

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE REPARO DE DNA POR  
RECOMBINAÇÃO EM CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA**

**PAULA LUCE BOHRER**

**PORTO ALEGRE**

**2009**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE REPARO DE DNA POR  
RECOMBINAÇÃO EM CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do grau de Doutor.

**PAULA LUCE BOHRER**

**Orientador: Dr. Vinícius Duval da Silva**

**Co-orientadora: Dr. Suzanne Kamel-Reid**

Porto Alegre  
2009

B677a Bohrer, Paula Luce.

Avaliação dos mecanismos de reparo de DNA por recombinação em células de carcinoma epidermóide de boca / Paula Luce Bohrer; orient. Vinícius Duval da Silva. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

XX f.: il. gráf.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Médica.

1. Reparo do DNA. 2. Recombinação Genética. 3.

Bibliotecária Responsável:

Sabrina Caimi Silva da Costa

CRB10/1606

Dedico este trabalho ao meu vô,  
Flávio Antônio Luce (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, em especial aos meus pais Paulo e Lúcia que sempre estiveram presentes, pelo apoio e carinho e meus irmãos Marcelo e Mônica, pelo carinho, amizade.

Ao meu grande mestre e amigo, meu avô, Flávio Antônio Luce (*in memoriam*) que sempre esteve ao meu lado, pelo apoio, carinho e amizade.

Ao Roberto, cuja dedicação e empenho em tudo que faz sempre serviram de exemplo para continuar crescendo como pessoa e profissional, agradeço por todo carinho, apoio e compreensão, principalmente durante os momentos em que estive ausente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva, agradeço pela orientação, incentivo, amizade e pelos ensinamentos.

A Dra. Suzanne Kamel-Reid, minha orientadora durante meu estágio PDEE no Princess Margaret Hospital, Toronto, Canadá, agradeço pela orientação e ensinamentos.

Aos meus colegas de laboratório no Princess Margaret Hospital, Dra. Patrícia Reis, Dr. Mahadeo Sukhai, Dra. Grace Bradley, Jerry Machado, Mariam Thomas, Miranda Tomenson, Nilva Cervigne, Dra. Rashmi Goswami, Rikki Bharadwaj e Yali Xuan, por todo carinho e paciência nos ensinamentos de biologia molecular e principalmente pela amizade e companheirismo no período que estive lá.

Ao Dr. Rob Bristow, Princess Margaret Hospital, e aos membros de seu laboratório Farid Jalali e Norman Chan pelo auxílio na realização de alguns experimentos.

A todas as pessoas que colaboraram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

A CAPES por financiar parte dos meus estudos.



**SUMÁRIO**

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
<b>Capítulo 1 .....</b>	<b>11</b>
1.1. Introdução e Justificativa .....	11
1.2. Hipótese, Objetivos e Objetivos Específicos.....	25
1.3. Materiais e Métodos.....	26
1.4. Resultados .....	32
1.5. Discussão. ....	42
1.6 Conclusões.....	51
1.7 Perspectivas futuras.....	52
1.8 Referências Bibliográficas.....	53
<b>Capítulo 2 .....</b>	<b>59</b>
2.1. Artigo Científico .....	60



## RESUMO

Com a finalidade de obter maiores conhecimentos sobre mecanismos de reparo de DNA no desenvolvimento do câncer bucal, foi avaliado o reparo da quebra da dupla fita de DNA (DSBs) em células de indivíduos com menos de 40 anos e com mais de 40 anos. O objetivo foi determinar se as células de carcinomas epidermóides de boca de indivíduos com menos de 40 anos de idade e com mais de 40 anos diferem em relação à capacidade para reparar as DSBs por meio de ambos os mecanismos de reparo por recombinação, a recombinação homóloga (HR) e a junção de extremidades não homólogas (NHEJ). Foi acessada funcionalmente a quebra da dupla fita de DNA utilizando linhagens celulares UT-SCC desenvolvidas a partir de indivíduos com menos de 40 anos e com mais de 40 anos. Foi examinado o dano global de DNA pelo ensaio do cometa utilizando radiação ionizante (RI). Um total de 200 células por amostra foi analisado utilizando o sistema de análise de imagem, Komet software. Para a análise da capacidade das linhagens celulares UT-SCC repararem o dano ao DNA por HR e NHEJ, foi utilizado um ensaio com plasmídeo, descrito por Secretan et al., 2004. No ensaio do cometa foram realizados três experimentos independentes para cada linhagem celular, e não foi observada diferença entre as linhas celulares provenientes de indivíduos com menos de 40 anos e com mais de 40 anos em relação ao reparo das DSBs de forma global. Quando foram comparadas células irradiadas *versus* células não-irradiadas, observou-se que ambas as linhagens de celulares foram capazes de reparar as DSBs causadas pela radiação ionizante em um período de 24 horas.

Para testar se houve deficiência ou compensação de um mecanismo de reparo sobre o outro, foi realizada uma análise de HR e NHEJ, na qual se observou que tanto nas linhagens celulares de indivíduos com menos de 40 anos quanto nas dos com mais de 40 houve uma redução em ambos os mecanismos de reparo por recombinação, quando comparados à linhagem celular de ceratinócitos normais. Com base nos resultados, concluiu-se que as linhagens celulares de indivíduos com menos de 40 anos, bem como os com mais de 40 anos, têm seus mecanismos de reparo por recombinação reduzidos. Não há diferença estatisticamente significativa na eficiência de recombinação NHEJ entre as linhagens celulares UT-SCC de indivíduos jovens e com mais de 40 anos. Há uma maior redução no reparo das DSBs por HR em linhagens celulares de indivíduos com mais de 40 anos.

## ABSTRACT

To gain a further insight into DNA repair mechanisms for oral squamous cell carcinoma (OSCC) in younger and older patients. Our main goal was to determine if young and older patients differ in their ability to repair double-stranded breaks (DSBs) by both Homologous Recombination (HR) and Non-homologous End-Joining (NHEJ). We have functionally assessed double-stranded breaks using UT-SCC cell lines established from young (<40 yr.) and older ( $\geq 40$  yr) patients. We have examined global DNA damage using the Comet assay after cell exposure to ionizing radiation (IR). In the Comet assay, cells are embedded in agar, cell membranes are removed by lysis, the DNA is allowed to unwind, and electrophoresis is performed using an alkaline pH buffer. Loops of DNA around strand breaks are more relaxed, and they are pulled towards the anode, appearing to have a comet "tail". Undamaged DNA remains tightly wound in the nucleoid, or comet "head". Tail moments were used to measure the degree of DNA fragmentation. Cells were irradiated (20 Gy), and collected at different points in time. After electrophoresis, cells were stained with ethidium bromide, and observed under a fluorescent microscope. A total of 200 cells per sample were analyzed using the Komet image analysis system. HR and NHEJ analyses were performed using a plasmid-based repair assay, in order to measure the ability of the UT-SCC cell lines undergo DNA DSB repair. In order to assess global DNA DSB repair, three independent experiments were performed for all cell lines using the Comet assay, and no differences were found between lines derived from younger and older patients when comparing irradiated vs. non-

irradiated cells. We have also observed that both young and old patients' cell lines are able to repair DNA DSBs caused by ionizing radiation in about 24 hrs. To test whether there is a deficiency or compensation from one DSB mechanism, the analysis of homologous recombination and non-homologous end-joining was employed. We have observed that both young and old patients' UT-SCC cell lines showed deficient double-stranded break repair with both mechanisms. However homologous recombination efficiency was largely compromised in UT-SCC cell lines derived from older patients.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

DNA – *Desoxiribonucleic Acid* – Ácido Desoxirribonucleico  
et al. – e colaboradores  
INCA – Instituto Nacional do Câncer  
% - porcentagem  
EGFR – fator de crescimento epidérmico  
HPV – Vírus do papiloma humano  
PBS – Tampão fosfato de sódio  
pH – Potencial de hidrogênio  
HR – Recombinação homóloga  
NHEJ – Junção de extremidade não homóloga  
Gy – Gray  
V – volts  
TBE – Tampão de eletroforese – Tris-borato-EDTA  
AT – Ataxia Telangiectasia  
FA – Anemia de Fanconi  
NBS – Síndrome de Bloom

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

#### **Câncer Bucal**

As estimativas para o ano de 2008 das taxas brutas de incidência de casos novos por câncer em homens e mulheres no Brasil são de 466.730 novos casos. Dentre eles, o câncer de boca representa uma neoplasia com alta incidência no país, ocupando a quinta posição entre os homens e a sétima entre as mulheres. A análise dos dados obtidos pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) permite afirmar que a incidência dessa neoplasia vem crescendo a cada ano. O INCA estimou para o ano de 1999 o surgimento de 7.950 novos casos de câncer de boca; em 2003 as estimativas foram de 10.635 novos casos e, em 2008, as estimativas aumentaram, ainda mais, para 14.160 novos casos. (<http://www.inca.org.br/estimativas/2008/tbregiões/>).

Dentre os casos de câncer de boca, o carcinoma epidermóide é a neoplasia diagnosticada com maior frequência, representando aproximadamente 95% dentre as demais neoplasias de boca (Sawyer e Wood, 1992; Gervasio, Dutra *et al.*, 2001; Walker, Boey *et al.*, 2003). Borges, Garbin *et al.*, 2008, encontraram, também, uma alta prevalência: 72,7%, de carcinoma epidermóide de boca diagnosticados no laboratório de patologia do Mato Grosso. Em relação à localização anatômica de maior prevalência para o desenvolvimento do câncer de boca, destacam-se os lábios, as bordas da língua e o assoalho de boca. Na

grande maioria dos casos, acometem pacientes entre a quinta e sexta décadas de vida (Conley e Sadoyama, 1973; Sawyer e Wood, 1992; Gervasio, Dutra *et al.*, 2001; Borges, Garbin *et al.*, 2008).

Em relação aos fatores de risco para o desenvolvimento dessa doença, pode-se afirmar que existe uma forte associação entre o hábito de fumar e a ingestão de bebidas alcoólicas e o desenvolvimento do câncer de boca, sendo estes considerados os fatores etiológicos mais relacionados com esse tipo de neoplasia. (Ogden e Wight, 1998; Ogden, Wight e Cowpe, 1999; Ogden, Wight e Rice, 1999; Du, Squier *et al.*, 2000; Walker, Boey *et al.*, 2003; Burzlaff, Bohrer *et al.*, 2007; Dahlstrom, Little *et al.*, 2008).

Koch, Lango *et al.*, 1999, encontraram uma alta taxa de perda de heterozigidade em 3p, 4q e 11q13 em carcinomas espinocelulares de boca de indivíduos fumantes, assim como a mutação em p53 também se mostrou mais prevalente em indivíduos fumantes com carcinoma epidermóide de boca. As células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos expostos ao fumo e/ou ao álcool apresentaram maior frequência de micronúcleos, bem como aumento na proliferação celular (Paiva, Sant'ana Filho *et al.*, 2004; Bohrer, Filho *et al.*, 2005).

