda, Raquel Reis. Amiga, obrigada por toda ajuda, todas experiências compartilhadas em sala de aula comigo, por ser uma profissional e menina exemplar!

Aos amigos distantes: Carina, Clarissa, Fran, Scheila, Yann e Ramon, por sempre terem uma palavra de motivação, um carinho, um jeito tão especial de dizer que se importam comigo, obrigada!

Às amigas de perto Dani, Camila, Carol, Mirian, Lorena, Alice e Cinthia, por sempre intercederem por mim em meus dias difíceis e por se alegrarem comigo na vitória.

A todos do NGHM, pela colaboração sempre harmoniosa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em especial, a secretária Kárita por toda atenção, simpatia e carinho, tornando nossas rotinas administrativas mais fáceis! Obrigada!

A CAPES, pelo apoio financeiro.

E a todos, mesmo sem citar nomes, que contribuíram para que eu chegasse até aqui, por apoiarem, por acreditarem e por estarem comigo na finalização deste sonho!

“Escute os sábios e procure entender o que eles ensinam. Sim, peça a sabedoria e grite pedindo entendimento. Procure essas coisas, como se procurasse prata ou um tesouro escondido. Se você fizer isso, saberá o que quer dizer temer o SENHOR, e aprenderá a conhecê-lo. é o SENHOR quem dá a sabedoria; a sabedoria e o entendimento vêm dele.”

Provérbios 2: 2-6

RESUMO

A enzima Metiltetrahidrofolato redutase (MTHFR), responsável pela liberação da forma ativa de folato no organismo, pode ter sua eficiência reduzida mediante a presença dos polimorfismos MTHFR C677T e A1298C. Considerando que o folato participa de vias metabólicas como a síntese de nucleotídeos e metilação de biomoléculas, o estudo desses polimorfismos torna-se relevante na associação de dados prognósticos em pacientes com carcinoma epidermoide oral, de orofaringe e de laringe tratados ou não com radioterapia. Objetivou-se estudar os polimorfismos C677T (rs1801133) e A1298C (rs1801131) do gene MTHFR como possíveis marcadores de radiosensibilidade tumoral em pacientes com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. A casuística foi composta por 306 pacientes avaliados segundo aos dados clinicopatológicos, recidiva local, óbito, sobrevida doença específica, de acordo com a modalidade terapêutica utilizada para cada um desses casos. Para análise dos polimorfismos utilizou-se a técnica PCR-RFLP. As curvas de sobrevidas foram avaliadas segundo o modelo Kaplan-Meier, e sua significância confirmada pelo valor de p de Wilcoxon, sendo a margem de erro estipulado menor que 5%. Dentre as características prognósticas, as associações de recidiva local, óbito e sobrevida livre de doença local não apresentaram resultados estatisticamente significativos para ambos polimorfismos em nenhum sítio anatômico analisado. Entretanto, os pacientes com carcinoma epidermoide de laringe tratados com radioterapia, apresentaram dados significantes quando associados ao polimorfismo MTHFR C677T. Esta associação demonstrou que a presença de pelo menos um alelo T, ou seja, a troca de um aminoácido alanina por uma valina na enzima MTHFR, diminui em até três vezes a chance de o paciente vir a óbito precocemente. Conclui-se assim, que o polimorfismo MTHFR C677T pode ser um importante biomarcador para avaliação prognóstica de pacientes com carcinoma epidermoide de laringe tratados com radioterapia.

Palavras-chave: Metiltetrahidrofolato redutase, câncer de cabeça e pescoço, radioterapia.

ABSTRACT

The enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), responsible for the biological release of folate's active form, may have reduced activity when polymorphic variants C677T and A1298C are present. Considering that folate participates in metabolic pathways that lead to nucleotide synthesis and methylation, these polymorphisms are relevant for the prognostic association with oral, oropharynx and larynx squamous cell carcinoma treated with radiotherapy or not. This study analysed polymorphisms C677T (rs1801133) and A1298C (rs1801131) as putative markers of tumor radiosensitivity. Our sample was made of 306 patients evaluated according to clinicopathological data, local disease relapse, death, disease specific survival, in relation to therapeutic option used in each case. Polymorphisms were detected by PCR-RFLP. Survival curves were analysed according to the Kaplan-Meier model and its significance confirmed by the p of Wilcoxon, being the error margin set to less than 5%. Associations between polymorphisms and local disease relapse, death and disease-free survival were not statistically significant. In contrast, MTHFR C677T patients with larynx SCC treated with radiotherapy showed that when at least T allele is present, there is a 3x decrease in the chance of early death. Therefore, this polymorphism may be an important biomarker for the prognostic evaluation of larynx SCC patients treated with radiotherapy.

Keywords: MTHFR, head and neck cancer, radiotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo do folato.....	25
Figura 2: : Gel de agarose 3% (A) e 4% (B) corado com Brometo de Etídio	40
Figura 3: Curva de sobrevida livre de doença específica referente a pacientes com CE de laringe irradiados para o polimorfismo MTHFR C677T.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil epidemiológico dos pacientes com CECP	35
Tabela 2: Sequência de primers e seus respectivos fragmentos obtidos através da PCR.	37
Tabela 3: Condições físicas da técnica de PCR.	37
Tabela 4: Condições químicas da técnica de PCR.	38
Tabela 5: Condições químicas e físicas da reação de RFLP.	39
Tabela 6: Perfil clinicopatológicas dos pacientes com CECP.	43
Tabela 7: Características do tratamento dos pacientes com CECP.	44
Tabela 8: Análise de prognóstico dos pacientes com CECP.	45
Tabela 9: Análise genotípica dos pacientes com CECP para os polimorfismos MTHFR C677T e A1298C.	47
Tabela 10: Análise de recidiva local dos pacientes com CE oral e de orofaringe.	48
Tabela 11: Análise de recidiva local dos pacientes com CE de laringe.	49
Tabela 12: Análise de óbito dos pacientes com CE de cavidade oral e orofaringe.	50
Tabela 13: Análise de óbito dos pacientes com CE de laringe.	50
Tabela 14: Análise multivariada de sobrevida livre de doença específica para pacientes com CE de laringe irradiados para o polimorfismo MTHFR C677T.	53

LISTA DE SIGLAS

A Adenina

Ala Alanina

B6 Vitamina B6

B2 Vitamina B2

B12 Vitamina B12

C Citosina

CE Carcinoma Epidermóide

CECP Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço

DHFR Dihidrofolato redutase

DHF Dihidrofolato

DNA Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

dUMP Monofosfato deoxiuridina

dTMP Monofosfato deoxitimidilato

EDTA Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do inglês, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

Glu Glutamina

GCPII Carboxipeptidase exopeptidase glutamato II

HAS S-adenosilhomocisteina Val Valina

HPV Papiloma Vírus Humano

IARC International Agency for Research on Cancer

IC Intervalo de confiança

INCA Instituto Nacional do Câncer

MTHFR Metiltetrahidrofolato Redutase

MTR Metionina sintetase

MTRR Redutase metionina sintase

NaCl Cloreto de sódio

OD Odds Ratio

PCR Reação de Polimerase em Cadeia (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

RFLP Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RNA Ácido Ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic Acid*)

SAM S-adenosilmetionina

SHMT1 Serina hidroximetil-transferase 1

SDS Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate*)

T Timina

TE Tris-EDTA

TNM Tumor-Nodo-Metástase (do inglês, Tumor-nodo-metastasis)

TS Timidilato sintase

THF Tetrahidrofolato

5,10-MTHF 5,10-Metiltetrahidrofolato

5-MTHF 5-Metiltetrahidrofolato

10-Formil THF 10-Formil tetrahidrofolato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Revisão Bibliográfica.....	18
1.1.1 Câncer	18
1.1.2 Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	20
1.1.3 Bioquímica do folato e sua relação com a síntese de nucleotídeos.....	24
1.1.4 Polimorfismos do gene MTHFR e sua associação com o câncer	27
2.OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos Específicos	31
3. metodologia	33
3.1 Considerações éticas	33
3.2 Casuística	33
3.3 Extração de DNA em sangue periférico	35
3.4 Regiões do gene MTHFR estudadas e Técnica de PCR-RFLP.....	36
3.5 Visualização e análise do produto.....	39
4. RESULTADOS	42
4.1 Análise descritiva.....	42
4.1.1 Análise clinicopatológica.....	42

4.1.2 Características do tratamento	43
4.1.3 Fatores de prognóstico	44
4.2 Análise Genotípica	46
4.3 Análise de prognóstico	47
5 DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	60
7 REFERÊNCIAS	62
8 ANEXO	69

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que acomete grande número de pessoas em todo o mundo. A carga global de casos novos de câncer em 2030 será de 21,4 milhões, gerando 13,2 milhões de morte por tumores malignos. Isto em decorrência do envelhecimento da população, bem como redução da mortalidade infantil e das mortes causadas por doenças infecciosas nos países em desenvolvimento (INCA, 2014).

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) corresponde a 20% dos tumores epiteliais malignos que acometem caucasianos (VASCONCELOS et al, 2014). Este tipo de câncer possui subgrupos que correspondem a tumores nos sítios anatômicos da cavidade oral, orofaringe, laringe, seios maxilares, cavidade nasal, tumores das glândulas salivares e tireóide (MASSANO et al, 2006).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de CECP são o consumo de tabaco, álcool, infecções por HPV e fatores genéticos. Esse tipo de câncer é mais comum em homens com mais de 50 anos de idade (LLEWELLYN et al, 2001; DOBROSSY et al, 2005).

Há evidências de que uma dieta rica em vegetais e frutas possa diminuir o risco de CECP. Entretanto, as deficiências de micronutrientes como o folato, parecem estar associados ao aumento do risco para esse tipo de câncer (NASKI et al, 2014; VANNUCHI, 2010; BALUZ et al, 2002).

O tratamento do câncer é multimodal, envolvendo cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Nos últimos anos, esforços foram feitos de modo a otimizar os resultados da radioterapia, pois estudos evidenciaram que um aumento da dose mais direcionada ao tumor, pode gerar menos danos aos tecidos adjacentes normais (BELCHER et al, 2014).

Com o aumento das pesquisas sobre os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do câncer, há o aprimoramento dos conhecimentos das vias metabólicas celulares que possam intervir na resposta ao tratamento radioterápico, favorecendo a identificação de marcadores moleculares envolvidos no CECP

O ácido fólico é um nutriente essencial para a síntese de nucleotídeos, sendo fundamental no metabolismo celular (FANIDI et al, 2014). A deficiência na biodisponibilidade de folato

está relacionada a enzima Metiltetrahidrofolato Redutase (MTHFR) cuja expressão pode ser comprometida na presença dos polimorfismos C677T e A1298C (NASKI et al, 2014; VANNUCHI, 2010; GALBIATI et al, 2012; BALUZ et al, 2002).

Os polimorfismos do gene MTHFR C677T e A1298C, localizados no cromossomo 1p36.3 e relacionados ao metabolismo do folato, foram escolhidos para serem avaliados quanto sua associação à radiosensibilidade tumoral, bem como a possível eleição desses marcadores moleculares como avaliadores prognósticos em relação ao tratamento radioterápico.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 Câncer

O câncer é o nome utilizado para identificar mais de cem tipos diferentes de doenças com características semelhantes como: crescimento desordenado e capacidade de invasão em tecidos adjacentes. Essa desordem celular tem origem multifatorial e os fatores causais podem agir em sequência ou conjuntamente para promover a carcinogênese (INCA, 2014).