Apesar do câncer de boca ocorrer com maior frequência em indivíduos com mais de 40 anos, vem crescendo o número de casos dessa neoplasia em indivíduos com menos de 40 anos (Sherin, Simi *et al.*, 2008). Além disso, na grande maioria dos casos estes indivíduos jovens não fumam e não têm o hábito de ingerir bebidas alcoólicas com frequência (Mackenzie, Ah-See *et al.*, 2000; O'regan, Toner *et al.*, 2006; Dahlstrom, Little *et al.*, 2008; Hirota, Braga *et al.*,

2008; Sherin, Simi *et al.*, 2008). Segundo, Llewellyn, Johnson *et al.*, 2001, existe um grupo distinto, dentre os indivíduos jovens com câncer de boca, não exposto ao fumo e ao álcool. Por outro lado, Wang, Irish *et al.*, 2001, observaram que 88% dos indivíduos com carcinoma epidermóide de boca, com idade acima de 45 anos eram fumantes e 67% consumiam bebidas alcoólicas diariamente em comparação com 46% e 33% de indivíduos jovens, que fumavam e consumiam bebidas alcoólicas, respectivamente. É importante salientar que, mesmo quando presentes os principais fatores de risco – o fumo e o álcool –, o tempo de exposição a estes fatores é consideravelmente menor nos indivíduos com menos de 40 anos de idade, quando comparados com indivíduos com mais de 40 anos de idade (Mackenzie, Ah-See *et al.*, 2000; Llewellyn, Johnson *et al.*, 2001; Hirota, Braga *et al.*, 2008).

Em relação à história familiar, foi observado que os indivíduos que desenvolveram câncer de boca com idade inferior à 40 anos possuíam familiares com história prévia de neoplasia maligna quando comparados com indivíduos com mais de 40 anos de idade (Llewellyn, Linklater *et al.*, 2003; Hirota, Braga *et al.*, 2008). Outro fator a ser considerado em relação ao desenvolvimento do câncer de boca em indivíduos com menos de 40 anos é a dieta. Segundo Llewellyn, Linklater *et al.*, 2003, a maioria dos indivíduos jovens com câncer de boca, de ambos os sexos, relataram um consumo diário de frutas e vegetais inferior ao recomendado pela Sociedade Americana de Câncer. A exposição à fumaça do cigarro (o chamado fumante passivo), o uso de outros produtos derivados de tabaco (como a maconha, por exemplo) e alguns fatores



ocupacionais também devem ser considerados como prováveis fatores etiológicos de risco para desenvolvimento do carcinoma epidermóide na região de cabeça e pescoço, tanto em mulheres quanto em homens não-fumantes e que não ingerem bebidas alcoólicas pelo menos uma vez por semana (Dahlstrom, Little *et al.*, 2008).

A infecção pelo HPV também pode ser considerada um fator etiológico relacionado ao desenvolvimento do carcinoma epidermóide de boca em indivíduos jovens, que não fumam e não ingerem bebidas alcoólicas. Alguns autores sugerem que o HPV16, dentre os inúmeros genótipos de HPV, é um fator importante relacionado ao desenvolvimento do câncer de orofaringe nessa população jovem (Lingen, Sturgis *et al.*, 2001; Van Houten, Snijders *et al.*, 2001; Dahlstrom, Little *et al.*, 2008). No entanto, essa associação entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento do carcinoma epidermóide de boca ainda é bastante controversa na literatura (Hirota, Braga *et al.*, 2008). A presença da infecção por subtipos de HPV de alto risco para o desenvolvimento do câncer, como o HPV16 e o HPV11, está mais relacionada ao desenvolvimento de tumores de orofaringe do que a neoplasias de boca (Lingen, Sturgis *et al.*, 2001).

Em indivíduos jovens, a localização anatômica mais acometida pelo câncer de boca é a borda da língua. (Sasaki, Moles *et al.*, 2005; Dahlstrom, Little *et al.*, 2008; Hirota, Braga *et al.*, 2008). Outro estudo epidemiológico envolvendo indivíduos com carcinoma epidermóide na região de cabeça e pescoço, que nunca fumaram e que não tinham o hábito de ingerir bebidas alcoólicas pelo menos uma vez por semana, revelou que essa neoplasia ocorre com maior

freqüência em mulheres com menos de 50 anos na língua, em homens com menos de 60 anos na orofaringe e em mulheres com 70 anos ou mais na mucosa gengival (Dahlstrom, Little *et al.*, 2008).

Algumas alterações moleculares que ocorrem especificamente em indivíduos jovens com carcinoma epidermóide de boca já foram identificadas por alguns pesquisadores. Wang, Irish *et al.*, 2001, avaliaram a freqüência de instabilidade em microsátélites em indivíduos com carcinoma epidermóide na região de cabeça e pescoço. Os resultados demonstraram que pacientes jovens e não-fumantes apresentavam maior instabilidade em microsátélites quando comparados com pacientes com idade superior a 45 anos. O'regan, Toner *et al.*, 2006, observaram a existência de uma menor instabilidade genômica em indivíduos jovens com carcinoma epidermóide de boca. Além disso, constataram a deleção no gene supressor de tumor CDKN2A (p16) em pacientes com mais de 40 anos com características típicas para o desenvolvimento dessa neoplasia, mas o mesmo não foi encontrado em indivíduos jovens e não-fumantes com câncer de boca.

Desta forma, essas alterações significativas no perfil genômico dessa população sugere a possível existência de um mecanismo molecular diferente para a carcinogênese oral em indivíduos jovens e não-fumantes, o qual ainda não foi esclarecido (Lingen, Sturgis *et al.*, 2001; Llewellyn, Johnson *et al.*, 2001; O'regan, Toner *et al.*, 2006). Goldstein e Irish, 2005, sugerem que a alta incidência de não-fumantes, a baixa distribuição em relação ao sexo, a grande porcentagem de tumores que ocorrem em boca e orofaringe e a baixa incidência

de desenvolvimento de tumores secundários indica a possibilidade do envolvimento de fatores etiológicos diferentes no desenvolvimento do carcinoma epidermóide na região de cabeça e pescoço em indivíduos jovens.

Dentre os mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento do carcinoma epidermóide de boca, defeitos nas vias de reparo de DNA tem sido sugeridos na literatura como fatores associados ao desenvolvimento dessa neoplasia (Scully, Field *et al.*, 2000b; a; c). Kim, Glazer *et al.*, 2006, encontraram defeito no reparo do DNA mitocondrial induzido por 4NQO (4-nitroquinolina-1óxido) em células provenientes de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. De acordo com Bau, Tseng *et al.*, 2008, alterações genéticas relacionadas às vias de reparo da quebra da dupla hélice de DNA podem contribuir para a vulnerabilidade genética a fatores de risco ao desenvolvimento do câncer de boca, como o fumo, causando danos ao DNA e, conseqüentemente, levando à carcinogênese bucal.

### **Reparo de DNA**

O reparo de DNA é um mecanismo de importância singular para a manutenção da integridade dos organismos multicelulares e para garantir estabilidade genômica. Diversos agentes etiológicos são capazes de causar danos ao DNA e, dentre eles, podemos destacar calor, dano oxidativo, radiação ultravioleta, radiações ionizantes, agentes oxidativos e diversas substâncias químicas encontradas no meio ambiente, como, por exemplo, a fumaça do

cigarro (Kao, Rosenstein *et al.*, 2005). Existem diversas vias de reparo de DNA, com diferentes enzimas que atuam em distintos tipos de lesões. Em relação à quebra da fita simples de DNA, esse dano pode ser sanado por via de reparo por excisão de bases ou via de reparo por excisão de nucleotídeos. Nestas duas primeiras vias de reparo a lesão é removida e a seqüência de DNA original é restaurada por uma DNA polimerase que utiliza a fita não-danificada como molde, e a quebra resultante na dupla hélice é ligada pela DNA ligase (Kao, Rosenstein *et al.*, 2005).

Um tipo de lesão no DNA potencialmente perigosa ocorre quando as duas fitas da dupla hélice são quebradas (*double strands breaks*, DSBs), não restando, assim, uma fita molde intacta para o reparo, tornando este reparo mais difícil que o da quebra da fita simples de DNA. Rearranjos errôneos das quebras da dupla fita de DNA podem ocorrer, levando à perda ou à amplificação cromossômica, bem como a translocações cromossômicas e, dessa forma, induzir a transformação tumoral, principalmente quando essas alterações envolvem um gene superessor de tumor ou um proto-oncogene (Khanna e Jackson, 2001). Uma célula pode se adaptar a um pequeno dano irreparável, mas acredita-se que uma única DSB não reparada seja capaz de, por exemplo, matar a célula se algum gene essencial for inativado ou induzir apoptose (Khanna e Jackson, 2001). Esse tipo de dano ao DNA pode ser gerado por fatores ambientais, como radiações ionizantes, produtos metabólicos celulares e recombinações intermediadas (Sonoda, Hochegger *et al.*, 2006)

Para o reparo das DSBs, duas vias de reparo podem ser seguidas: a junção de extremidades não-homólogas (NHEJ) ou a junção de extremidades homólogas ou recombinação homóloga (HR) (Sonoda, Hochegger *et al.*, 2006). Tanto a NHEJ como HR seguem uma seqüência de interações de proteínas para seguir a via de reparo do DNA (Khanna e Jackson, 2001; Van Gent, Hoeijmakers *et al.*, 2001; Weterings e Van Gent, 2004).

Segundo Zhong, Chen *et al.*, 2002; Burma, Chen *et al.*, 2006, a junção de extremidades não-homóloga contribui significativamente para a manutenção da estabilidade genômica nas células de mamíferos. Neste caso, as duas extremidades da fita de DNA quebrada são simplesmente reconectadas. Esta via de reparo é considerada uma via não livre de erro, pois a quebra da fita não é reparada com a utilização de uma fita homóloga como molde. Conseqüentemente, inserções e deleções podem ser geradas no local do reparo, comprometendo, assim, a integridade do genoma (Burma, Chen *et al.*, 2006). No caso da NHEJ, inicialmente, tem-se a ligação das proteínas Ku70 e Ku80 às extremidades da quebra. Em seguida há o recrutamento de DNA-PKcs, que sinaliza a presença da quebra e ativa as outras proteínas, o complexo XRCC4-ligase IV, para, assim, dar continuidade à via de reparo por NHEJ (Khanna e Jackson, 2001; Van Gent, Hoeijmakers *et al.*, 2001; Wood, Mitchell *et al.*, 2001; Weterings e Van Gent, 2004; Burma, Chen *et al.*, 2006). Desta forma, todos os componentes da via de reparo por junção de extremidades não-homólogas têm um papel importante na manutenção da integridade do genoma

e, conseqüentemente, na supressão da carcinogênese (Burma, Chen *et al.*, 2006).

O reparo de DNA via recombinação homóloga utiliza extensões da fita homóloga para reparar as quebras, por isso, geralmente, está livre de erros. Essa via de reparo envolve a associação de proteínas da família RAD52 (RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, MRE11 e XRS2), que formam um complexo protéico junto à extremidade de DNA danificada (Khanna e Jackson, 2001; Van Gent, Hoeijmakers *et al.*, 2001). Acredita-se que a RAD54 tem um papel importante na HR, pois o complexo RAD51 (acúmulo de proteína RAD51 no local do dano de DNA) não se forma em animais deficientes em RAD54 (Matsuda, Miyagawa *et al.*, 1999; Thacker, 2005). A RAD52 também desempenha um papel importante na HR. Esta proteína interage e co-localiza com RAD51, facilitando, assim, sua atividade, além de ter a propriedade de ligar-se diretamente às DSBs, protegendo-as da atividade de exonucleases (Thacker, 2005). Outras proteínas também relacionadas à recombinação homóloga são a BRCA1 e a BRCA2. Estas proteínas são codificadas por genes que também estão envolvidos na complexa rede da via de reparo das DSBs (Khanna e Jackson, 2001; Van Gent, Hoeijmakers *et al.*, 2001; Wood, Mitchell *et al.*, 2001). Acredita-se que esses genes têm um papel na regulação da HR, por meio da modulação de RAD51 (Levy-Lahad, Lahad *et al.*, 2001). No entanto, ainda há muito o que entender sobre a função desta família de genes e suas conseqüências quando esses genes sofreram mutações ou deleções (Thacker, 2005).