Em geral, as características iniciais da carcinogênese correspondem ao núcleo de células basais aumentado, alterações na cromatina, com regiões pouco condensadas e outras muito condensadas, além de células com distúrbios de tamanho, apresentando diferenças citológicas em relação às demais células do tecido original. Essas alterações, também chamadas de displasias, são as primeiras alterações celulares visíveis com potencial ou não para se tornarem células malignas (GIGLIOTTI et al, 2008).

O processo de surgimento do câncer ou a sequência clonal de células malignas ocorre lentamente no organismo. Para que tal processo ocorra e prossiga são necessárias transformações menos visíveis, a nível molecular como mutações em genes reguladores e controladores do ciclo celular, silenciamento na expressão de proteínas que conduzem a apoptose e ativação exagerada de genes que conduzem a célula ao crescimento (ALBERTS et al, 2010). Todas essas alterações possibilitam o crescimento desordenado de células anormais em detrimento de células normais.

Essas mudanças celulares raramente ocorrem sem um fator iniciante ou fatores estimulantes. Tais fatores, também ditos como carcinógenos, podem ser químicos, físicos ou biológicos a depender da sua origem e a forma de interação com o organismo. São exemplos de carcinógenos o álcool, tabaco, vírus, radiações ultravioleta (BRASILEIRO FILHO, 2009).

A fase de progressão, geralmente posterior à fase dita como displásica, é na qual ocorre o crescimento e proliferação de forma desordenada, apresentando os primeiros sinais e sintomas detectáveis. Também é nessa fase de progressão que as metástases são geradas onde células malignas se desprendem do tecido, invadem a corrente sanguínea ou os vasos linfáticos e formam novas colônias células cancerosas que são chamados de tumores secundários (ALMEIDA, 2005).

O microambiente tumoral corresponde ao conjunto de alterações fenotípicas, fisiológicas e metabólicas que delimitam a região do tumor. Essa microrregião apresentam metabolismo acelerado com baixa concentração de glicose, elevada concentração de lactato, baixo pH, pouco oxigênio disponível, gerando hipóxia tumoral (TADDEI et al, 2013).

A ocorrência de câncer no mundo é variável, apesar das semelhanças nas alterações genéticas que levam ao seu surgimento. Fatores como hereditariedade e o ambiente (cultura, hábitos de vida, situação socioeconômica, etc) são os principais responsáveis pelo surgimento de tumores. Entretanto, as diferentes frequências alélicas possivelmente responsáveis pelos diferentes tipos de câncer, variam de acordo com a população, o que faz mudar o cenário de susceptibilidade ou disposição particular do organismo, em gerar neoplasias (WEINBERG, 2008).

De acordo com estimativas mundiais, em 2030, a carga global de câncer será de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes causadas por neoplasias. Isto como reflexo do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (IARC, 2008).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2014-2015, aponta que, desconsiderando os casos de câncer de pele não melanoma, estimam-se 395 mil casos novos de câncer, 204 mil para o sexo masculino e 190 mil para sexo feminino. Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral. Já nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide serão os mais frequentes (INCA, 2014).

O tratamento do câncer é feito de forma multimodal, incluindo cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Para a melhor decisão na escolha do tratamento, são considerados as características clínicas do tumor, o estadiamento, o tempo de descoberta da doença,

localização e outros dados clínicos do paciente. O desenvolvimento da ciência e tecnologia para diagnóstico, bem como para o tratamento do câncer tem apresentado destaques, entre eles, o uso de marcadores moleculares, permitindo um diagnóstico preciso e tratamento personalizado, considerando as características particulares de cada paciente (CHAWAPUN, 2006).

1.1.2 Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

"O câncer de cabeça e pescoço" é um termo coletivo definido com base na anátomo-topografia para descrever os tumores malignos do trato aerodigestivo superior. Esta região anatômica inclui a cavidade oral, faringe, laringe, seios maxilares, cavidade nasal, tumores das glândulas salivares e tireóide. Um dos principais subgrupos do câncer de cabeça e pescoço é conhecido como câncer oral ou da cavidade oral, que surgem nas membranas mucosas da boca, ou seja, lábio, a base da língua, língua, gengiva, assoalho da boca e palato. O outro subgrupo compreende o câncer de faringe, que incluem a orofaringe, hipofaringe e nasofaringe. Outros tumores que ocorrem nessa área como os do cérebro, tireóide e melanoma, convencionalmente, não estão incluídos no termo "câncer de cabeça e pescoço", portanto, são tratados separadamente (DOBROSSY, 2005)

O termo "cabeça e pescoço" é relatado na literatura como um termo de junção dos carcinomas de células escamosas ou carcinoma epidermóide dessa região anatômica, que são responsáveis por 90% de todos os cânceres da região. Isto porque eles compartilham fatores de risco comuns, e há semelhanças em sua epidemiologia, tratamento e prognóstico. (ALVARENGA et al, 2008; MASSANO et al, 2006; MEHROTRA E YADAV, 2006; DOBROSSY, 2005).

Cerca de 40% dos cânceres de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade oral, 15% na faringe, 25% na laringe. Carcinomas de células escamosas ou epidermóide ou espinocelular abrange pelo menos 90% de todas as neoplasias malignas orais (COLOMBO et al, 2009; MASSANO et al, 2006).

Os dois principais fatores de risco relacionados ao câncer de cabeça e pescoço são o hábito de fumar e o consumo excessivo de bebidas alcoólicas. O aumento na incidência de carcinoma epidermóide da boca, faringe e laringe, têm sido associado ao consumo de álcool desde a metade da década de 50, e estudos epidemiológicos desses tumores têm mostrado um efeito neoplásico a partir da ingestão abusiva de álcool e uma correlação linear com a duração e a quantidade do consumo (GIGLIOTTI ET AL, 2008).

Atualmente, mais de um bilhão de pessoas são fumantes no mundo e no ano de 2030 estima-se que esse total poderá chegar a dois bilhões. A maioria destes fumantes estará nos países em desenvolvimento, especialmente entre os jovens, pois são alvos da publicidade para o consumo do tabaco, bem como o de bebidas alcoólicas (FILHO et al, 2010).

A idade dos acometidos com o câncer de cabeça e pescoço é superior aos 40 anos, em especial homens, porém há um aumento de jovens que adquirem a doença, bem como mulheres, em especial devido a grande exposição aos fatores de risco. A promoção de políticas de prevenção do tabagismo e uso abusivo de álcool são as opções para a reversão desse quadro crescente da doença, porém é uma medida a longo prazo e, por isso, não muito promissora (LLEWELLYN et al, 2001) . Tal observação faz-se relevante pois são esses "novos" iniciantes no uso do álcool e do tabaco são os que poderão desenvolver neoplasias no futuro.

O consumo de tabaco e álcool, separadamente, aumentam de 2 a 3 vezes o risco de câncer na cavidade oral e faringe. Quando esses dois elementos estão associados, o risco aumenta em 15 vezes tanto em homens quanto em mulheres (MEHROTRA E YADAV, 2006; DOBROSSY, 2005).

O fumo e o consumo de álcool são, geralmente, fatores coexistentes tornando difícil avaliar seus efeitos individualmente. Sugere-se que o sinergismo ocorra porque o álcool aumenta a penetração de carcinógenos do tabaco na mucosa oral, agindo através de uma maior solubilização destes, ou por aumento da permeabilidade da mucosa. Carcinógenos derivados do tabaco (nitrosonornicotina ou NNN) atravessam o interior da célula, exercendo injúrias diretamente no DNA. Em associação, o etanol altera o metabolismo hepático, podendo induzir determinados sistemas enzimáticos capazes de ativar prócarcinógenos liberados pelo tabaco (CARRARD et al, 2008).

Um outro fator de risco que tem sido relevante nos casos de câncer de cabeça e pescoço é

a infecção pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV). O DNA do HPV foi detectado em amostras de biópsia de 766 tipos de câncer da cavidade oral e 18,3 % de 142 tipos de câncer da orofaringe. O HPV 16 é a subespecie mais comum encontrada nos casos de câncer de cavidade oral e orofaringe, correspondendo a 94,7% das amostras histológicas confirmadas. A particularidade desse agente etiológico é que a presença do vírus tem sido associada a um melhor prognóstico da doença (SINHA et al., 2013; PETERS et al., 2013; NELKE et al., 2013).

De acordo com a estimativa do INCA (2014), o Brasil no ano de 2014, terá 11.280 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres. O câncer de cavidade oral tem maior incidência na região sudeste, quando comparada com outras regiões do país, sendo São Paulo o estado de maior prevalência desse tipo de câncer. Estes dados estão associados diretamente a população fumante nesse local, uma vez que São Paulo é, também, o estado de maior número de fumantes (INCA, 2014; FILHO et al, 2010).

Os fatores relacionados aos dados prognósticos dos pacientes com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, entre outros, são a idade, hábito etilista, tabagismo, sítio anatômico acometido e terapia utilizada.

O tempo de sobrevida dos pacientes é, em média, 5 anos para estágios iniciais da doença (estágios I e II) e 30% dos indivíduos em estágio avançado sobrevivem (MEHROTRA E YADAV, 2006).

O tratamento do câncer varia de acordo com o estágio em que ele se apresenta, no qual tumores diagnosticados em estágio iniciais são tratados com cirurgia ou radioterapia, e tumores em estágios avançados necessitam de tratamento multimodal. Cerca de 2/3 dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço são descobertos já em estágio avançado com linfonodos regionais acometidos. A metástase à distância acomete aproximadamente 10% dos pacientes, o que diminui muito a sobrevida destes (GALBIATTI et al., 2012).

Nos casos de tumores avançados o tratamento unimodal não apresenta boa eficiência, podendo ocorrer recidivas e necessidade de tratamentos multimodais (LI et al., 2013). Entretanto, esse tratamento multimodal envolvendo radioterapia e quimioterapia, costumam ocasionar grande toxicidade aos pacientes (LEE et al., 2011).

As deficiências de micronutrientes parecem estar associados ao aumento do risco para o câncer de cabeça e pescoço. Ao mesmo tempo, há evidências de que uma dieta rica em

vegetais (especialmente ricos em carotenos) e frutas, provavelmente, diminui o risco. Isto porque componentes presentes em alguns vegetais e frutas agem como fatores de transcrição, agindo diretamente no DNA, favorecendo a expressão de enzimas antioxidantes (GIGLIOTTI ET AL, 2008; DOBROSSY, 2005).

A deficiência de folato devido à destruição pelo acetaldeído (metabólito do etanol) é freqüente em alcoolistas e contribui para uma inibição da transmetilação, que é um importante fator na regulação de genes envolvidos na carcinogênese. Além disso, sabe-se que o folato participa da síntese de purinas, especialmente do timidilato, e a deficiência desse componente prejudica a biosíntese de nucleotídeos que compõem o DNA e o RNA (VANNUCCHI, 2010).

Estudos que verificam a expressão alterada de enzimas através dos polimorfismos presentes em seus genes codificantes são relatados como possíveis marcadores moleculares para adequação do tratamento nos casos de câncer de cabeça e pescoço.