Segundo Allen, Halbrook *et al.*, 2003, existe uma competição entre os mecanismos de reparo homólogo e de junção de extremidades não homólogas no reparo das DSBs. No entanto, ainda é obscura a natureza dessa competição (Allen, Halbrook *et al.*, 2003). Estudos demonstram que os dois mecanismos de reparo atuam em momentos distintos nas diferentes fases do ciclo celular. A NHEJ atua quase que de maneira solo no reparo da dupla hélice na fase G1 do ciclo celular, enquanto que a HR começa a ter a sua atuação no final da fase S até G2. Isso pode ser compreendido pelo fato de a recombinação homóloga necessitar de um molde – a fita homóloga intacta –, para que ocorra o reparo, e esta fita homóloga só está disponível no final da fase S (Lisby e Rothstein, 2004; Burma, Chen *et al.*, 2006; Sonoda, Hocheegger *et al.*, 2006).

Cheng, Eicher *et al.*, 1998 demonstraram que a redução no reparo do dano ao DNA induzido por BPDE que é um radical livre derivado do Benzopireno (potente agente cancerígeno, formado pela combustão incompleta do tabaco) está associado e é dose dependente ao aumento do risco para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço. O autor sugere, ainda, que a baixa capacidade de reparo dos danos ao DNA induzido por carcinógenos do tabaco são mecanismos que contribuem para o desenvolvimento do câncer. Biomarcadores referentes à capacidade de reparo de DNA das células de indivíduos fumantes podem contribuir para a prevenção do câncer de boca.

Sturgis, Castillo *et al.*, 1999 demonstraram a mesma suscetibilidade relacionada ao gene de reparo de DNA polimorfo XRCC1 e o desenvolvimento do carcinoma epidermóide de boca em indivíduos fumantes. Além disso, Sturgis,

Castillo *et al.*, 1999, constataram que, quando o fumo estava associado ao álcool, houve um aumento no risco para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide de boca.

Al Rashid, Dellaire *et al.*, 2005 sugerem que a forma fosforilada p53<sup>Ser15</sup> está relacionada aos primeiros passos da sinalização para o reparo de DNA, junto com as proteínas de reparo de DNA ATM, MRN,  $\gamma$ H2AX, DNA-PKcs. Ela interage com estas proteínas na mediação do controle dos pontos de checagem do ciclo celular e de reparo de DNA, prevenindo, assim, a carcinogênese celular. Desta forma, os autores especulam que o número, a localização e a natureza da p53<sup>Ser15</sup> possa servir como um mecanismo de contagem das células para acessar a quantidade, o tipo e a severidade do dano, com a finalidade de mediar o controle dos pontos de checagem no ciclo celular para a prevenção da carcinogênese.

Shin, Kang *et al.*, 2006 sugerem que o p53 está envolvido nas vias de reparo por recombinação homóloga e por junção de extremidades não-homólogas, atuando como um facilitador para o reparo preciso das DSBs. Além disso, os autores encontraram deficiência na junção das extremidades de DNA em células humanas derivadas de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço causada por produtos da junção de extremidades de DNA, com deleções no local do reparo. Essas alterações na atividade de HR E NHEJ nas células podem contribuir parcialmente para instabilidade genética e transformação maligna.



Segundo Kang, Shin *et al.*, 2005, os mecanismos inatos de reparo das DSB podem ser mutagênicos em ceratinócitos envelhecidos, contribuindo, possivelmente, para o envelhecimento e a instabilidade genética. Assim, o envelhecimento celular pode, em parte, ser resultado do acúmulo de DSBs e de produtos de junções anormais de extremidades de DNA, resultando em um genoma instável.

Zhao, Begum *et al.*, 2008, encontraram baixa expressão de RAD17 (gene relacionado ao controle dos pontos de checagem do ciclo celular no processo de reparo de DNA) em tumores de cabeça e pescoço, sugerindo, portanto, que essa baixa expressão possa ser um fator que contribui para a instabilidade genômica em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.

Ademais, algumas síndromes estão relacionadas a defeitos em mecanismo de reparo de DNA e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de neoplasias. Dentre estas síndromes, podemos destacar a ataxia telangiectasia (AT), que ocorre devido à mutação no gene AT (ATM), que tem papel na regulação do controle do ciclo celular e no reparo das DSBs; a Nijmegen Breakage Síndrome (NBS), que ocorre devido a defeito nos genes NBS1; a Síndrome de Bloom, que ocorre devido a defeito no gene BLM (RECQL3) e a Anemia de Fanconi (FA), que está relacionada a defeitos nos genes da família FA. Todas essas doenças estão relacionadas à predisposição para o desenvolvimento de neoplasias, devido à instabilidade cromossômica causada por defeito em diferentes genes de reparo de DNA, no controle do ciclo celular e na apoptose (Thompson e Schild, 2002; Thoms, Kuschal *et al.*, 2007).

No caso da anemia de Fanconi, os genes da família FA codificam proteínas relacionadas ao reparo da quebra da dupla hélice de DNA (Grompe e D'andrea, 2001; Motoyama e Naka, 2004; Niedernhofer, Lalai *et al.*, 2005). Doze genes já foram associados à FA: FANCA, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM (Niedernhofer, Lalai *et al.*, 2005). Dentre estes genes, pelo menos seis já foram relacionados à formação de um complexo protéico chamado FA, FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF e FANCG. FANCD2 não faz parte do complexo protéico FA, assim como não é requisitado para sua formação e estabilidade. O complexo FA percebe o dano ao DNA e então ubiquitina a proteína FANCD2 (Grompe e D'andrea, 2001). Esta forma ativada da proteína FANCD2, por sua vez, interage com os genes BRCA1, BRCA2 e RAD51 na via de reparo de DNA (Hussain, Witt *et al.*, 2003; Hussain, Wilson *et al.*, 2004; Kitao, Yamamoto *et al.*, 2006; Howlett, 2007).

Defeitos nos genes da família FA foram relacionados ao desenvolvimento de diferentes tipos de neoplasias, como, por exemplo, câncer de pâncreas e de mama (Rogers, Van Der Heijden *et al.*, 2004; Van Der Heijden, Brody *et al.*, 2004; Barroso, Milne *et al.*, 2006; Howlett, 2007). A mesma associação foi encontrada em relação ao desenvolvimento do carcinoma epidermóide de boca (Snyder, Ricker *et al.*, 2007). Segundo (Alter, Greene *et al.*, 2003), os indivíduos portadores de anemia de Fanconi apresentam alto risco para o desenvolvimento de carcinomas espinocelulares de boca, orofaringe, faringe e regiões do esôfago, como mostram os dados de seu estudo. No entanto, maiores detalhes

sobre a interação destes genes na formação do complexo FA na via de reparo por recombinação ainda não foram totalmente elucidados.

Tremblay, Pintor Dos Reis *et al.*, 2006 encontraram uma baixa expressão de FANCG e GSTP1 em carcinomas epidermóides de boca de indivíduos com menos de 40 anos de idade. Hays et al, 2008, observou que a fumaça condensada do cigarro é capaz de inibir a translação de FANCD2 mRNA nas células das vias aéreas normais de humanos. Conseqüentemente, esta supressão de FANCD2 torna as células mais sensíveis aos efeitos clastogênicos presentes na fumaça do cigarro induzindo, assim, instabilidade genética. Desta forma, estas respostas celulares são capazes de selecionar clones geneticamente instáveis capazes de resistir a apoptose.

Sendo assim, mais estudos em pacientes jovens e não-fumantes são necessários para desvendar os mecanismos moleculares que estão por trás do desenvolvimento do carcinoma epidermóide de boca (O'regan, Toner *et al.*, 2006; Sherin, Simi *et al.*, 2008). A realização de um estudo funcional com a finalidade de avaliar os mecanismos moleculares, como a eficiência das vias de reparo da quebra da dupla hélice de DNA em carcinomas epidermóides, pode elucidar alguns dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento dessa neoplasia.

### **Hipótese**

As células neoplásicas de indivíduos com carcinoma espinocelular de boca apresentam maior defeito nos mecanismos de reparo da quebra da dupla fita de DNA que as células epiteliais normais.

### **Objetivos**

Avaliar a eficiência de reparo por recombinação na quebra da dupla fita de DNA em linhagens celulares de pacientes com carcinoma espinocelular de boca com menos de 40 anos e com mais de 40 anos.

**Específicos:** comparar a eficiência de reparo da quebra da dupla fita de DNA por meio dos mecanismos de recombinação homóloga (HR) e/ou junção de extremidades não-homóloga (NHEJ) em linhagens celulares de indivíduos com menos de 40 anos e com mais de 40 anos, portadores de carcinoma espinocelular de boca.

## **Materiais e Métodos**

### **1. Tipo de estudo:**

Estudo “*in vitro*” transversal observacional descritivo.

### **2. Amostra**

#### **Caracterização da população**

Grupo teste: foram utilizadas linhagens celulares já estabelecidas de ceratinócitos provenientes de indivíduos com carcinoma espinocelular de boca (UT - SCC “cell lines”) obtidas do laboratório do Dr. Reidar Grenman (Finlândia); três jovens (indivíduos com menos de 40 anos) e três indivíduos com mais de 40 anos.

Controle positivo: foram utilizadas linhagens celulares FANC A-/- and FANC D2-/-.

Controle negativo: foram utilizadas linhagens celulares de queratinócitos normais (normal Keratinocyte primary (ScienCell) e linhagem celulares de fibroblastos normais (Hs21Fs).

### 3. Ensaaios experimentais

#### 3.1 Análise da quebra de DNA por meio do ensaio do cometa

Na técnica do “ensaio do cometa”, as células são embebidas em gel de agarose e sua membrana é removida por lise, deixando, assim, o material genético livre. É feita, então, eletroforese em pH alcalino. Fragmentos de DNA ao redor das quebras na fita ficam mais relaxados e migram na direção do ânodo, dando uma aparência de um “rabo de cometa”. O DNA que não sofreu quebra permanece fortemente unido ao “nucleóide” ou “cabeça do cometa” (Szeto, Benzie *et al.*, 2005).

Este experimento permite que se faça uma análise global da quebra cromossômica provocada pela radiação ionizante, bem como uma análise da capacidade de reparo deste dano nas diferentes linhagens celulares estudadas. Essa análise foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Szeto, Benzie *et al.*, 2005.

O ensaio do cometa foi realizado em condições de pH neutro, que permite, principalmente, a detecção da quebra da dupla fita de DNA. As células foram cultivadas em placas de seis poços, por 24 horas, contendo meio de cultura. O meio de cultura DMEM (Dulbecco's minimal essential media) com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 2mM glutamina, 100 unidades/mL penicilina\ streptomomicina e na sua formulação. Após esse período, as células foram irradiadas em gelo utilizando o “Cs irradiator” (MDS Nordion, Ottawa, Ontário,

Canadá) com uma dose de 20 Gy e mantidas a 37°C até serem coletadas. A coleta das células foi feita em diferentes tempos: 0, 1, 2, 4 e 24hs após irradiação e mantidas à -80°C. Após todas as células serem coletadas, elas foram descongeladas e centrifugadas a 3000rpm por 5 minutos a 4°C. O meio foi removido, deixando-se apenas 100ul sobre o “pellet” e separados em alíquotas em microtubos; 5ul da suspensão de células foram misturados com 100ul de “low melted agarose a 45°C; 100ul da mistura foram dispersas sobre uma lâmina de vidro previamente coberta com gel de agarose e, então, cobertas com uma lamínula de vidro e colocadas sobre uma bandeja de alumínio resfriada. Após 5 a 10 minutos, a lamínula de vidro foi removida e as lâminas acondicionadas em solução de lise à 4°C por, no mínimo, dois dias. Após a lise, as lâminas foram imersas e lavadas em solução resfriada de TBE e acondicionadas na cuba de eletroforese. As lâminas sofreram eletroforese em solução de TBE por 20 minutos a 32V na câmara fria (4°C). Em seguida, as lâminas foram fixadas com etanol 95% e coradas com 2ug/ml de solução de brometo de Etidium e analisadas sob microscópio fluorescente. Um total de 200 células foram analisadas por lâmina, com a utilização de um sistema de análise de imagens, o Komet® software (Andor Technology Ltd, USA). A medida do “Tail moment” (rabo do cometa) foi utilizada neste estudo para quantificar o grau de fragmentação do DNA.

### 3.2 Ensaio experimental para avaliação da NHEJ e HR

Para este experimento, foi utilizada uma construção plasmideal para acessar a habilidade das células oriundas de carcinoma espinocelular de boca – queratinócitos normais, fibroblastos normais e células FancA<sup>-/-</sup> e FancD2<sup>-/-</sup> – repararem a quebra da dupla fita de DNA após a transfecção de duas construções plasmideais diferentes. Esta análise foi realizada de acordo com relato descrito recentemente na literatura por Secretan, Scuric et al., 2004.

O plasmídeo pCMS-EGFP (Clontech, Palo Alto, CA) foi utilizado para a construção de NHEJ. Isso foi feito através da clonagem de uma seqüência de DNA com 809pb, cujos sítios de restrição, NheI e NotI, codificam uma proteína amarela (EYFP), isolado de outro plasmídeo pEYFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA). Para conseguir a recombinação homóloga (HR), utilizou-se uma construção pCMS-hom, a qual é similar a pCMS-end, exceto pela presença de duas cópias do gene repórter recombinante (EYFP), um contendo a deleção 3' seguido da cópia da deleção 5', que são separados por múltiplas seqüências de sítios de clonagem (CMS) (Secretan, Scuric *et al.*, 2004).

O plasmídeo pCMS-end and pCMS-hom foi doado por R.H. Schiestl, (UCLA School of Medicine and Public Health). O plasmídeo foi amplificado e posteriormente purificado utilizando o kit “Plasmid Maxi-prep columns (Qiagen)”. A reação de restrição para cada plasmídeo foi realizada por meio de digestão do pCMS-end com as enzimas de restrição XhoI, e o plasmídeo pCMS-hom com



as enzimas de restrição XhoI e EcoRI. Os fragmentos cortados foram separados em gel de eletroforese com concentração de 0,7% de agarose e 0,5 TBE (tampão de eletroforese – tris-borato-EDTA) e purificado com o uso do kit “QiaQuick” colunas de gel de extração (Qiagen). Os fragmentos purificados foram quantificados com a utilização de espectômetro e gel de eletroforese (dados não apresentados).

As células foram cultivadas em placas de seis poços, por 24 horas, contendo meio de cultura. O meio de cultura apresenta, na sua formulação, 10% (v/v) de soro fetal bovino, penicilina\streptomomicina e glutamina. Foi semeada uma quantidade aproximada de  $5 \times 10^5$  células por poço. Os plasmídeos foram transfectados com o reagente lipídico Feugene (Roche, Canadá), de acordo com as instruções do fabricante, por 48 horas. Para análise, foi utilizada citometria de fluxo por meio do sistema MOFLO cell sorter, Cytomatation, Colorado, US), e a quantificação do GFP+ e YFP+ foi realizada com a utilização do software CellQuest.

A eficiência da transfecção foi determinada, segundo Secreta et al, 2004, pela porcentagem de células positivas para a proteína verde fluorescente (GFP). A eficiência absoluta da recombinação foi calculada pela fração de células que obtiveram recombinação sobre o número total de células transfectadas. No ensaio de NHEJ, a eficiência da recombinação absoluta foi então corrigida pela subtração da eficiência da NHEJ pela eficiência de HR.

#### **4. Análise Estatística**

A eficiência da recombinação por meio de NHEJ e HR entre as linhagens celulares foi avaliada com a utilização do teste-t.

#### **5. Considerações Éticas**

Este projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da FAMED – PUCRS, bem como pelo comitê de ética da UHN - University Health Network.

## RESULTADOS

### 1. Ensaio do Cometa

Os resultados obtidos pelo ensaio do cometa mostraram que tanto as linhagens celulares UT-SCC do grupo com menos de 40 anos quanto as linhagens celulares do grupo com mais de 40 anos se mostraram capazes de reparar o dano global de DNA provocado pela radiação ionizante nos diferentes tempos do experimento. As células da linhagem FancD2<sup>-/-</sup> não foram capazes de reparar as quebras da dupla fita de DNA de forma integral, acumulando, assim, dano ao DNA. (Gráfico 1).

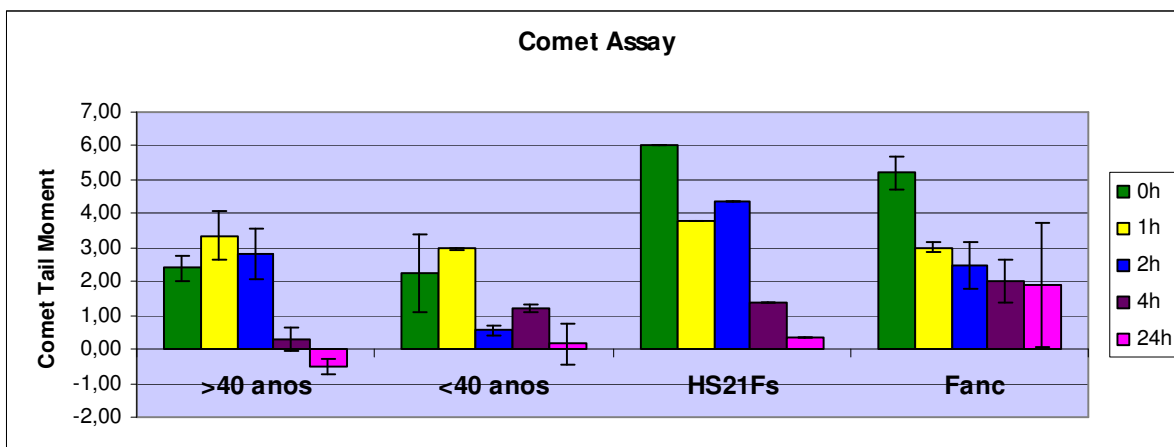


Gráfico 1: Reparo de DNA (DSB) após irradiação(20Gy) nos tempos zero e intervalos (1 a 24 horas).

OBS.: As barras representam o erro padrão das médias dos valores do *tail moment* das diferentes linhagens celulares.

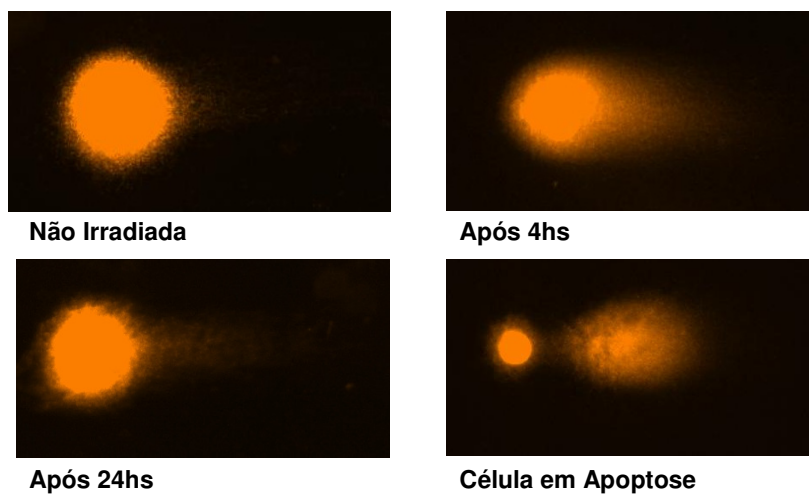


Figura 2: Imagem ilustrativa da indução de dano ao DNA com radiação ionizante através do ensaio do cometa. Linhagem celular UT-SCC 24A.

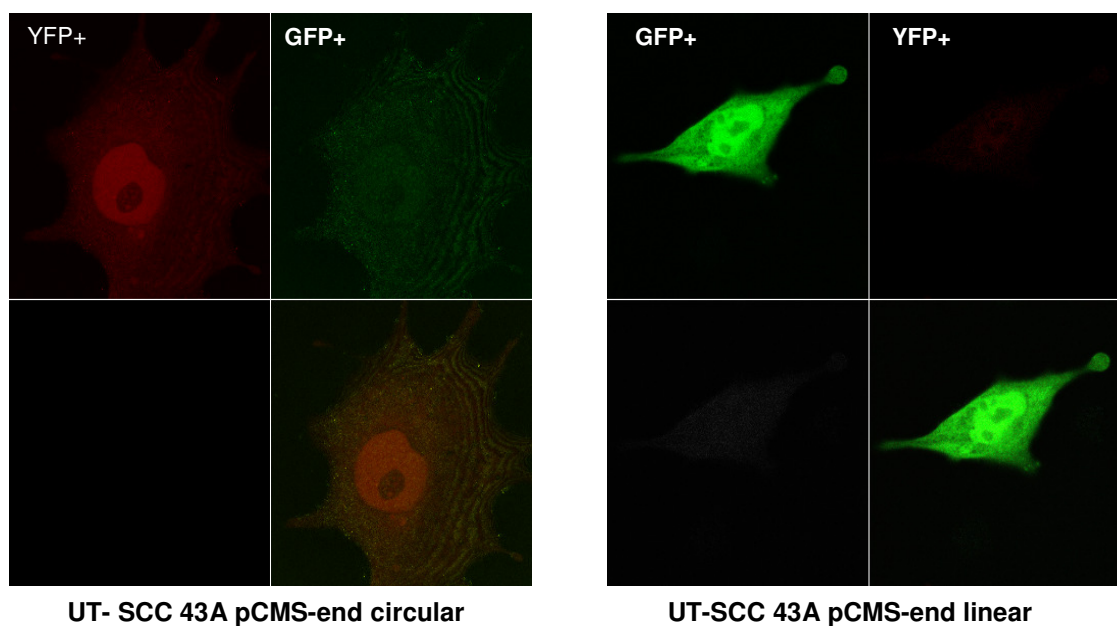


Figura 3: Análise das células trasfectadas utilizando microscópio confocal (Zeiss LSM510 META NLO two-photon) para avaliar a eficiência da transfecção.

## 2. Ensaio experimental para avaliação da recombinação homóloga e da junção de extremidades não-homólogas

O ensaio “in vitro” para avaliação da recombinação homóloga e da junção de extremidades não-homólogas foi baseado na detecção simultânea dos marcadores EGFP e EYFP, com a utilização da técnica de citometria de fluxo, descrita em Materiais e Métodos (MOFLO cell sorter, Cytomatation, Colorado, US). As células foram coletadas e analisadas vivas no citômetro de fluxo e selecionadas conforme as propriedades de dispersão de luz e alocadas em um histograma bivariado de fluorescência verde (GFP) *versus* fluorescência amarela (YFP). (figuras 3, 4 e 5). O histograma foi dividido em quatro quadrantes da seguinte maneira: duplo negativo, duplo positivo (EGFP+EYFP), apenas verde (EGFP) e apenas amarelo (EYFP). Utilizou-se, para controle, células não-transfectadas, com a finalidade de descartar autofluorescência (gráfico 4). As células também foram transfectadas com plasmídeo apenas EGFP e com plasmídeo apenas EYFP, com a finalidade de calibrar os *lasers* do citômetro de fluxo a cada análise. Além disso, as células também foram transfectadas com plasmídeo circular como controle positivo, correspondendo a 100% de eficiência de transfecção (figura 4).