A utilização da radioterapia é importante pois auxilia na regressão tumoral e aumenta a taxa de sobrevida livre de doença quando comparado apenas a cirurgia. Os efeitos desse tratamento incluem: dor no corpo, xerostomia, dificuldade na fala, saliva pegajosa, depressão e, principalmente, dificuldade para comer, (MOORE et al., 2013). Devido a esses desconfortos aos pacientes, estudar formas de avaliar a eficiência desse tratamento através da análise de polimorfismos, pode ser relevante.

O diagnóstico preciso e precoce do câncer são os principais desafios da ciência nos dias atuais. Por isso, a busca por marcadores moleculares que possam fornecer dados prognósticos, além de promover um acompanhamento do tratamento, é algo promissor e muito estudado.

Segundo Belcher et al. (2014) as terapias moleculares estão sendo associadas ao tratamento dos pacientes com CECP, gerando expectativas promissoras de que os componentes genéticos específicos do tumor de cada paciente, possam ser alvo de tratamentos personalizados.

1.1.3 Bioquímica do folato e sua relação com a síntese de nucleotídeos

Os folatos compõem a família de vitaminas do grupo B que tem papel vital na síntese de ácidos nucleicos e na regeneração de metionina. A partir da metionina, ocorre a formação de S-adenosilmetionina (SAM), que serve como doadora de grupamentos metil em várias reações de metilação como no DNA, RNA e de proteínas (NASKI et al, 2014).

A metilação do DNA é um processo determinante na expressão de genes que sofrem influência epigenética, na estabilidade do DNA, integridade da dupla fita e mutagênese. O folato também desempenha um papel essencial na síntese de novo de purinas e de timidilato, o que é necessário na replicação e reparação do DNA (KIM, 2000). Assim, a distribuição desviante de grupos metil devido ao metabolismo anormal do folato, afeta tanto processos de metilação de DNA quanto desempenham um papel essencial no desenvolvimento de cânceres. Folato anormal também foi implicado no desenvolvimento de doenças como: doenças cardiovasculares, defeitos do tubo neural, lábio leporino e fenda palatina (VANNUCHI E MELO, 2009).

A principal fonte de ácido fólico em mamíferos é a dieta (verduras, legumes, laranja e fígado). Folatos dietéticos existem principalmente na forma de glutamato polinsaturados e não são capazes de atravessar a membrana celular quando a cauda do glutamato é maior do que três resíduos. Portanto, no intestino delgado de humanos onde o folato é absorvido, ocorre a hidrólise desse composto em monoglutamatos, este processo é catalisado por uma carboxipeptidase exopeptidase glutamato II (GCPII) que está ancorada na borda da membrana apical intestinal. Após a hidrólise, o folato (monoglutamato) é transportado para dentro das células por dois mecanismos principais: canais iônicos com afinidade por folatos reduzidos e endocitose através de receptores de folato (NASKI et al, 2014).

O folato regula processos metabólicos através de um caminho complexo que envolve pelo menos 30 enzimas diferentes (SUZUKI et al, 2007), uma versão simplificada dessas vias metabólicas pode ser acompanhada na figura 1.

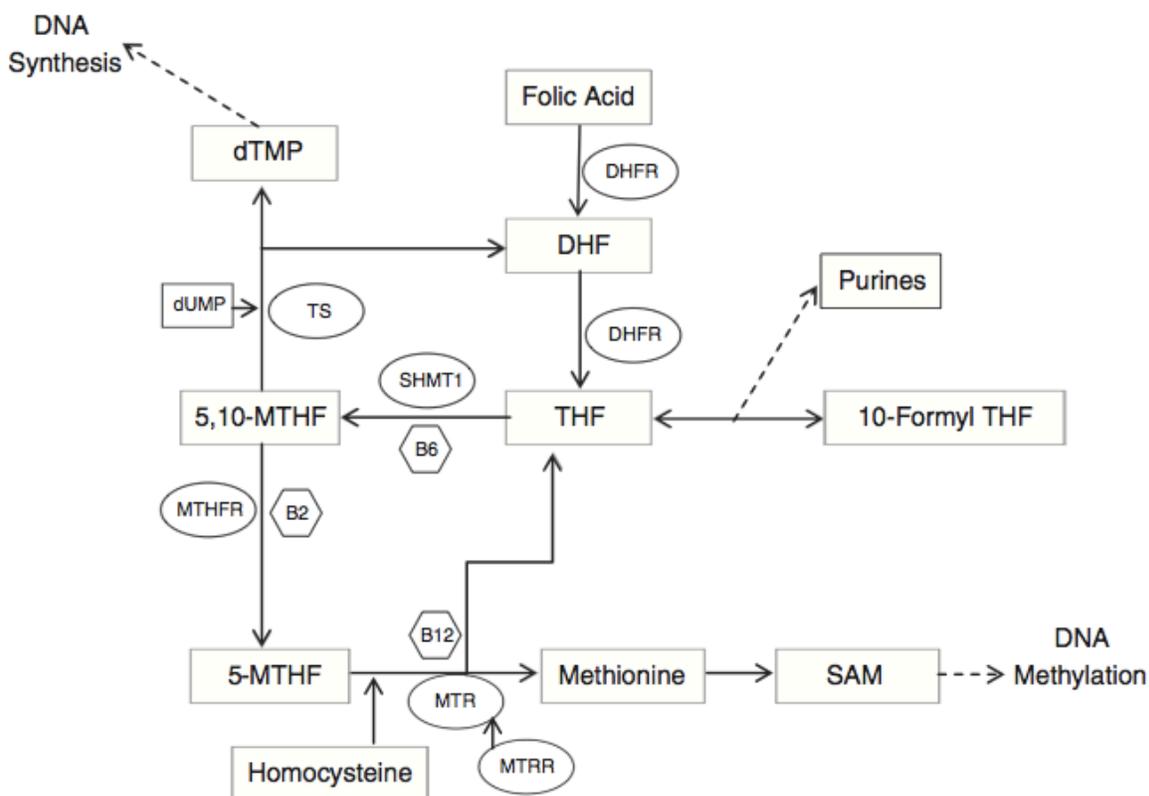


Figura 1: Metabolismo do folato - DHFR, dihidrofolato redutase; SHMT1, serina hidroximetil-transferase 1; B6, vitamina B6; MTHFR, metiltetrahidrofolato redutase; B2, vitamina B2; TS, timidilato sintase; MTR, metionina sintetase; B12, vitamina B12; MTRR, redutase metionina sintetase; DHF, dihidrofolato; THF, tetrahidrofolato; 5,10-MTHF, 5,10-metiltetrahidrofolato; 5-MTHF, 5-metiltetrahidrofolato; dUMP, monofosfato deoxiuridina; dTMP, monofosfato deoxitimidilato; 10-Formil THF, 10-formil tetrahidrofolato; SAM, S-adenosilmetionina. Fonte: NASKI et al, 2014.

A enzima dihidrofolato redutase catalisa a redução de ácido fólico ou de dihidrofolato dietético para tetrahidrofolato, a forma predominante de folato no plasma. Os compostos de folato são reduzidos, de modo a participar como coenzimas, desempenhando um papel importante em muitos processos metabólicos (Figura 1) (FANIDI et al, 2014; GALBIATTI et al, 2012; SUZUKI et al, 2007; BLOUNT et al, 1997).

A enzima MTHFR realiza uma ação central do metabolismo do folato, uma vez que catalisa irreversivelmente a conversão de 5,10-metileno a 5-metiltetraidrofolato, a forma primária de folato circulante. O substrato desta reação (5,10-MTHF) é vital para a síntese de DNA, enquanto o 5-MTHF é fornecedor de radicais metil para regeneração de homocisteína em

metionina, que metabolizada gera SAM, fundamental nas reações de metilação celulares (KAI LI, et al, 2014; KEUM et al, 2014; KAWAKITA et al, 2012).

Durante a síntese de nucleotídeos, o 5-metil-THF participa das reações de doação de um carbono favorecendo a formação de purinas. O 5,10-metil-THF também desempenha papel fundamental na metilação do desoxiuridilato monofosfato (dUMP) para deoxitimidilato monofosfato (dTMP). Esta reação é a única fonte de novo de timidina e o passo limitante de velocidade na síntese do DNA de mamíferos (SUZUKI et al, 2007; BLOUNT et al, 1997; CHEN et al, 1999).

O 5-metil-THF doa grupos metil para a remetilação de homocisteína em metionina. Metionina, por sua vez atua como um substrato para a S-adenosilmetionina (SAM), um grupo dador de metil para reações de metilação, incluindo o metilação de DNA, RNA, neurotransmissores, lípidos e proteínas, como as histonas. Após doar seu grupo metil, SAM é convertida em S-adenosilhomocisteína (HAS), um inibidor competitivo de várias metiltransferases. Se SAM é um potente inibidor da enzima MTHFR, quando SAM está presente em elevada concentração, MTHFR é inibida, o que diminui a síntese de 5-metil-THF, e, portanto, a remetilação de homocisteína. Este processo também prejudica a síntese de nucleotídeos, bem como o processo normal de metilação (VANNUCHI, 2010).

Essas reações bioquímicas complexas do folato envolvendo transferência de um carbono a partir de aminoácidos tais como serina, glicina e metionina são essenciais para a síntese de nucleotídeos sendo, por isso, alvo do nosso estudo.

Sendo assim, a deficiência de folato pode resultar em ineficiência na síntese de DNA, principalmente em células com replicação aumentada. Além disso, a baixa biodisponibilidade de folatos favorece a incorporação errada de uracil no DNA, favorecendo, possivelmente, quebra da dupla fita e instabilidade cromossômica em células tumorais (FANIDI et al, 2014; NASKI et al, 2014; KEUM et al, 2014).

1.1.4 Polimorfismos do gene *MTHFR* e sua associação com o câncer

A enzima metiltetrahidrofolato redutase é codificada pelo gene *MTHFR* que está localizado no cromossomo 1p36.3 (NASKI et al, 2014). Vários polimorfismos no gene *MTHFR* foram relatados, entretanto polimorfismos mais estudados são:

1) C677T: C → T no nucleotídeo 677, resultando numa conversão de alanina para valina na sequência de códons 222 da proteína (CHEN et al, 1999).

2) 1298C: A → C no nucleotídeo 1298, levando a substituição de uma alanina para glutamina na sequência 430 de códons da proteína (BOCCIA et al, 2009).

No polimorfismo *MTHFR* C677T verificou-se que heterozigotos variantes (CT) têm 65% da atividade da enzima ao passo que os homozigotos mutantes (TT) têm 30% da atividade enzimática. Foi relatado que indivíduos com genótipo TT, possuem níveis plasmáticos de folato e vitamina B12 reduzidos, contudo tem altos níveis de homocisteína (BALUZ et al, 2002).

Da mesma forma que o polimorfismo *MTHFR* C677T, o A1298C tem sido relatado como capaz de reduzir a atividade da enzima em 30-40% em homozigotos mutantes (CC), quando comparados aos homozigotos normais (AA) (GALBIATTI et al, 2012; SAILASREE et al, 2011).

Alterações no metabolismo do folato, afetam a biossíntese de DNA e sua metilação, processos cruciais na carcinogênese. O primeiro mecanismo pode alterar a integridade da replicação do DNA por falta de precursores (nucleotídeos), contribuindo para instabilidade e comprometendo mecanismos de reparo. O segundo mecanismo que contribui para o desenvolvimento do câncer é a metilação anormal (VANNUCHI, 2010).