Foram feitos testes para otimizar a quantidade de DNA transfectado. Desta forma, diferentes concentrações de DNA plasmídeo foram testadas para se obter a melhor eficiência de transfecção. Foram testadas as concentrações de 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 e 10µg de DNA plasmídeo. A melhor eficiência de

transfecção foi obtida com a utilização de concentração de 5.0 $\mu$ g. O tipo de reagente empregado para transfecção, a quantidade de reagente e o tempo de transfecção também foram otimizados. O reagente que apresentou maior eficiência de transfecção e que manteve um maior número de células vivas foi o Fugene® (ROCHE), em uma concentração de 5.0 $\mu$ l por 48 horas (Gráfico 2 e 3).

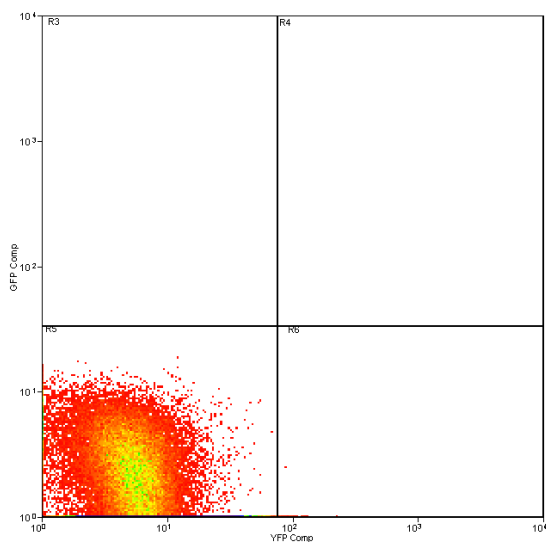


Figura 3: controle (células não-transfectadas).

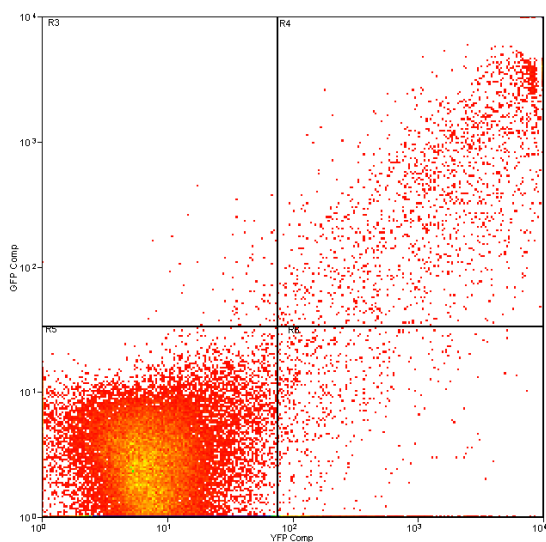


Figura 4: células transfectadas com plasmídeo pCMs-end circular.

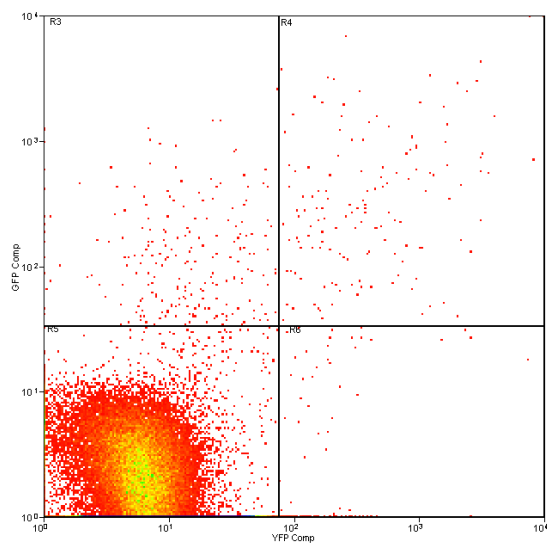


Figura 5: células transfectadas com plasmídeo PCMs-end linear.

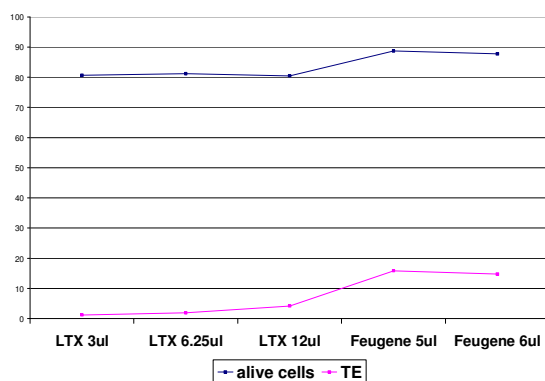


Gráfico 2: Otimização dos reagentes para transfecção em linhagens celulares UT-SCC em relação à quantidade de células vivas.

A eficiência de recombinação por NHEJ e HR na linhagem celular de fibroblastos normais (Hs21Fs) foi, respectivamente, de 97% e 95%. A eficiência de recombinação da linhagem celular FANCD2<sup>-/-</sup> ficou comprometida,

principalmente para reparo por recombinação homóloga (HR), apresentando valores de 81,2% e 41,9%, respectivamente (Gráfico 4).

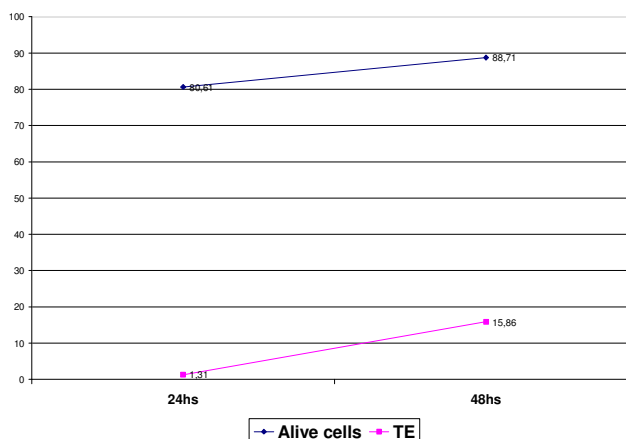


Gráfico 3: otimização do reagente Feugene para transfecção em linhagens celulares UT-SCC em relação ao tempo de transfecção e à quantidade de células vivas.

A seguir, os resultados dos experimentos com a linhagem de ceratinócitos normais e com as linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca provenientes de indivíduos com menos de 40 anos.

O reparo da dupla fita de DNA por junção de extremidades não-homólogas (NHEJ), os valores encontrados para eficiência de recombinação por reparo não-homólogo nas linhagens celulares de ceratinócitos normais e nas linhagens celulares de indivíduos com menos de 40 anos e com mais de 40 anos foram, respectivamente, 85,5%, 70,4% e 70,8%. Foi observada uma redução estatisticamente significativa na eficiência de recombinação nas linhagens celulares de indivíduos com menos de 40 anos e com mais de 40



anos quando comparados com os ceratinócitos normais ( $p = 0,02$ ;  $p = 0,01$  respectivamente) (Gráfico 5). Entretanto, não foi detectada uma diferença estatisticamente significativa na eficiência de recombinação entre as linhagens de pacientes com menos de 40 anos comparada com o grupo com mais de 40 anos.

Quando comparados os resultados da eficiência de recombinação homóloga nas linhagens celulares de indivíduos com menos de 40 anos e com mais de 40 anos, a porcentagem de eficiência de recombinação foi de 81,8%, 66,5% e 42% respectivamente. Foi observada uma redução estatisticamente significativa na eficiência de recombinação por reparo homólogo (HR) nas linhagens celulares de indivíduos com menos de 40 anos e com mais de 40 anos quando comparados com os ceratinócitos normais ( $p = 0,05$  e  $p = 0,001$  respectivamente) (Gráfico 6). Quando comparadas as porcentagens de recombinação por reparo homólogo (HR) no grupo de indivíduos com carcinoma epidermóide de boca com menos de 40 anos e com mais de 40 anos, constatou-se uma redução estatisticamente significativa na eficiência de recombinação nos indivíduos com mais de 40 anos ( $p = 0,000$ ). (Gráfico 6).

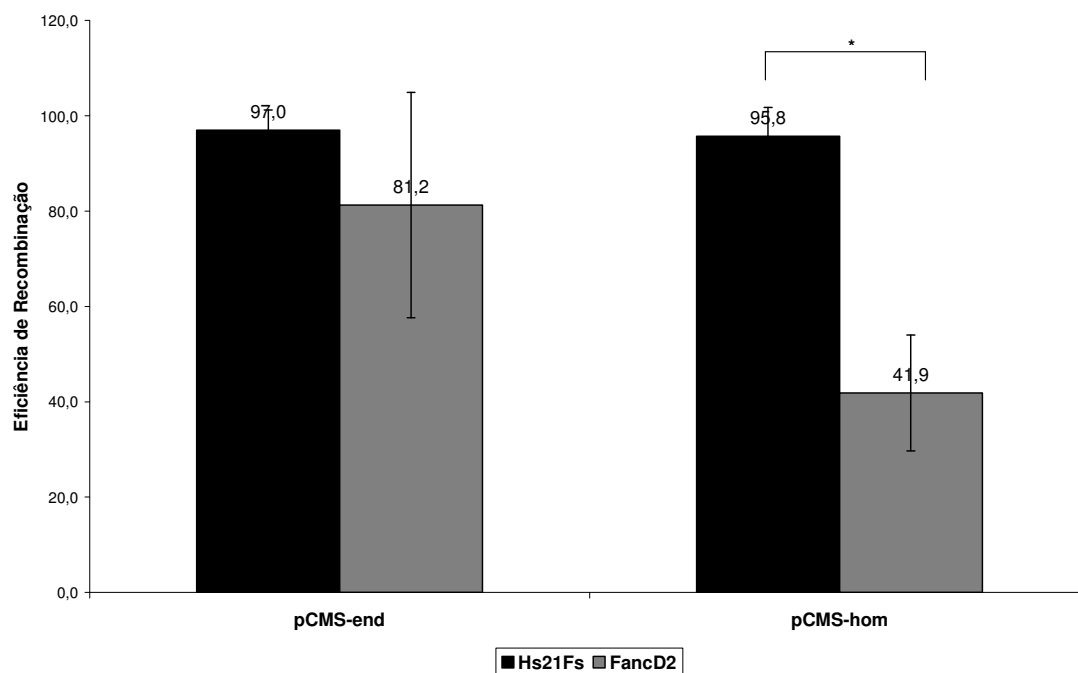


Gráfico 4: eficiência de recombinação durante o reparo da dupla fita de DNA por NHEJ e HR em células Hs21FS e FancD2.

\* Estatisticamente diferente para  $P \leq 0,005$ .

OBS: As barras representam o desvio padrão das médias dos valores da eficiência de recombinação das diferentes linhagens celulares.

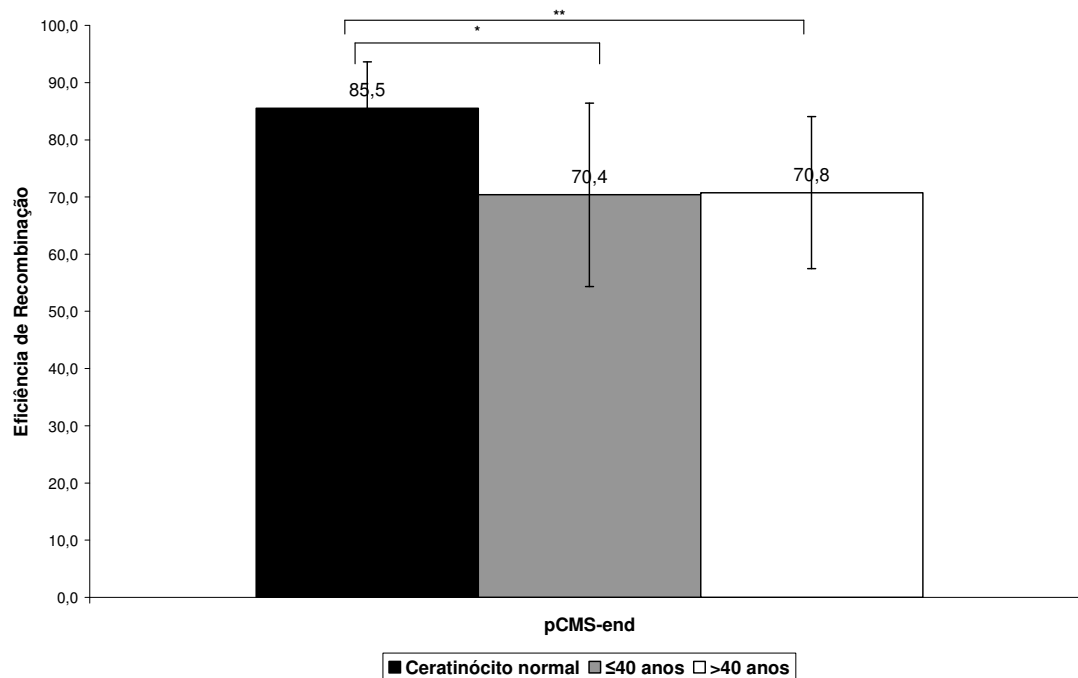


Gráfico 5: eficiência de recombinação durante o reparo da dupla fita de DNA através de NHEJ em linhagem celulares de ceratinócitos normais, células de carcinoma epidermóide de boca de indivíduos com menos de 40 anos e com mais de 40 anos de idade.

\* Estatisticamente diferente para  $P \leq 0,02$ , \*\* estatisticamente diferente para  $P \leq 0,01$ .

OBS: As barras representam o desvio padrão das médias dos valores da eficiência de recombinação das diferentes linhagens celulares.

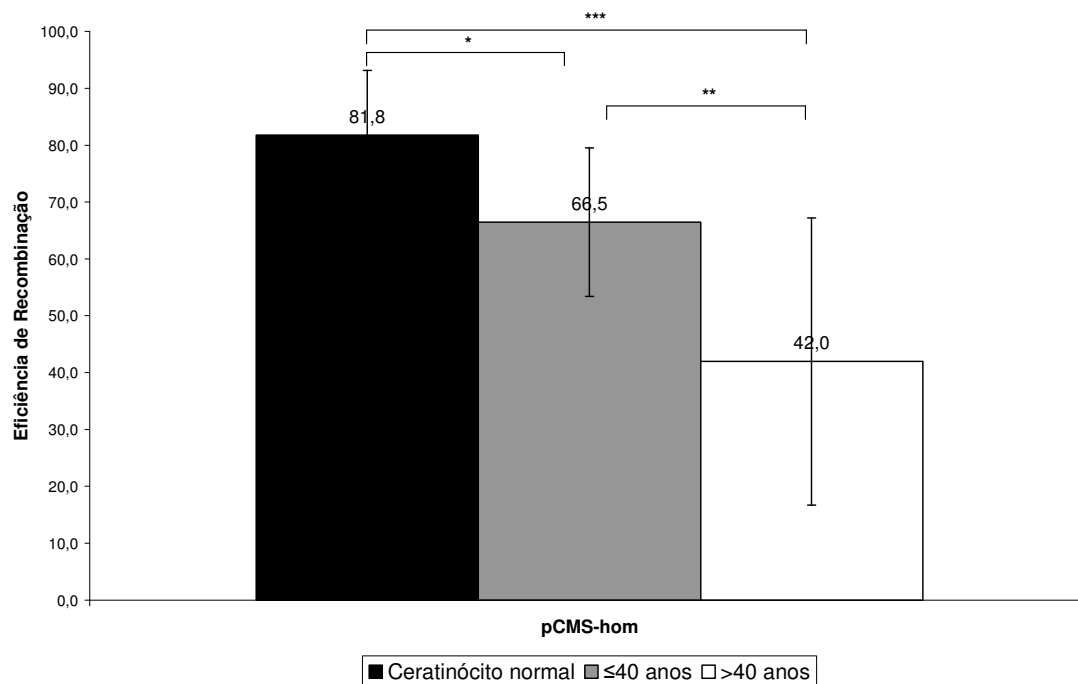


Gráfico 6: eficiência de recombinação durante o reparo da dupla fita de DNA por meio de HR em linhagem celulares de ceratinócitos normais, células de carcinoma epidermóide de boca de indivíduos com menos de 40 anos e com mais de 40 anos de idade.

\* Estatisticamente diferente para  $P \leq 0,05$ ; \*\* estatisticamente diferente para  $P \leq 0,0001$ ; \*\*\* estatisticamente diferente para  $P \leq 0,001$ .

OBS: As barras representam o desvio padrão das médias dos valores da eficiência de recombinação das diferentes linhagens celulares.

## DISCUSSÃO

O câncer bucal é uma neoplasia bastante prevalente no Brasil. Entretanto, apesar dos inúmeros estudos na literatura acerca dessa doença, pouco se evoluiu quanto à prevenção e o diagnóstico precoce, bem como em relação ao tratamento (Kim e Califano, 2004). Isso pode ser constatado por meio da análise dos dados obtidos pelo INCA, que mostram um crescimento significativo na incidência desta neoplasia entre os anos de 1999 e 2008. Neste período, observou-se um aumento significativo nas estimativas para novos casos de câncer bucal de 7.950 novos casos em 1999, para 14.160 no ano de 2008. Além disso, não houve redução na taxa de mortalidade por esta neoplasia nos últimos anos, conforme dados do INCA (<http://www.inca.org.br/estimativas/2008/tbregiões/>).

Vários estudos têm demonstrado um crescimento no número de novos casos de indivíduos jovens com câncer de boca (Mackenzie, Ah-See *et al.*, 2000; Llewellyn, Johnson *et al.*, 2001; Wang, Irish *et al.*, 2001; O'regan, Toner *et al.*, 2006; Dahlstrom, Little *et al.*, 2008; Sherin, Simi *et al.*, 2008). Apesar de ainda pequeno o número de casos diagnosticados no Brasil de indivíduos jovens com carcinoma epidermóide de boca, percebe-se que esse número vem crescendo a cada ano. Nessa população jovem com carcinoma epidermóide de boca, Sasaki, Moles *et al.*, 2005 encontraram uma distribuição em relação ao sexo, masculino-feminino, de 1.33:1, semelhante ao encontrado no grupo de indivíduos com mais de 40 anos. Por outro lado, Sherin, Simi *et al.*, 2008

encontraram uma relação de 3,5 vezes maior na incidência de câncer de boca em homens com menos de 40 anos de idade. No entanto, estes achados, de acordo com Llewellyn, Linklater *et al.*, 2003, são bastante conflitantes. Outro fator controverso na literatura são os dados em relação a fatores tradicionais de risco para o desenvolvimento do câncer de boca (fumo e álcool), que segundo Dahlstrom, Little *et al.*, 2008, na maioria dos casos, não estão presentes.

Sendo assim, é preciso estar alerta para as mudanças que vêm ocorrendo no padrão epidemiológico dos indivíduos com câncer de boca, não podendo-se assumir que apenas homens, fumantes, acima de 40 anos caracterizem o grupo de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia. Dessa forma, este grupo de indivíduos jovens com carcinoma epidermóide de boca representa um desafio no que diz respeito aos mecanismos moleculares que possam estar relacionados ao desenvolvimento dessa neoplasia, visto que estes, mesmo expostos a carcinógenos, desenvolvem a neoplasia precocemente, após um pequeno período de tempo de exposição, em comparação com indivíduos com mais de 40 anos. Uma possível explicação é a da predisposição genética para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide de boca na população jovem (Mackenzie, Ah-See *et al.*, 2000; Llewellyn, Johnson *et al.*, 2001; Hirota, Braga *et al.*, 2008). Segundo a literatura, os indivíduos com câncer de boca, com mais ou menos de 40 anos de idade, fumantes e não-fumantes, apresentam alterações moleculares distintas em suas células neoplásicas, tais como a alta taxa de perda de heterozigidade em 3p, 4q e 11q13 que foi encontrada em carcinomas espinocelulares de boca de indivíduos

fumantes comparado com não-fumantes, e a mutação em p53, que também se mostrou mais prevalente em indivíduos fumantes com carcinoma epidermóide de boca (Koch, Lango *et al.*, 1999). As células exfoliadas da mucosa bucal de indivíduos expostos ao fumo e/ou álcool apresentaram maior frequência de micronúcleos, bem como aumento na proliferação celular (Paiva, Sant'ana Filho *et al.*, 2004; Bohrer, Filho *et al.*, 2005). Indivíduos jovens, não-fumantes, com carcinoma epidermóide de boca apresentam maior frequência de instabilidade em microsátélites (Wang, Irish *et al.*, 2001). A deleção no gene supressor de tumor CDKN2A (p16) ocorre em indivíduos com mais de 40 anos, fumantes, com câncer de boca, em comparação com indivíduos jovens não-fumantes (O'regan, Toner *et al.*, 2006). Considerando todos estes achados na literatura a respeito de indivíduos portadores de carcinoma epidermóide de boca, pode-se aventar a hipótese de que indivíduos jovens portadores da doença desenvolvem uma neoplasia histologicamente semelhante, porém, geneticamente diferente da dos indivíduos com mais de 40 anos de idade.

Por sua vez, o aumento da instabilidade genética nas células tumorais, importante causa no desenvolvimento de tumores, resulta do acúmulo de mutações genéticas provocadas por defeitos nos “checkpoints” do ciclo celular e nos mecanismos de reparo de DNA (Motoyama e Naka, 2004). Várias síndromes, como ataxia telangiectasia (AT), nijmegen breakage síndrome (NBS), síndrome de Bloom e amenia anemia de Fanconi (FA) são doenças relacionadas à predisposição para o desenvolvimento de neoplasias, devido à instabilidade cromossômica causada por defeito em diferentes genes de reparo

de DNA, no controle do ciclo celular e na apoptose (Thompson e Schild, 2002; Thoms, Kuschal *et al.*, 2007). No caso da anemia de Fanconi, os genes da família FA codificam proteínas relacionadas ao reparo da quebra da dupla hélice de DNA (Motoyama e Naka, 2004). Alguns autores encontraram associação entre alterações nos genes FA e o desenvolvimento de diferentes tipos de neoplasias, como, por exemplo, o câncer de pâncreas e de mama (Barroso, Milne *et al.*, 2006; Howlett, 2007). A hipótese entre a associação dos genes da família FA e o desenvolvimento câncer de boca está apoiada no fato do risco que estes pacientes têm para desenvolver carcinomas espinocelulares de boca, como mostram os dados de Alter, Greene *et al.*, 2003, o qual afirma que as neoplasias mais freqüentes desenvolvidas pelos indivíduos portadores de FA são os carcinomas espinocelulares de boca, orofaringe, faringe e regiões do esôfago. No entanto, maiores detalhes sobre a interação desses genes na formação do complexo FA na via de reparo por recombinação ainda não foram totalmente elucidados.