A metilação dos resíduos de citosina de pares dinucleotídicos citosina-guanina (CpG) é um fator epigenético determinante na expressão de vários genes e tem um papel fundamental na manutenção da estabilidade do DNA. Hipermetilação de regiões promotoras de genes supressores tumorais resulta em perda da função do gene, enquanto que a hipometilação global de genes, resulta em instabilidade cromossômica e um aumento de eventos mutacionais. Deficiência de ácido fólico na dieta a longo prazo em humanos, resulta em

hipometilação do DNA global, que é reversível com a reposição dos níveis de folato (VANNUCHI e MELO, 2009).

Outro mecanismo pelo qual a deficiência de folato pode perturbar a integridade do DNA e promover a carcinogênese é a redução da síntese de timidilato levando a incorporação errada de uracila no DNA. A remoção da uracila incorporada ao DNA pode gerar quebra da cadeia única, aumentando o risco de câncer. Essas quebras no DNA devido a presença de uracila, ocorrem em indivíduos com deficiência de folato, sendo possível a reversão desse quadro quando a biodisponibilidade do folato é restaurada (BLOUNT et al, 1997).

Vários estudos avaliaram a associação do polimorfismo MTHFR C667T com câncer de cabeça e pescoço (KRUSZYNA et al, 2010;. KURESHI et al, 2004;. NEUMANN et al, 2005; RELJIC et al, 2007; SOLOMON et al, 2008; SUZUKI et al, 2007; VAIRAKTARIS et al, 2006; WEINSTEIN et al, 2002). Destes, apenas três estudos confirmaram uma associação do polimorfismo MTHFR C677T com um risco de câncer de cabeça e pescoço (RELJIC et al, 2007; SOLOMON et al, 2008; VAIRAKTARIS et al, 2006).

Vairaktaris et al. (2006) estudaram 110 pacientes com câncer de boca e 102 indivíduos sem câncer entre os alemães e os gregos e descobriram que o genótipo 677CT foi associado com um risco aumentado de câncer. Em contraponto, Reljic et al. (2007) conduziram um estudo com 81 pacientes com câncer de cabeça e pescoço e 102 indivíduos de caso-controle sem histórico de câncer entre a população croata e descobriram que o genótipo 677TT diminui o risco de doença. Por outro lado, Solomon et al. (2008) avaliaram 126 indivíduos que eram etilistas (33 consumidores crônicos e significativas de álcool, 56 consumidores moderados de álcool e 37 bebedores sociais) e que tiveram câncer de boca e descobriram que o genótipo 677TT foi associado ao grupo de consumidores crônicos e moderados de álcool.

Variante A1289C também tem sido associada com o risco de câncer de cabeça e pescoço, no entanto os dados sobre o risco de câncer de cabeça e pescoço em relação ao polimorfismo MTHFR A1298C são contraditórios (NASKI et al, 2014; SUZUKI et al, 2007). Estudos de Suzuki et al. (2007) e Kruszyna et al. (2010) não encontraram nenhuma associação entre esse polimorfismo e o risco de carcinoma de cabeça e pescoço.

O fato de que o metabolismo do folato pode afetar tanto a síntese de DNA quanto a metilação, faz com que genes variantes ambientais sejam candidatos atraentes no estudo de

susceptibilidade ao câncer (KEUM et al, 2014). Estes incluem a ingestão dietética de ácido fólico e polimorfismos funcionais nos genes que codificam enzimas do metabolismo do folato, como a MTHFR, alvo do nosso estudo.

Com base nesses dados, propõe-se que a análise de polimorfismos gene *MTHFR* (C677T e A1298C) possam auxiliar no acompanhamento dos pacientes tratados com radioterapia, sendo possíveis marcadores de prognóstico para pacientes com câncer epidermóide de cabeça e pescoço.

Objetivos

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar os polimorfismos C677T (rs1801133) e A1298C (rs1801131) do gene MTHFR como possíveis marcadores de radiosensibilidade tumoral em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, tratados ou não com radioterapia.

2.2 Objetivos Específicos

- Associar os genótipos obtidos com o prognóstico dos pacientes que apresentam carcinoma oral, de orofaringe e de laringe, analisando dados clinicopatológicos, recidiva local, óbito, sobrevida doença específica, de acordo com a modalidade terapêutica utilizada para cada um desses casos;
- Relacionar os genótipos dos pacientes avaliados com a radiosensibilidade tumoral nas neoplasias de cavidade oral, orofaringe e laringe.

Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1 Considerações éticas

O material utilizado para a realização do estudo foi coletado após entrevista e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O DNA extraído das amostras de sangue coletadas estão sob responsabilidade do Dr. Marcos Brasilino de Carvalho - Coordenador de Grupo no Projeto Genoma do Hospital Heliópolis/SP – e da Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva - Coordenadora do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço. Todos os dados clínicos obtidos e as informações contidas nos prontuários são mantidos em sigilo, garantindo assim a confidencialidade das informações. O Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço (projeto mestre, do qual esta dissertação faz parte) foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sob protocolo de número 135, conforme anexo 1.

3.2 Casuística

Para análise dos polimorfismos selecionados, foram avaliados 306 pacientes com câncer epidermóide de cabeça e pescoço tratados no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis entre o período de 2001 a 2011. Todos os pacientes estudados foram submetidos à cirurgia.

A inclusão dos pacientes no estudo restringiu-se aos carcinomas epidermóides de cavidade oral, orofaringe e laringe. Todos os casos possuem confirmação histológica do diagnóstico oncológico e não foram previamente submetidos a qualquer forma de tratamento para a

doença em questão. Os casos com diagnóstico de metástase à distância foram excluídos deste estudo.

Após o tratamento inicial e tendo seguimento de pelo menos 24 meses, o acompanhamento dos pacientes foi feito por uma equipe multidisciplinar de acordo com a rotina estabelecida no serviço do hospital. Os registros incluem informações epidemiológicas abrangentes quanto aos fatores de risco relacionados à doença.

Os critérios utilizados para o diagnóstico da doença primária incluem a suspeita clínica através de anamnese e exame físico, e posterior confirmação com exame histopatológico do produto de biópsia.

A suspeita clínica para metástase cervical (N+) inclui exame físico e radiológico confirmados pela análise histológica do esvaziamento cervical. Em alguns casos foi utilizada a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) para coleta de material e análise citológica.

O perfil dos 306 casos estudados é composto por 40 mulheres (13,1%) e 266 homens (86,9%). A faixa etária apresentada foi: 7 pacientes com menos de 40 anos (2,3%), 69 pacientes com idade entre 41 e 50 anos (22,5%), 121 pacientes com idade entre 51 e 60 anos (39,5%), 80 pacientes com idade entre 61 e 70 anos (26,1%) e 29 pacientes com idade superior a 70 anos (9,5%).

Quanto ao tabagismo, foram considerados não tabagistas os indivíduos que pararam de fumar a mais de um ano ou que nunca fumaram, essa característica foi encontrada em 87 pacientes (28,4%). Os indivíduos considerados fumantes corresponderam a 219 pacientes (71,6%). O hábito etilista foi constatado em 149 pacientes (49,7%) e 157 pacientes (51,3%) foram considerados não etilistas (Tabela 1).

No decorrer das análises, os carcinomas de cavidade oral e orofaringe foram associados em um único grupo devido a apresentarem características semelhantes de histopatologia e tratamento desenvolvido. Dessa forma, estudou-se 206 amostras de cavidade oral e orofaringe e 100 amostras de laringe, dados apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Perfil epidemiológico dos pacientes com CECP

Características epidemiológicas	Total		Sítio			
			Oral, orofaringe		Laringe	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
Gênero						
Feminino	40	13,1	31	15,0	9	9,0
Masculino	266	86,9	175	85,0	91	91,0
Faixa etária, anos						
≤ 40	7	2,3	6	2,9	1	1,0
41 - 50	69	22,5	46	22,3	23	23,0
51 - 60	121	39,5	83	40,3	38	38,0
61 - 70	80	26,1	51	24,8	29	29,0
> 70	29	9,5	20	9,7	9	9,0
Tabagismo						
Não	87	28,4	58	28,2	29	29,0
Sim	219	71,6	148	71,8	71	71,0
Etilismo						
Não	157	51,3	103	50,0	54	54,0
Sim	149	48,7	103	50,0	46	46,0
Total	306	100,0	206	67,3	100	32,7

3.3 Extração de DNA em sangue periférico

Para a extração do DNA de sangue periférico foi utilizada a metodologia de extração por sal, na qual o sangue coletado foi misturado a 25 MI da Solução Tampão 1, composta por 1550mM Cloreto de Amônio (82,91g), 100 mM Carbonato ácido de Potássio (10,01g), 10mM EDTA, pH: 7,4 (50 MI de EDTA 0,2 M. pH: 7,4) e quantidade suficiente para 1000ml de água Milli-Q.

Em seguida, o material foi homogeneizado por inversão e mantido no gelo por 30 minutos. Após esse período, foi centrifugado por 15 minutos a 1800 rpm a 4°C e o sobrenadante descartado. Ao pellet formado, foi adicionado 5 MI da Solução Tampão 1 e centrifugado por 5 minutos a 1800 rpm a 4°C.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido através de agitação em 3 ml da Solução Tampão 2, composta por 100 mM Tris-HCl, pH: 8,0 (10 MI Tris 1M, pH: 8,0), 400 mM NaCl (23,38 g), EDTA (10 MI EDTA 0,2 M; pH: 8,2) e quantidade suficiente para 1000 MI de Água Milli-Q. Em seguida, adicionou-se junto à solução, 10 μ L de proteinase-K e posteriormente 300 μ L de SDS 10%. Em seguida, a solução foi incubada a 37°C por 16 horas.

Após o período de repouso, foi adicionado 1 MI de NaCl saturado (6 M) e homogeneizado vigorosamente por 15 segundos (vórtex), e centrifugado em seguida por 20 minutos a 3000 rpm. Após esse período, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde o DNA foi precipitado e adicionado 2 volumes de etanol absoluto em temperatura ambiente. O DNA precipitado foi lavado e passado no etanol 70% em temperatura ambiente.

Posteriormente, o DNA foi dissolvido em um tubo contendo 800 μ L de TE – composto por 10 mM Tris (1 MI Tris 1 M, pH: 7,5), 1 mM EDTA (0,5 MI EDTA 0,2 M; pH: 7,4) e quantidade suficiente para 1000 MI de água Milli-Q – e incubado a 65°C por 30 minutos e posteriormente armazenado em congelador -20°C.

3.4 Regiões do gene MTHFR estudadas e Técnica de PCR-RFLP

Os polimorfismos do gene MTHFR C677T (rs1801133) e A1298C (rs1801131), localizados no cromossomo 1p36.3, foram escolhidos devido estarem relacionados ao metabolismo do folato. Para a amplificação das regiões de interesse foi realizada a técnica de PCR- RFLP, no termociclador Veriti® Thermal Cycler da Applied Biosystems. A reação de RFLP revela polimorfismos devido à presença ou ausência de sítios de restrição, que são identificados com a utilização de enzimas de restrição.