Dessa forma, verifica-se a importância de estudos nessa área, com a finalidade de diagnosticar precocemente as lesões e elucidar os mecanismos moleculares e sua forma de progressão, objetivando desenvolver novas terapias que auxiliem no tratamento e na redução da taxa de mortalidade de indivíduos portadores do câncer bucal. Nesse sentido, foi desenvolvido um estudo funcional com a finalidade de avaliar os mecanismos moleculares das vias de reparo da quebra da dupla hélice de DNA, mecanismo considerado fundamental para a manutenção da integridade do genoma celular (Khanna e Jackson, 2001), que



pode estar envolvido na promoção da instabilidade genética e no desenvolvimento do carcinoma epidermóide de boca, principal forma de câncer bucal (Sawyer e Wood, 1992).

A partir de dois experimentos distintos, procurou-se avaliar a capacidade de as células provenientes de indivíduos portadores de carcinoma epidermóide de boca repararem a quebra da dupla hélice de DNA. No primeiro experimento, o ensaio do cometa, observou-se que os ceratinócitos, tanto de indivíduos com menos de 40 anos quanto de indivíduos com mais de 40 anos, tiveram capacidade de reparar o dano ao DNA em um determinado período de tempo. Estes resultados sugerem que as células epiteliais, independentemente do tipo de mecanismo de reparo utilizado, possuem capacidade de reparar de forma global as DSBs. No entanto, é importante investigar a possibilidade dessas células, devido ao acúmulo de dano ao DNA, terem ativado os mecanismos de apoptose.

Para uma análise mais específica dos mecanismos de reparo homólogo e não-homólogo das células epiteliais neoplásicas, utilizou-se um ensaio experimental com um plasmídeo. A utilização deste tipo de experimento com DNA plasmideal para verificar a eficiência de reparo da quebra da dupla fita de DNA tem várias vantagens, dentre elas a possibilidade da célula ser transfectada com seqüências recombinantes, aumentando a rapidez da análise, com resultados em até 48 horas. Isso faz com que essa técnica possa ser útil para a cultura de células primárias, incluindo células com capacidade limitada de crescer em cultura. Esse experimento permitiu uma análise funcional dos

mecanismos de reparo da quebra da dupla fita de DNA (DSB), sendo possível caracterizar melhor o defeito no reparo por DSB que ocorre em células obtidas de carcinomas espinocelulares de boca de pacientes com menos e com mais de 40 anos de idade.

No ensaio plasmideal, testou-se, primeiramente, uma linhagem de fibroblastos normais (Hs21Fs) e uma linhagem celular de fibroblastos com nocaute do gene FANCD2 (FANCD2<sup>-/-</sup>), um controle negativo e um positivo, respectivamente, para verificar a eficiência do experimento. Os resultados mostraram que a linhagem celular com o nocaute do gene FANCD2 apresentou uma redução significativa, principalmente no reparo por recombinação homóloga (HR). Isso pode ser explicado pelo fato de o gene FANCD2 ser um gene da família FA. Os genes dessa família estão diretamente relacionados às vias de reparo das DSBs, junto com os genes BRCA1, BRCA2 e RAD51, mais especificamente à via de reparo homólogo (Hussain, Witt *et al.*, 2003; Hussain, Wilson *et al.*, 2004; Kitao, Yamamoto *et al.*, 2006; O'driscoll e Jeggo, 2006; Yamamoto, Nihrane *et al.*, 2008).

Posteriormente, os resultados do experimento com o plasmídeo no grupo teste mostraram que em relação ao HR houve uma redução estatisticamente significativa da eficiência de recombinação nas células tumorais de indivíduos com mais de 40 anos e com menos de 40 anos quando comparados aos ceratinócitos normais. No entanto, houve uma maior redução no grupo de células de indivíduos com mais 40 anos, sendo este resultado bastante semelhante aos obtidos com a linhagem celular FANCD2<sup>-/-</sup>.

Em relação ao experimento com a utilização do plasmídeo pCMS-end, para avaliar a capacidade das células realizarem reparo das DSB por meio do NHEJ, os resultados mostraram uma redução estatisticamente significativa nesse tipo de reparo para ambos os grupos testados. No entanto, não houve diferença estatística entre o grupo de células de indivíduos com menos de 40 anos quando comparado com o grupo de células de indivíduos com mais de 40 anos. O resultado sugere que, nesse caso, apesar de alterada a via de reparo por junção não-homóloga, o defeito na via de recombinação homóloga contribui para a instabilidade gênica nas células neoplásicas de forma mais significativa, reforçando, assim, a necessidade de investigar os genes da família FA e o desenvolvimento do carcinoma epidermóide de boca, principalmente em indivíduos com mais de 40 anos. Em um estudo recente, (Hays, Zodrow *et al.*, 2008) observou que a fumaça condensada do cigarro é capaz de suprimir os níveis de expressão de FANCD2, induzindo instabilidade genética, deixando as células mais sensíveis aos agentes mutagênicos presentes no cigarro. Este achado, em associação com a redução no reparo por recombinação homóloga em indivíduos com mais de 40 anos encontrado neste estudo, confirma ainda mais o efeito cumulativo dos carcinógenos presentes no fumo e a importância de avaliar a expressão do gene FANCD2 em pacientes fumantes com carcinoma epidermóide de boca.

Avaliando os dados encontrados neste experimento em conjunto com o fato de que a perda da função de genes da família FA pode levar a instabilidade genômica, sugere-se que a desregulação na expressão gênica de genes da

família FA podem estar envolvidos na promoção de instabilidade genômica e subsequente desenvolvimento do carcinoma epidermóide de boca. Além disso, é importante destacar a relação da variável idade com o reparo de DNA por HR. Os resultados do experimento sugerem que o reparo por HR apresenta uma redução na sua eficácia à medida que a idade aumenta, visto que as células neoplásicas de indivíduos com mais de 40 anos mostraram uma menor capacidade de utilização destes mecanismos para o reparo das DSBs. Estes resultados são semelhantes aos resultados obtidos no estudo de Kang, Shin *et al.*, 2005, o qual demonstrou que a linhagem de ceratinócitos humanos normais (NHOK), quando envelhecida, apresenta uma maior frequência de erros na junção das extremidades de DNA. Acreditam que o envelhecimento celular possa resultar, em parte, do acúmulo de defeitos no reparo das DSBs e junções anormais de extremidades de DNA, levando a um genoma instável.

Os resultados deste estudo são semelhantes aos resultados obtidos por Shin, Kang *et al.*, 2006, que também constataram uma redução no reparo de DNA em cultura de células provenientes de carcinoma epidermóide de boca. Cheng, Eicher *et al.*, 1998 sugerem em seu estudo que indivíduos com baixa capacidade de reparo de DNA apresentam maior predisposição para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço, assim como Sturgis, Castillo *et al.*, 1999, que demonstraram a mesma suscetibilidade relacionada ao gene de reparo de DNA polimorfo XRCC1.

O principal alvo desse tipo de estudo são as terapias monoclonais. Algumas drogas, como o Cetuximab, inibidor do receptor do fator de crescimento

epidérmico (EGFR), já estão sendo aplicadas no tratamento do carcinoma epidermóide na região de cabeça e pescoço (Harding e Burtneess, 2005; Saba, Wang *et al.*, 2008). A identificação dos mecanismos moleculares envolvidos nas vias de reparo de DNA em carcinomas epidermóides de boca pode contribuir para o desenvolvimento de drogas específicas, capazes de auxiliar no tratamento do câncer de boca e, talvez, na redução da taxa de mortalidade por esta doença.

## CONCLUSÕES

- A eficiência de reparo de DNA, tanto por recombinação homóloga quanto por junção de extremidades não-homólogas, mostrou-se reduzida nas linhagens celulares de carcinomas epidermóides de boca de indivíduos com menos de 40 anos e com mais de 40 anos.

- Não houve diferença estatisticamente significativa quanto à eficiência de reparo por junção de extremidades não-homólogas nas linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca de indivíduos jovens quando comparado com indivíduos com mais de 40 anos.

- O reparo da quebra da dupla fita de DNA por meio da via de reparo por recombinação homóloga nas linhagens celulares de carcinomas epidermóides de boca de indivíduos com mais de 40 anos de idade apresentou maior redução estatisticamente significativa na sua eficiência do que as linhagens celulares de indivíduos com menos de 40 anos de idade.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Realizar um ensaio experimental com plasmídeo pCMS-end e pCMS-hom em células primárias de carcinomas espinocelulares de boca de indivíduos com menos de 40 anos de idade, bem como em indivíduos com mais de 40 anos de idade.

- Realizar um estudo imuno-histoquímico em material embebido em parafina, obtido de carcinomas espinocelulares de boca, utilizando marcadores para proteínas relacionadas às vias de reparo por recombinação homóloga e por junção de extremidades não-homólogas, como, por exemplo, RAD51, FancD2, Ku70, Ku80, e validação por RT-PCR.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AL RASHID, S. T. et al. Evidence for the direct binding of phosphorylated p53 to sites of DNA breaks in vivo. *Cancer Res*, v. 65, n. 23, p. 10810-21, Dec 1 2005.

ALLEN, C. et al. Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining. *Mol Cancer Res*, v. 1, n. 12, p. 913-20, Oct 2003.

ALTER, B. P. et al. Cancer in Fanconi anemia. *Blood*, v. 101, n. 5, p. 2072, Mar 1 2003.

BARROSO, E. et al. FANCD2 associated with sporadic breast cancer risk. *Carcinogenesis*, v. 27, n. 9, p. 1930-7, Sep 2006.

BAU, D. T. et al. Oral cancer and genetic polymorphism of DNA double strand break gene Ku70 in Taiwan. *Oral Oncol*, May 16 2008.

BOHRER, P. L. et al. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta Cytol*, v. 49, n. 3, p. 265-72, May-Jun 2005.

BORGES, F. T. et al. [Oral cancer epidemiology in a public laboratory in Mato Grosso State, Brazil]. *Cad Saude Publica*, v. 24, n. 9, p. 1977-82, Sep 2008.

BURMA, S. et al. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)*, v. 5, n. 9-10, p. 1042-8, Sep 8 2006.

BURZLAFF, J. B. et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology*, v. 18, n. 6, p. 367-75, Dec 2007.

CHENG, L. et al. Reduced DNA repair capacity in head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 7, n. 6, p. 465-8, Jun 1998.

CONLEY, J.; SADOYAMA, J. A. Squamous cell cancer of the buccal mucosa. A review of 90 cases. *Arch Otolaryngol*, v. 97, n. 4, p. 330-3, Apr 1973.

DAHLSTROM, K. R. et al. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study. *Head Neck*, v. 30, n. 1, p. 75-84, Jan 2008.



DU, X. *et al.* Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med*, v. 29, n. 2, p. 80-5, Feb 2000.

GERVASIO, O. L. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. *Braz Dent J*, v. 12, n. 1, p. 57-61, 2001.

GOLDSTEIN, D. P.; IRISH, J. C. Head and neck squamous cell carcinoma in the young patient. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, v. 13, n. 4, p. 207-11, Aug 2005.

GROMPE, M.; D'ANDREA, A. Fanconi anemia and DNA repair. *Hum Mol Genet*, v. 10, n. 20, p. 2253-9, Oct 1 2001.

HARDING, J.; BURTNES, B. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today (Barc)*, v. 41, n. 2, p. 107-27, Feb 2005.

HAYS, L. E. *et al.* Cigarette smoke induces genetic instability in airway epithelial cells by suppressing FANCD2 expression. *Br J Cancer*, v. 98, n. 10, p. 1653-61, May 20 2008.

HIROTA, S. K. *et al.* Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: a comparative analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 13, n. 4, p. E227-31, Apr 2008.

HOWLETT, N. G. Fanconi anemia: Fanconi anemia, breast and embryonal cancer risk revisited. *Eur J Hum Genet*, v. 15, n. 7, p. 715-7, Jul 2007.