A tabela 2 descreve a sequência dos primers utilizados na reação de PCR e os fragmentos gerados após a reação de PCR.

Após a padronização da reação de PCR, foram alcançadas as condições físicas e químicas ideais para a realização do experimento. Os detalhes deste estão representados nas tabelas

3 e 4, respectivamente.

Tabela 2: Sequência de primers e seus respectivos fragmentos obtidos através da PCR.

Polimorfismo	Sequência dos Primers	Fragmento obtido
<i>MTHFR</i> 677C>T (Ala222Val)	5' AGGACGGTGCGGTGAGAGTG3' 5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA3'	198pb
<i>MTHFR</i> 1298A>C (Glu430Ala)	5'CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC3' 5'ACTTTGTGACCATTCCGGTTTG3'	163pb

Tabela 3: Condições físicas da técnica de PCR.

Condições físicas	<i>MTHFR</i> 677C>T	<i>MTHFR</i> 1298A>C
Ciclos	40	40
Desnaturação	94°C; 60seg	94°C; 30seg
Anelamento	60°C	60°C
Extensão	72°C; 60seg	72°C; 30seg

Tabela 4: Condições químicas da técnica de PCR.

Condições químicas	Volume
<i>Taq Platinum</i> DNA Polimerase	0,2µl
25 mM de primer F/R	0,6 µl
10 mM de dNTP	0,3 µl
50 mM de MgCl ₂	0,45 µl
10X buffer	1X
H ₂ O ultrapura	10,35 µl
Produto de PCR	1 µl
Volume final	15µl

As reações de digestão (RFLP) foram padronizadas conforme indicação do protocolo do fabricante. As condições químicas e físicas ideais estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5: Condições químicas e físicas da reação de RFLP.

Condições químicas	MTHFR 677C>T	MTHFR 1298A>C
Enzima	<i>HinfI</i> 0,17 µl (1U/L)	<i>MbolI</i> 0,16 µl (1U/L)
Buffer	1µl	0,84µl
Produto	5µl	5µl
H ₂ O ultrapura	3,83µl	3µl
Condições físicas		
Temperatura	37°C	37°C
Tempo	1h e 20min	16h

3.5 Visualização e análise do produto

Os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose 3%, por 35 minutos a 150 volts e corados com Brometo de Etídio. O resultado obtido em cada uma das regiões está apresentado na figura 2.

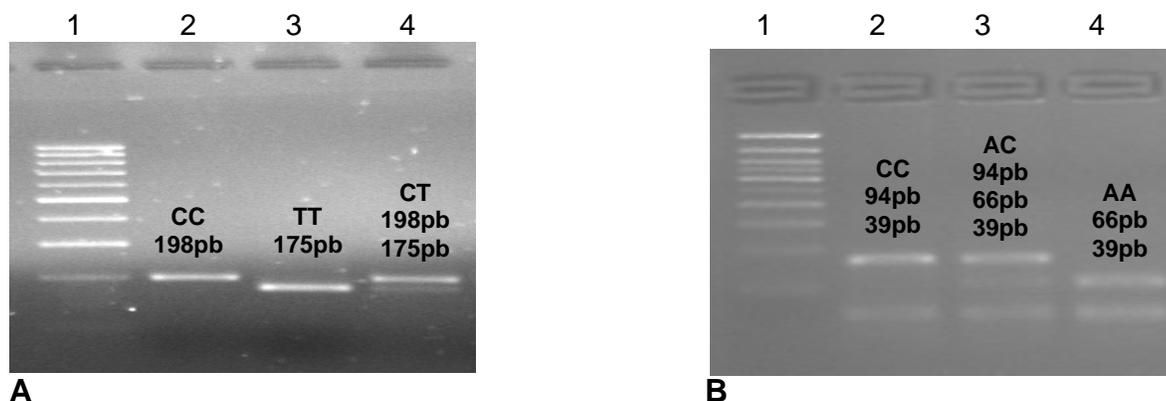
**A****B**

Figura 2: : Gel de agarose 3% (A) e 4% (B) corado com Brometo de Etídio. A) MTHFR C677T:1-Ladder 100pb; 2-CC (Homozigoto selvagem - Ala222Ala); 3-TT (Homozigoto variante - Val222Val); 4-CT (Heterozigoto - Ala222Val/Val222Val); B) MTHFR A1298C: 1-Ladder 50pb; 2- AC (Hetero Heterozigoto -Glu430Ala); 3-CC (Homozigoto variante - Ala430Ala); 4-AA (Homozigoto selvagem - Glu430Glu).

3.6 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizada a margem de erro estipulado em menor que 5%, de acordo com o teste de significância de Lilliefors (significância quando $p < 0,05$). Para os testes de associação foram utilizados o teste Qui-quadrado e quando necessário, o teste exato de Fisher. Para a análise da sobrevida foi calculado o intervalo de tempo (em meses) entre as datas de cirurgia e óbito de cada paciente, ou do último retorno nos casos sobreviventes. Adicionalmente, o intervalo de tempo para a análise da sobrevida livre de doença local foi calculado utilizando como ponto final a data da recidiva local ou a data do último retorno nos casos assintomáticos. As curvas de sobrevidas foram avaliadas segundo o modelo Kaplan-Meier, e sua significância confirmada pelo valor de p de Wilcoxon.

As análises de regressão logística multivariada e de Cox Proportional Hazard foram utilizadas para ajustar os valores de Odds ratio (OR), Hazard ratio e Intervalo de Confiança (IC 95%) dos resultados significativos. A relação clínico-biológica e o valor de $p < 0,10$ foram considerados para selecionar as variáveis a serem utilizadas no modelo de análise multivariada. Os cálculos estatísticos foram realizados com a utilização do software Epi Info® v3.4.3.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Análise descritiva

4.1.1 Análise clinicopatológica

Os pacientes analisados foram caracterizados quanto às características clinicopatológicas dos pacientes (tabela 6). O primeiro dado apresentado refere-se ao estágio do tumor, separados divididos em 4 estádios. Conforme classificação, o grupamento por estádios é realizado conforme as características TNM do tumor, sendo T tamanho do tumor, N aos linfonodos acometidos e M relaciona-se às metástases à distância. Sendo assim, o estágio I agrupa os tumores que apresentam T1N0M0, o estágio II os tumores com T2N0M0, estágio III os tumores T1,T2, T3N0 e N1 e o estágio IV qualquer T e N2 (INCA, 2014).

Dos pacientes avaliados, 35 apresentaram tumores no estágio I, sendo que 21 pacientes correspondem ao grupo com tumores da cavidade oral e orofaringe, e 14 pacientes com tumores da laringe. No estágio II, foram 49 pacientes, sendo 36 pacientes com CE da cavidade oral e orofaringe, e 13 pacientes com CE de faringe. No estágio III, foram 67 pacientes, dos quais 48 pacientes apresentaram CE da cavidade oral e orofaringe, e 19 pacientes com CE de faringe. Já no estágio IV, 155 pacientes foram confirmados no total, entre eles, 101 com tumores na cavidade oral e orofaringe e 54 com tumores na laringe (tabela 6).

A classificação patológica dos tumores de acordo com seu tamanho (pT1, pT2, pT3 e pT4), revelou que 41,2% dos tumores estão classificados como pT1/pT2; 25,2% como pT3 e 33,7% como pT4, distribuídos nos três sítios anatômicos.

Na análise de linfonodos acometidos (pN) e confirmados pela anatomia patológica, foi

observado que 163 pacientes apresentaram resultado negativo e 143 apresentaram resultado positivo. Na cavidade oral e orofaringe, 110 pacientes apresentaram linfonodos acometidos, enquanto na laringe, apenas 33.

Tabela 6: Perfil clinicopatológicos dos pacientes com CECP.

Características clinicopatológicas	Total		Sítios			
			Oral, Orofaringe		Laringe	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
Estádio						
I	35	11,4	21	10,2	14	14,0
II	49	16,0	36	17,5	13	13,0
III	67	21,9	48	23,3	19	19,0
IV	155	50,7	101	49,0	54	54,0
Tamanho do tumor (pT)						
pT1, pT2	126	41,2	94	45,6	32	32,0
pT3	77	25,2	58	28,2	19	19,0
pT4	103	33,7	54	26,2	49	49,0
Linfonodos acometidos (pN)						
Negativo	163	53,3	96	46,6	67	67,0
Positivo	143	46,7	110	53,4	33	33,0
Total	306	100,0	206	67,3	100	32,7

4.1.2 Características do tratamento

Para determinação das características do tratamento foram avaliadas as respectivas variáveis: cirurgia, radioterapia, quimioterapia e margens cirúrgicas livres ou acometidas dados apresentados na tabela 7. Todos os pacientes desse estudo passaram por procedimento cirúrgico.

O tratamento radioterápico foi aplicado para 157 pacientes (51,3%), ao passo que 149

pacientes (48,7%) não realizaram radioterapia. Distribuindo as análises por sítio anatômico, tem-se que 105 pacientes com CE oral ou de orofaringe não passaram pelo tratamento radioterápico, enquanto 101 foram tratados. Dos pacientes com CE de laringe, 52 não passaram pela radioterapia e 48 passaram pelo tratamento (tabela 7).

Os pacientes tratados com quimioterapia foram apenas 20 indivíduos, sendo 286 os pacientes não tratados (93,5%). Destes não tratados, 190 casos apresentam tumores na cavidade oral ou orofaringe e 96 apresentam tumores na laringe.

Quanto às margens cirúrgicas, 86,9% dos pacientes apresentaram margens livres de tumores, enquanto, 12,9% possuíam margem cirúrgica comprometida (tabela 7).

Tabela 7: Características do tratamento dos pacientes com CECP.

Características do tratamento	Total		Sítios			
			Oral, Orofaringe		Laringe	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
Radioterapia						
Não	157	51,3	105	51,0	52	52,0
Sim	149	48,7	101	49,0	48	48,0
Quimioterapia						
Não	286	93,5	190	92,2	96	96,0
Sim	20	6,5	16	7,8	4	4,0
Margens cirúrgicas						
Livres de Tumor	266	86,9	176	85,4	90	90,0
Positiva	40	13,1	30	14,6	10	10,0
Total	306	100,0	206	67,3	100	32,7

4.1.3 Fatores de prognóstico

Foram estudados dados de recidiva local que analisa o retorno da doença no local do tumor

primário, bem como dados relacionados ao óbito.

Durante as análises, alguns dados foram classificados como “não avaliados”. No caso de recidivas, isso ocorreu devido a não eliminação total do tumor após cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia. Por isso, o reaparecimento do tumor não pode ser considerado recidiva, mas tumor residual. Nos casos de óbito, esses pacientes considerados "não avaliados", morreram por outros motivos não relacionados ao câncer, sendo assim eliminados da análise estatística.

Os resultados de recidiva local mostram que 59,2% dos pacientes não recidivaram e 22,5% recidivaram, sendo que 18,3% não puderam ser avaliados, pelos motivos já citados. Quanto aos sítios anatômicos, 114 possuíam tumores na cavidade oral ou orofaringe e os outros 67 na laringe (tabela 8).

Do total de pacientes, 119 vieram a óbito (38,9%), sendo 82 acometidos por tumores na cavidade oral e orofaringe e 37 na laringe (tabela 8).

Tabela 8: Análise de prognóstico dos pacientes com CECP.

Dados do acompanhamento	Total		Sítios			
			Oral, Orofaringe		Laringe	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
Recidiva local						
Não	181	59,2	114	55,3	67	67,0
Sim	69	22,5	51	24,8	18	18,0
Não avaliado	56	18,3	41	19,9	15	15,0
Óbito						
Não	168	54,9	111	53,9	57	57,0
Sim	119	38,9	82	39,8	37	37,0
Não avaliado	19	6,2	13	6,3	6	6,0
Total	306	100,0	206	67,3	100	32,7

4.2 Análise Genotípica

A análise genotípica realizada nos dois polimorfismos propostos, considerou três possibilidades genotípicas, a saber, homocigoto selvagem, heterocigoto e homocigoto variante. Os casos “não avaliados” são aqueles que não puderam ser avaliados por ausência de amplificação do DNA.

O gene *MTHFR* C677T tem como possibilidade genotípica CC (Ala/Ala), CT (Ala/Val) e TT (Val/Val). O genótipo TT, composto pelo alelo mutante, foi pouco observado 6,9% dos pacientes (21 amostras). Para o genótipo heterocigoto (CT), foram identificados 151 pacientes (49,3%) . Já o genótipo selvagem CC, esteve presente em 42,8% dos pacientes (131 amostras). Apenas 1% das amostras (3 pacientes) não foram avaliadas (tabela 9).

O polimorfismo *MTHFR* A1298C possui os seguintes genótipos possíveis: AA (Glu/Glu), AC (Glu/Ala) e CC (Ala/Ala). Desses genótipos, o homocigoto selvagem (AA) foi o mais frequente, correspondendo a 52,3% das amostras (160 pacientes). O heterocigoto (AC) esteve presente em 38,6% das amostras (118) indivíduos. O genótipo AA, homocigoto variante e menos frequente, foi observado em 4,6% das amostras (14 indivíduos). Para esse gene, não foi possível analisar genotipicamente 14 amostras, ou seja, 4,6% dos pacientes (tabela 9).

Tabela 9: Análise genotípica dos pacientes com CECp para os polimorfismos MTHFR C677T e A1298C.

Genótipos	Total		Sítios			
			Oral, Orofaringe		Laringe	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
MTHFR C677T (Ala/Val)						
CC (Ala/Ala)	131	42,8	89	43,2	42	42,0
CT (Ala/Val)	151	49,3	99	48,1	52	52,0
TT (Val/Val)	21	6,9	17	8,3	4	4,0
Não avaliado	3	1,0	1	0,5	2	2,0
MTHFR A1298C (Glu/Ala)						
AA (Glu/Glu)	160	52,3	113	54,9	47	47,0
AC (Glu/Ala)	118	38,6	74	35,9	44	44,0
CC (Ala/Ala)	14	4,6	9	4,4	5	5,0
Não avaliado	14	4,6	10	4,9	4	4,0
Total	306	100,0	206	67,3	100	32,7

4.3 Análise de prognóstico

Os resultados de associação dos polimorfismos com os dados de recidiva local dos pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe irradiados não foram estatisticamente significativos (MTHFR C677T $p=0,660$ e MTHFR A1298C $p=0,368$ respectivamente). Igualmente, para análise de recidiva local dos casos de pacientes não irradiados com CE oral e de orofaringe não apresentou associação significativa com os polimorfismos MTHFR C677T ($p=0,936$) e MTHFR A1298C ($p=0,925$) (tabela 10).

Tabela 10: Análise de recidiva local dos pacientes com CE oral e de orofaringe.

Genótipos	ORAL, OROFARINGE									
	Casos irradiados					Casos não irradiados				
	Recidiva local					Recidiva local				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p
No.	(%)	No.	(%)	No.		(%)	No.	(%)		
MTHFR C677T (Ala/Val)										
CC (Ala/Ala)	25	44,6	12	50,0	0,660	24	41,4	11	40,7	0,936
CT + TT (Ala/Val+Val/Val)	31	55,4	12	50,0		34	58,6	15	55,6	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	1	3,7	
MTHFR A1298C (Glu/Ala)										
AA (Glu/Glu)	36	64,3	16	66,7	0,368	26	44,8	12	44,4	0,925
AC + CC (Glu/Ala+Ala/Ala)	19	33,9	5	20,8		29	50,0	14	51,9	
Não avaliado	1	1,8	3	12,5		3	5,2	1	3,7	
Total	56	70,0	24	30,0		58	68,2	27	31,8	

A mesma análise para as amostras de CE de laringe, tanto irradiados quanto não irradiados também não apresentaram resultados estatisticamente significativos (MTHFR C677T $p=0,210$ e $p=0,76$ e MTHFR A1298C $p=0,61$ e $p=0,21$, respectivamente) (tabela 11).

Tabela 11: Análise de recidiva local dos pacientes com CE de laringe.

Genótipos	LARINGE									
	Casos irradiados					Casos não irradiados				
	Recidiva local					Recidiva local				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p
No.	(%)	No.	(%)	No.		(%)	No.	(%)		
MTHFR C677T (Ala/Val)										
CC (Ala/Ala)	15	37,5	5	62,5	0,210	12	44,4	5	50,0	0,763
CT + TT (Ala/Val+Val/Val)	24	60,0	3	37,5		15	55,6	5	50,0	
Não avaliado	1	2,5	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
MTHFR A1298C (Glu/Ala)										
AA (Glu/Glu)	20	50,0	5	62,5	0,611	15	55,6	3	30,0	0,208
AC + CC (Glu/Ala+Ala/Ala)	18	45,0	3	37,5		11	40,7	6	60,0	
Não avaliado	2	5,0	0	0,0		1	3,7	1	10,0	
Total	40	83,3	8	16,7		27	73,0	10	27,0	

As análises de óbito para os pacientes com CE de cavidade oral e orofaringe irradiados e não irradiados não foram significativas para nenhum dos polimorfismos estudados (MTHFR C677T $p=0,694$ e $p=0,723$ e MTHFR A1298C $p=0,681$ e $p=0,988$, respectivamente). Também não foram significativos os dados de óbito para os pacientes com CE de laringe, como observado na tabela 12 e 13.

Tabela 12: Análise de óbito dos pacientes com CE de cavidade oral e orofaringe.

Genótipos	ORAL, OROFARINGE									
	Casos irradiados					Casos não irradiados				
	Óbito					Óbito				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p
No.	(%)	No.	(%)	No.		(%)	No.	(%)		
MTHFR Ala/Val (C677T)										
CC (Ala/Ala)	25	47,2	19	43,2	0,694	26	44,8	15	39,5	0,681
CT + TT (Ala/Val+Val/Val)	28	52,8	25	56,8		32	55,2	22	57,9	
Não avaliado	0	0,0	0	0,0		0	0,0	1	2,6	
MTHFR Glu/Ala (A1298C)										
AA (Glu/Glu)	35	66,0	29	65,9	0,723	26	44,8	15	39,5	0,988
AC + CC (Glu/Ala+Ala/Ala)	17	32,1	12	27,3		31	53,4	18	47,4	
Não avaliado	1	1,9	3	6,8		1	1,7	5	13,2	
Total	53	54,6	44	45,4		58	60,4	38	39,6	

Tabela 13: Análise de óbito dos pacientes com CE de laringe.

Genótipos	LARINGE									
	Casos irradiados					Casos não irradiados				
	Óbito					Óbito				
	Não		Sim		p	Não		Sim		p
No.	(%)	No.	(%)	No.		(%)	No.	(%)		
MTHFR Ala/Val (C677T)										
CC (Ala/Ala)	8	28,6	11	57,9	0,055	14	48,3	6	33,3	0,314
CT + TT (Ala/Val+Val/Val)	19	67,9	8	42,1		15	51,7	12	66,7	
Não avaliado	1	3,6	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
MTHFR Glu/Ala (A1298C)										
AA (Glu/Glu)	15	53,6	10	52,6	1,00	15	51,7	6	33,3	0,143
AC + CC (Glu/Ala+Ala/Ala)	12	42,9	8	42,1		12	41,4	12	66,7	
Não avaliado	1	3,6	1	5,3		2	6,9	0	0,0	
Total	28	59,6	19	40,4		29	61,7	18	38,3	

A avaliação de sobrevida livre de doença específica em pacientes com CE de laringe tratados com radioterapia apresentou relação significativa com o polimorfismo MTHFR C677T, ($p=0,030$ figura 3). Com base na figura, observa-se que com 12 meses de análise, aproximadamente 27% dos pacientes portadores do alelo C, já haviam morrido, enquanto 8% dos pacientes portadores de pelo menos um alelo T, faleceram. Aos 18 meses, em média, 67% dos pacientes que apresentavam a homozigose de C, sobreviveram livre de tumores, contra 92% sobreviventes portadores do alelo T. Com 36 meses de acompanhamento, cerca de 50% dos pacientes portadores da homozigose de C, morreram quando apenas 20% dos pacientes portadores do alelo T, vieram a óbito.

Confirmando os dados acima, a análise multivariada revelou que a presença de pelo menos um alelo T diminui em até três vezes o risco do paciente vir a óbito precocemente (HR= 0,30; CI= 0,10-0,89; tabela 14).

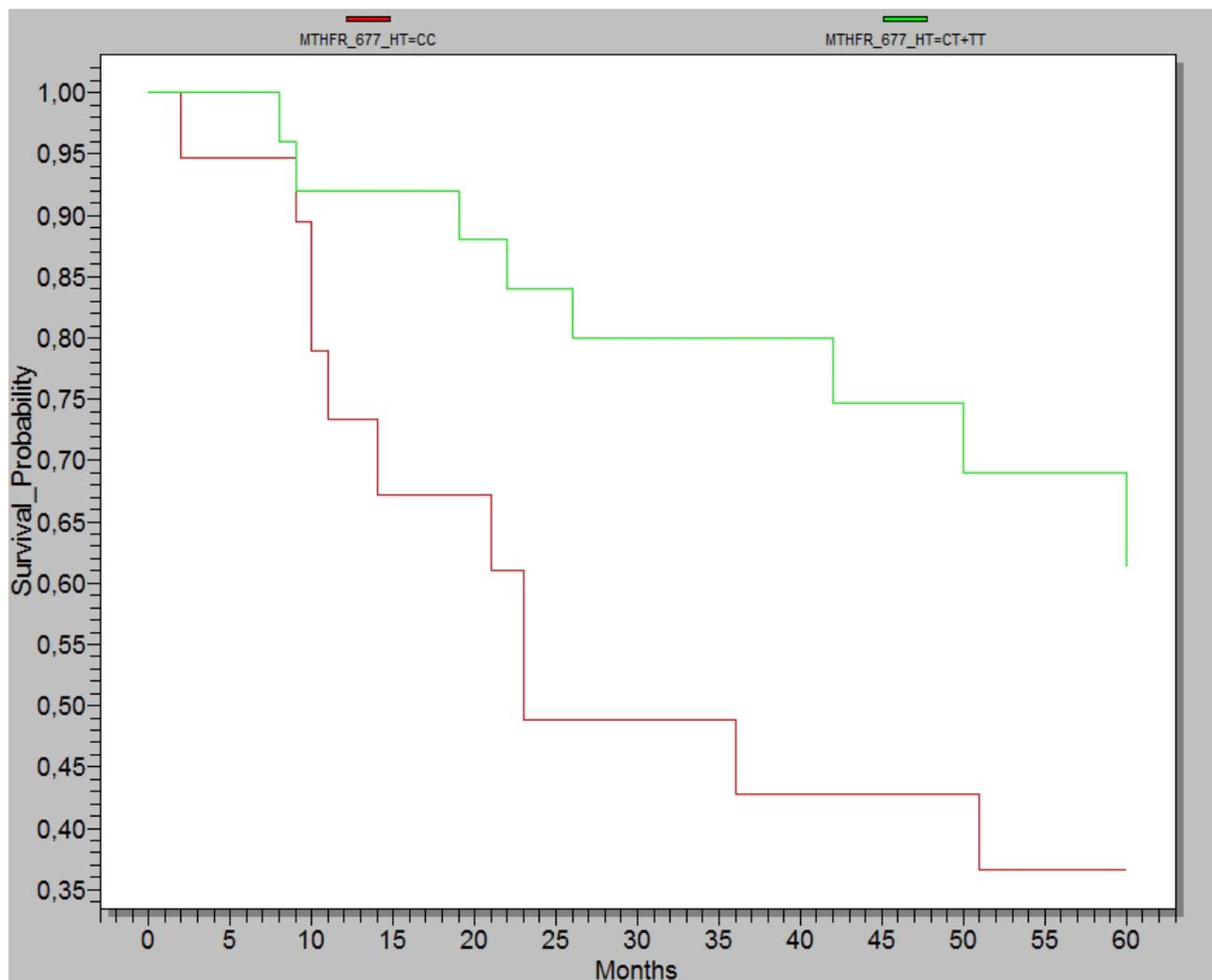


Figura 3: Curva de sobrevida livre de doença específica referente a pacientes com CE de laringe irradiados para o polimorfismo MTHFR C677T (N= 48 pacientes / p=0,030).

Tabela 14: Análise multivariada de sobrevida livre de doença específica para pacientes com CE de laringe irradiados para o polimorfismo MTHFR C677T.

Variáveis	DOENÇA ESPECÍFICA	
	Laringe	
	Irradiados	
	HR (95% CI)	p
Estádio		
I, II	1	
III	1,72 (0,13-23,69)	0,685
IV	0,95 (0,12-7,63)	0,960
MTHFR C677T (Ala/Val)		
CC (Ala/Ala)	1	
CT + TT (Ala/Val+Val/Val)	<u>0,30 (0,10-0,89)</u>	<u>0,030</u>
MTHFR A1298C (Glu/Ala)		
AA (Glu/Glu)	1	
AC + CC (Glu/Ala+Ala/Ala)	0,66 (0,25-1,75)	0,407

As curvas de sobrevida doença específica para os casos irradiados de CE oral e orofaringe não apresentou resultados significativos para os polimorfismos estudados, bem como os casos não irradiados de CE de laringe (dados não apresentados).

Discussão

5 DISCUSSÃO

Neste estudo analisou-se dados de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, nos sítios de cavidade oral, orofaringe e laringe, tratados no Hospital Heliópolis/SP. Buscou-se avaliar a associação dos polimorfismos MTHFR C677T e A1298C com fatores prognósticos e com a resposta à radioterapia, em pacientes tratados ou não com essa modalidade terapêutica. Dentre as características prognósticas, as associações de recidiva local, óbito e sobrevida livre de doença local não apresentaram resultados estatisticamente significativos para ambos polimorfismos em nenhum sítio anatômico analisado.

Verificou-se, após análise estatística, que o polimorfismo A1298C, apesar de estar relacionado com a baixa atividade da enzima Metiltetrahydrofolato redutase (MTHFR), não teve relação com os dados de prognóstico, não relacionando-se com a radiosensibilidade tumoral.

Um estudo feito por Sailasree e colaboradores (2011) realizado na Índia, avaliou 130 pacientes com carcinoma epidermóide de de cavidade oral, buscando associar os polimorfismos A1298C e C677T com resultados prognósticos desses pacientes. Apesar deste estudo ter sido construído com metodologia semelhante a utilizada no nosso trabalho, esses pesquisadores estudaram uma população com características divergentes, pois os pacientes avaliados foram tratados com radioterapia e quimioterapia. Quanto aos resultados, os autores encontraram que o polimorfismo A1298C, foi associado a uma menor sobrevida dos pacientes, além de aumentar a chance de recidivas para o câncer oral, dados contraditórios aos nossos uma vez que não tivemos associação desse polimorfismo com dados prognósticos. Um outro dado contraditório nesse mesmo estudo corresponde ao polimorfismo C677T, que não obteve relação significativa com dados prognósticos de sobrevida. Esses autores afirmam que, apesar de não haver dados significativos para o polimorfismo C677T, os cálculos sugerem uma "tendência" de associação entre este polimorfismo e a melhora na sobrevida dos pacientes, o que corrobora com nosso estudo.

Esses dados divergentes na comparação dos estudos de Sailasree et al (2011) e os aqui encontrados, podem ser explicados especialmente pela característica da população

estudada, pois esses pesquisadores avaliaram pacientes tratados com radioterapia e quimioterapia, sem a separação dessas modalidades terapêuticas. Isso é relevante uma vez que o uso do quimioterápico 5-Fluoracil inibe a síntese de DNA (compete com o dUMP, inibindo a timidilato sintase), semelhante ao efeito produzido pela baixa concentração de folato devido a ineficiência da MTHFR. Ou seja, ainda que esse resultado seja "favorável" ao combate do tumor, a associação dessas modalidades terapêuticas, afeta significativamente a sobrevida dos pacientes, ocasionando morte precoce e falência do tratamento.

Os pacientes com CE de laringe tratados com radioterapia aqui estudados, apresentaram dados significantes quando associados ao polimorfismo MTHFR C677T, o que não ocorreu para aqueles não irradiados. Esta associação foi comprovada pela análise multivariada, demonstrando que a presença de pelo menos um alelo T, ou seja, a troca de um aminoácido alanina por uma valina na enzima MTHFR, diminui em até três vezes a chance de o paciente vir a óbito precocemente.

Considerando que este efeito protetor do alelo T para o polimorfismo MTHFR C677T ocorreu em pacientes com CE de laringe irradiados, sugere-se que a ineficiência da enzima MTHFR causada pela troca do aminoácido (Ala/Val), aumente a radiosensibilidade tumoral, consequentemente, tornando o tratamento radioterápico mais eficiente.

Este resultado pode indicar que a deficiência enzimática da MTHFR induzida pelo polimorfismo C677T diminui a biodisponibilidade de folato no microambiente tumoral, o que diminui a participação deste nutriente nas vias metabólicas de síntese de nucleotídeos, diminuindo a proliferação e a reparação das células tumorais.

O estudo feito por Kawakita et al (2012) no Japão, analisando 277 pacientes com CECP associando dados prognósticos e o polimorfismo C677T, não encontrou relação significativa para este polimorfismo. Este resultado contraditório ao nosso pode, também, ser explicado pela característica da população estudada, visto que foi composta por pacientes tratados com radioterapia e quimioterapia. Essa forma de tratamento multimodal pode comprometer a sobrevida dos pacientes, além de causar divergência nos resultados de associação do polimorfismo C677T e dados prognósticos. Ainda com base nesse estudo, observou-se que a idade média dos portadores de CECP era superior aos 51 anos de idade e a maioria desses pacientes eram do sexo masculino. Tais resultados são semelhantes aos aqui encontrados.

É importante ressaltar que os estudos de Sailasree et al (2011) e Kawakita et al (2012) são os únicos que relatam a associação dos polimorfismos A1298C e C677T em relação aos dados prognósticos dos pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Esses pesquisadores avaliaram pacientes tratados de forma multimodal (radioterapia/quimioterapia) para esse tipo de câncer.

Este estudo avaliou pacientes com CECP apenas em relação a uma modalidade terapêutica, a radioterapia, separados em dois grupos: irradiados e não irradiados. Tal observação reforça que este é um estudo de grande importância e, até o momento, sem precedentes.

Outros estudos sugerem que a baixa ingestão de folato em associação ao polimorfismo C677T, genótipo CT, aumentam o risco para o desenvolvimento de câncer, propondo que uma alimentação rica em frutas, vegetais, fígado ou com suplementação de ácido fólico, moderam a ineficiência da MTHFR em decorrência desse polimorfismo (SUZUKI et al, 2007; BOCCIA et al, 2009; HUANG et al, 2013).

A desregulação no metabolismo do folato predispõe a carcinogênese por induzir hipometilação do DNA, além de prejudicar os mecanismos de reparo por baixa disponibilidade de nucleotídeos. Essas alterações nas vias do folato são resultantes dos polimorfismos no gene da MTHFR e são favorecidas aos consumidores de álcool, pois o acetaldeído, principal metabólito do etanol, prejudica a absorção eficiente do ácido fólico oriundo da alimentação (SOLOMON et al, 2008).

Apesar da casuística aqui apresentada não conter em sua maioria pacientes etilistas, este número, ainda assim, foi expressivo, correspondendo a 149 pacientes dos 306 estudados. Este dado torna-se relevante uma vez que, o consumo de álcool é um dos fatores de risco para o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (FILHO et al, 2010).

O perfil dos pacientes aqui analisados para o CE de laringe tratados com radioterapia foi composto, em sua maioria, por homens tabagistas e em estádios tumorais avançados. Sabendo que o carcinoma epidermóide de laringe ocorre principalmente nos indivíduos do sexo masculino e com hábito tabagista, nossos resultados estão de acordo com a literatura (DOBROSSY et al, 2005).

O efeito protetor do alelo T no polimorfismo C677T em relação a maior sobrevida doença específica dos pacientes com carcinoma epidermóide de laringe irradiados, sugere que a

baixa eficiência da MTHFR, gerada pela troca de aminoácidos (Ala/Val) na enzima Metiltetrahidrofolato redutase, está relacionado a uma maior radiosensibilidade tumoral.

O aumento da sensibilidade do tumor para o tratamento radioterápico, diminuindo a morte precoce dos pacientes, foi o principal dado a ser destacado neste estudo. Fatores que podem explicar a relação de aumento da sensibilidade do tumor para o tratamento radioterápico, favorecendo a sobrevida do paciente são, principalmente, três: o desequilíbrio nos níveis de precursores do DNA (nucleotídeos), alteração do processo normal de metilação e a instabilidade do DNA por defeito nos mecanismos de reparo.

O primeiro mecanismo evidencia que a deficiência de folato resulta em ineficiência da metilação de dUMP para dTMP, durante a síntese de timidilato, precursor da timina, comprometendo a síntese de DNA (BLOUNT et al, 1997).

A segunda alteração importante gerada pela baixa biodisponibilidade de folato relaciona-se a hipometilação do DNA global, conhecida por induzir ativação de protooncogenes (FANIDI et al, 2014).

Em terceira análise, tem-se que a baixa concentração de folato prejudica os mecanismos de reparo do DNA, uma vez que diminui o aporte de nucleotídeos, gerando instabilidade do DNA (KAWAKITA et al, 2012).

Com base nos dados apresentados, destaca-se que o polimorfismo MTHFR C677T pode ser um importante biomarcador para avaliação prognóstica de pacientes com carcinoma epidermóide de laringe tratados com radioterapia. Pois, a presença de pelo menos um alelo mutante (T) no gene da enzima Metiltetrahidrofolato redutase, confere aumento na sobrevida doença específica desses pacientes.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Ao serem analisados a relação dos genótipos obtidos com o prognóstico dos pacientes com carcinoma oral, de orofaringe e de laringe, associando dados clinicopatológicos, reincidência local e óbito, observou-se que os dois polimorfismos estudados não possuem relação estatisticamente significativa para esses parâmetros.

Em relação aos resultados de sobrevida doença específica dos pacientes com CE oral e de orofaringe não irradiados, também não encontramos associação quanto aos polimorfismos propostos (MTHFR A1298C e C677T).

Entretanto, a análises de sobrevida doença específica para pacientes com CE de laringe tratados com radioterapia que possuem o polimorfismo MTHFR C677T, apresentaram resultados significantes, evidenciando que a presença de pelo menos um alelo T na região codificante do gene dessa enzima, confere um efeito protetor aos pacientes, diminuindo a morte precoce em até três vezes.

Essa alteração de aminoácidos de alanina para valina na enzima Metiltetrahidrofolato redutase, diminui sua eficiência enzimática, diminuindo a oferta intracelular de 5,10 - Tetrahidrofolato. Esta forma ativa de folato que participa da via metabólica de síntese de nucleotídeos como cofator e sua baixa concentração, compromete a síntese de DNA por falta de precursores.

Com base nessa participação do folato na via de síntese de precursores de DNA é que pode-se explicar o principal mecanismo através do qual o alelo T presente no polimorfismo MTHFR C677T confere um efeito protetor aos pacientes CE de laringe tratados com radioterapia, evitando a morte precoce e favorecendo o tratamento radioterápico do câncer.

Referências

Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. L. L., A. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALVARENGA, L. et al. Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 74, p. 68-73, 2008.

ALBERTS, B. et al. *Biologia Molecular da célula*. (5a ed.) Porto Alegre: Artmed, 2010.

BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo Patologia Geral*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

BOCCIA, E., et al. Meta-analyses of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and risk of head and neck and lung cancer. *Cancer Letters* 273, 55–61; 2009.

BALUZ, K. et al. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 48(4): 597-607;2002.

BLOUNT, B. C., et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 3290–3295;1997.

BELCHER R. et al. Current Treatment of Head and Neck Squamous Cell Cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 2014.

CAPACCIO P., et al. Association between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, alcohol intake and oropharyngolaryngeal carcinoma in northern Italy. *The Journal of Laryngology & Otology*. Vol. 119, pp. 371–376, 2005.

CARRARD V. C., et al. Álcool e Câncer Bucal: Considerações sobre os Mecanismos Relacionados. *Revista Brasileira de Cancerologia* 54(1): 49-56, 2008.

CHAWAPUN, N. Update on clinical radiobiology. *Biomed Imaging Interv J*, v. 2, n. 1, p. e22, 2006.

COLOMBO, J. Rahal., P. Genética de cancer de cabeça e pescoço. *Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia*, v. 55, p. 165-174, 2009.

CHEN J. et al. MTHFR Polymorphism, Methyl-Replete Diets and the Risk of Colorectal Carcinoma and Adenoma among U.S. Men and Women: An Example of Gene-Environment Interactions in Colorectal Tumorigenesis. *J Nutr.* Feb;129 (2S Suppl):560S-564S.1999.

DOBROSSY Lajos. Epidemiology of head and neck cancer: Magnitude of the problem. *Cancer and Metastasis Reviews* 24: 9–17, 2005.

FILHO V. W., et al. Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 13(2): 175-87; 2010.

FANIDI, A. et al. A prospective study of one-carbon metabolism biomarkers and cancer of the head and neck and esophagus. *Int. J. Cancer*: 00, 00–00 (2014); UICC; 2014.

GIGLIOTTI M. P., et al. "Principais mecanismos de atuação do álcool no desenvolvimento do câncer oral". *Odontologia. Clín.-Científ., Recife*, 7 (2): 107-112, abr/jun., 2008.

GALBIATTI, A. L. S. et al. Head and neck cancer: genetic polymorphisms and folate metabolism. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 78, n. 1, p. 132-139, 2012.

_____. Association between 11 genetic polymorphisms in folate-metabolising genes and head and neck cancer risk. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER* 48, 1525–1531, 2012.

_____. Polymorphisms and haplotypes in methylenetetrahydrofolate reductase gene and head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol Biol Rep*, 39:635–643, 2012.

HUANG, G. L. , et al. Serum Folate, MTHFR C677T Polymorphism and Esophageal Squamous Cell Carcinoma Risk. *Biomed Environ Sci*,; 26(12): 1008-1012; 2013.

INCA, 2014. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância.124p., il. col., mapas. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

INCA, 2014. Site disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=54> Acesso em: 30/07/2014.

IARC: International Agency for Research on Cancer, 2008. ISBN 978 92 832 0423 7.

KRUSZYNA L. L., et al. Polymorphic variants of folate metabolism genes and the risk of laryngeal cancer. *Mol Biol Rep* 37:241– 247, 2010.

KAI LI, et al. Association of 677 C.T (rs1801133) and 1298 A.C (rs1801131) Polymorphisms in the MTHFR Gene and Breast Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis Based on 57 Individual Studies. *PLOS ONE*, June; Volume 9; Issue 6; e71290, 2014.

KAWAKITA, D. et al. Association between dietary folate intake and clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Annals of Oncology* 23: 186–192, 2012.

KURESHI, N. et al. Head and Neck Cancer Susceptibility:A Genetic Marker in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene. *ORL*;66:241–245, 2004.

KIM, Y.I. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene–nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr. Rev.* 58, 205–217, 2000.

KEUM N. et al. Folic Acid Fortification and Colorectal Cancer Risk. *Am J Prev Med*; 46(3S1):S65–S72, 2014.

LEE, J. J. et al. Global assessment of genetic variation influencing response to retinoid chemoprevention in head and neck cancer patients. *Cancer Prev Res (Phila)*, v. 4, n. 2, p. 185-93, 2011.

LEVINE A. J. et al. Genetic Variability in the MTHFR Gene and Colorectal Cancer Risk Using the Colorectal Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 19(1) January 2010.

LARSSON S. C. et al. Folate Intake, MTHFR Polymorphisms, and Risk of Esophageal, Gastric, and Pancreatic Cancer: A Meta-analysis. *GASTROENTEROLOGY*;131:1271–1283, 2006.

LI D. et al. Association of the Polymorphisms of MTHFR C677T, VDR C352T, and MPO G463A with Risk for Esophageal Squamous Cell Dysplasia and Carcinoma. *Archives of Medical Research*, 39, 594-600, 2008.

LLEWELLYN C.D., N.W. Johnson, K.A.A.S. Warnakulasuriya. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people - a comprehensive literatura review. *Oral Oncology* 37 401-418, 2001.

MASSANO J. et al. Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102:67-76, 2006.

MEHROTRA R, Yadav S. Oral squamous cell carcinoma: Etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian Journal of Cancer* | April–Volume 43, June 2006.

MOORE, K. et al. Support needs and quality of life in oral cancer: a systematic review. *Int J Dent Hyg*, 2013.

MADELINE A. e KANE MD. The role of folates in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Detection and Prevention* 29, 46–53, 2005.

NELKE, K. H. et al. Human papillomavirus and its influence on head and neck cancer predisposition. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, v. 67, p. 610-6, 2013.

NEVES L. B. et al. Homocisteína. *J Bras Patol Med Lab*, v. 40, n. 5, p. 311-20, outubro 2004.

NASKI F. H. et al. Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* 533, 11–20, 2014.

PETERS, T. T. et al. Relation Between Age, Comorbidity, and Complications in Patients Undergoing Major Surgery for Head and Neck Cancer. *Ann Surg Oncol*, 2013.

RELJIC A, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and cancer risk: the Croatian case-control study. *Clin Biochem.*;40(13-14):981-5, 2007.

RODRIGUES, J. O. et al. Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) gene and risk of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol.*;76(6):776-82; 2010.

SAILASREE, R. et al. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in oral cancer patients. *J Oral Pathol Med*, 40: 61–66, 2011.

SINHA, N. et al. Relevance of cancer initiating/stem cells in carcinogenesis and therapy resistance in oral cancer. *Oral Oncol*, v. 49, n. 9, p. 854-62, 2013.

SHEN, H. et al. Polymorphisms of Methylene-tetrahydrofolate Reductase and Risk of Lung Cancer: A Case-Control Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. Vol. 10, 397–401, April, 2001.

SONG, C. et al. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms Increase Risk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a Chinese Population. *CANCER RESEARCH* 61, 3272–3275, April 15, 2001.

SUZUKI, T. et al. One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of head and neck squamous cell carcinoma: Case–control study. *Cancer Sci*, September, vol. 98, no. 9, 1439–1446, 2007.

SOLOMON P. R. et al. Polymorphism in ADH and MTHFR genes in oral squamous cell carcinoma of Indians. *Oral Diseases* 14, 633–639, 2008.

TADDEI, M. L. et al. Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out. *Cancer Lett*, v. 341, n. 1, p. 80-96, 2013.

VAIRAKTARIS E., et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and minor increase of risk for oral cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.*;132(4):219-22, 2006.

VANNUCCHI, Helio and MELO, Sandra Soares. Hiper-homocisteinemia e risco cardiometabólico. *Arq Bras Endocrinol Metab*[online]., vol.53, n.5, pp. 540-549. ISSN 0004-2730, 2009.

VANNUCCHI Helio, Thais Helena Monteiro. Série de Publicações ILSI Brasil Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes: Ácido Fólico. São Paulo: ILSI Brasil International Life Sciences Institute do Brasil, 2010.

VASCONCELOS L. et al. Invasive head and neck cutaneous squamous cell carcinoma: clinical and histopathological characteristics, frequency of local recurrence and metastasis. *An Bras Dermatol.*;89(4):562-8,2014.

WEINBERG, R. A. A biologia do câncer. (1a ed.). Porto Alegre: Artmed: 2008.

ZEE, R. Y. N et al. Genetic variation of fifteen folate metabolic pathway associated gene loci and the risk of incident head and neck carcinoma: The Women's Genome Health Study. *R.Y.L. Zee et al. / Clinica Chimica Acta* 418; 33–36, 2013.

Anexo

8 ANEXO



COMPLEXO HOSPITALAR HELIÓPOLIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

São Paulo, 03 de outubro de 2003.

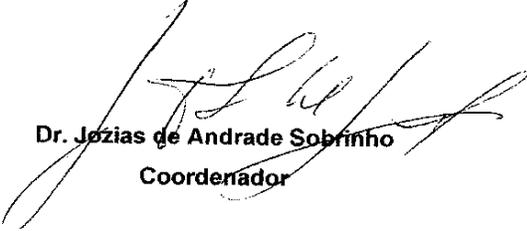
Ao

Dr. Marcos Brasilino de Carvalho.

Informamos que adendo do projeto de pesquisa "Identificação de marcadores tumorais para o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e avaliação de sua relevância clínica e estado nutricional" registrado neste CEP sob nº 135, foi aprovada por este Comitê de Ética na Pesquisa no dia 03/10/2003.

COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL HELIÓPOLIS
Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
Coordenador

Atenciosamente,


Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
Coordenador