HUSSAIN, S. *et al.* Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Hum Mol Genet*, v. 13, n. 12, p. 1241-8, Jun 15 2004.

\_\_\_\_\_. Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1. *Hum Mol Genet*, v. 12, n. 19, p. 2503-10, Oct 1 2003.

KANG, M. K. *et al.* Normal human oral keratinocytes demonstrate abnormal DNA end joining activity during replicative senescence. *Mech Ageing Dev*, v. 126, n. 4, p. 475-9, Apr 2005.

KAO, J. *et al.* Cellular response to DNA damage. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1066, p. 243-58, Dec 2005.

KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*, v. 27, n. 3, p. 247-54, Mar 2001.

KIM, M. M.; CALIFANO, J. A. Molecular pathology of head-and-neck cancer. *Int J Cancer*, v. 112, n. 4, p. 545-53, Nov 2004.

KIM, M. M. *et al.* Head and neck cancer cell lines exhibit differential mitochondrial repair deficiency in response to 4NQO. *Oral Oncol*, v. 42, n. 2, p. 201-7, Feb 2006.

KITAO, H. *et al.* Functional interplay between BRCA2/FancD1 and FancC in DNA repair. *J Biol Chem*, v. 281, n. 30, p. 21312-20, Jul 28 2006.

KOCH, W. M. *et al.* Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. *Laryngoscope*, v. 109, n. 10, p. 1544-51, Oct 1999.

LEVY-LAHAD, E. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 6, p. 3232-6, Mar 13 2001.

LINGEN, M. *et al.* Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers: clinical and biologic characteristics and implications for management. *Curr Opin Oncol*, v. 13, n. 3, p. 176-82, May 2001.

LISBY, M.; ROTHSTEIN, R. DNA damage checkpoint and repair centers. *Curr Opin Cell Biol*, v. 16, n. 3, p. 328-34, Jun 2004.

LLEWELLYN, C. D. *et al.* Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. *Oral Oncol*, v. 37, n. 5, p. 401-18, Jul 2001.

\_\_\_\_\_. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. *Oral Oncol*, v. 39, n. 2, p. 106-14, Feb 2003.

MACKENZIE, J. *et al.* Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? *Oral Oncol*, v. 36, n. 4, p. 387-9, Jul 2000.

MATSUDA, M. *et al.* Mutations in the RAD54 recombination gene in primary cancers. *Oncogene*, v. 18, n. 22, p. 3427-30, Jun 3 1999.

MOTOYAMA, N.; NAKA, K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev*, v. 14, n. 1, p. 11-6, Feb 2004.

NIEDERNHOFER, L. J. *et al.* Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. *Cell*, v. 123, n. 7, p. 1191-8, Dec 29 2005.

O'DRISCOLL, M.; JEGGO, P. A. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet*, v. 7, n. 1, p. 45-54, Jan 2006.

O'REGAN, E. M. *et al.* Distinct array comparative genomic hybridization profiles in oral squamous cell carcinoma occurring in young patients. *Head Neck*, v. 28, n. 4, p. 330-8, Apr 2006.

OGDEN, G. R.; WIGHT, A. J. Aetiology of oral cancer: alcohol. *Br J Oral Maxillofac Surg*, v. 36, n. 4, p. 247-51, Aug 1998.

OGDEN, G. R. *et al.* Quantitative oral exfoliative cytology. Effect of alcohol on normal buccal mucosa. *Anal Quant Cytol Histol*, v. 21, n. 2, p. 126-30, Apr 1999.

\_\_\_\_\_. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. *J Oral Pathol Med*, v. 28, n. 5, p. 216-20, May 1999.

PAIVA, R. L. *et al.* AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. *Anal Quant Cytol Histol*, v. 26, n. 3, p. 175-80, Jun 2004.

ROGERS, C. D. *et al.* The genetics of FANCC and FANCG in familial pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther*, v. 3, n. 2, p. 167-9, Feb 2004.

SABA, N. F. *et al.* Examining expression of folate receptor in squamous cell carcinoma of the head and neck as a target for a novel nanotherapeutic drug. *Head Neck*, Dec 15 2008.

SASAKI, T. *et al.* Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J Oral Pathol Med*, v. 34, n. 3, p. 129-33, Mar 2005.

SAWYER, D. R.; WOOD, N. K. Oral cancer. Etiology, recognition, and management. *Dent Clin North Am*, v. 36, n. 4, p. 919-44, Oct 1992.

SCULLY, C. *et al.* Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol*, v. 36, n. 4, p. 311-27, Jul 2000a.

\_\_\_\_\_. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. *Oral Oncol*, v. 36, n. 5, p. 404-13, Sep 2000b.

\_\_\_\_\_. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol*, v. 36, n. 3, p. 256-63, May 2000c.

SECRETAN, M. B. *et al.* Effect of Ku86 and DNA-PKcs deficiency on non-homologous end-joining and homologous recombination using a transient transfection assay. *Mutat Res*, v. 554, n. 1-2, p. 351-64, Oct 4 2004.

SHERIN, N. *et al.* Changing trends in oral cancer. *Indian J Cancer*, v. 45, n. 3, p. 93-6, Jul-Sep 2008.

SHIN, K. H. *et al.* Abnormal DNA end-joining activity in human head and neck cancer. *Int J Mol Med*, v. 17, n. 5, p. 917-24, May 2006.

SNYDER, E. R. *et al.* Variation in cisplatin sensitivity is not associated with Fanconi Anemia/BRCA pathway inactivation in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Lett*, v. 245, n. 1-2, p. 75-80, Jan 8 2007.

SONODA, E. *et al.* Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)*, v. 5, n. 9-10, p. 1021-9, Sep 8 2006.

STURGIS, E. M. *et al.* Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, v. 20, n. 11, p. 2125-9, Nov 1999.

SZETO, Y. T. *et al.* A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. *Mutat Res*, v. 578, n. 1-2, p. 371-81, Oct 15 2005.

THACKER, J. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett*, v. 219, n. 2, p. 125-35, Mar 10 2005.

THOMPSON, L. H.; SCHILD, D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res*, v. 509, n. 1-2, p. 49-78, Nov 30 2002.

THOMS, K. M. *et al.* Lessons learned from DNA repair defective syndromes. *Exp Dermatol*, v. 16, n. 6, p. 532-44, Jun 2007.

TREMBLAY, S. *et al.* Young patients with oral squamous cell carcinoma: study of the involvement of GSTP1 and deregulation of the Fanconi anemia genes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, v. 132, n. 9, p. 958-66, Sep 2006.

VAN DER HEIJDEN, M. S. *et al.* Functional defects in the fanconi anemia pathway in pancreatic cancer cells. *Am J Pathol*, v. 165, n. 2, p. 651-7, Aug 2004.

VAN GENT, D. C. *et al.* Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*, v. 2, n. 3, p. 196-206, Mar 2001.

VAN HOUTEN, V. M. *et al.* Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*, v. 93, n. 2, p. 232-5, Jul 15 2001.

WALKER, D. M. *et al.* The pathology of oral cancer. *Pathology*, v. 35, n. 5, p. 376-83, Oct 2003.

WANG, Y. *et al.* High frequency of microsatellite instability in young patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma: lack of involvement of the mismatch repair genes hMLH1 AND hMSH2. *Int J Cancer*, v. 93, n. 3, p. 353-60, Aug 1 2001.

WETERINGS, E.; VAN GENT, D. C. The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair (Amst)*, v. 3, n. 11, p. 1425-35, Nov 2 2004.

WOOD, R. D. *et al.* Human DNA repair genes. *Science*, v. 291, n. 5507, p. 1284-9, Feb 16 2001.

YAMAMOTO, K. *et al.* Upregulated ATM gene expression and activated DNA crosslink-induced damage response checkpoint in Fanconi anemia: implications for carcinogenesis. *Mol Med*, v. 14, n. 3-4, p. 167-74, Mar-Apr 2008.

ZHAO, M. *et al.* Downregulation of RAD17 in head and neck cancer. *Head Neck*, v. 30, n. 1, p. 35-42, Jan 2008.

ZHONG, Q. *et al.* BRCA1 facilitates microhomology-mediated end joining of DNA double strand breaks. *J Biol Chem*, v. 277, n. 32, p. 28641-7, Aug 9 2002.

## **CAPÍTULO 2**

### **2.1 ARTIGO CIENTÍFICO**

**DNA DOUBLE STRANDED BREAK REPAIR MECHANISMS IN  
SQUAMOUS CELL CARCINOMAS FROM YOUNG AND OLDER PATIENTS**

## **DNA DOUBLE STRANDED BREAK REPAIR MECHANISMS IN SQUAMOUS CELL CARCINOMAS FROM YOUNG AND OLDER PATIENTS**

P. L. Bohrer<sup>1</sup>, P. Pintor dos Reis<sup>2</sup>, J. Machado<sup>2,3</sup>, R. Bharadwaj<sup>2</sup>, R. Grénman<sup>4</sup>, P. Gullane<sup>5</sup>, J. Irish<sup>4</sup>, V. D. Silva<sup>1</sup>, S. Kamel-Reid<sup>2,3,5,6,7</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul; <sup>2</sup>Applied Molecular Oncology, Ontario Cancer Institute and University Health Network; <sup>3</sup>Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto; <sup>3</sup>Otorhinolaryngology/Head and Neck Surgery, and Biochemistry, Turku University Central Hospital, Turku, Finland; <sup>4</sup>Otolaryngology and Surgical Oncology, Princess Margaret Hospital, Toronto, ON, Canada; <sup>5</sup>Department of Pathology, Toronto General Hospital, University Health Network; <sup>6</sup>Department of Medical Biophysics and <sup>7</sup>Institute for Medical Sciences, University of Toronto, Toronto, ON, Canada.

**Keywords:** DNA double-strand Breaks, Non-homologous end-joining, Homologous recombination, oral cancer, squamous cell carcinoma, young patients.

## ABSTRACT

To gain a further insight into DNA repair mechanisms for oral squamous cell carcinoma (OSCC) in younger and older patients. Our main goal was to determine if young and older patients differ in their ability to repair double-stranded breaks (DSBs) by both Homologous Recombination (HR) and Non-homologous End-Joining (NHEJ). We have functionally assessed double-stranded breaks using UT-SCC cell lines established from young (<40 yr.) and older ( $\geq$ 40 yr) patients. We have examined global DNA damage using the Comet assay after cell exposure to ionizing radiation (IR). In the Comet assay, cells are embedded in agar, cell membranes are removed by lysis, the DNA is allowed to unwind, and electrophoresis is performed using an alkaline pH buffer. Loops of DNA around strand breaks are more relaxed, and they are pulled towards the anode, appearing to have a comet "tail". Undamaged DNA remains tightly wound in the nucleoid, or comet "head". Tail moments were used to measure the degree of DNA fragmentation. Cells were irradiated (20 Gy), and collected at different points in time. After electrophoresis, cells were stained with ethidium bromide, and observed under a fluorescent microscope. A total of 200 cells per sample were analyzed using the Komet image analysis system. HR and NHEJ analyses were performed using a plasmid-based repair assay, in order to measure the ability of the UT-SCC cell lines undergo DNA DSB repair. In order to assess global DNA DSB repair, three independent experiments were performed for all cell lines using the Comet assay, and no differences were found between lines



derived from younger and older patients when comparing irradiated vs. non-irradiated cells. We have also observed that both young and old patients' cell lines are able to repair DNA DSBs caused by ionizing radiation in about 24 hrs. To test whether there is a deficiency or compensation from one DSB mechanism, the analysis of homologous recombination and non-homologous end-joining was employed. We have observed that both young and old patients' UT-SCC cell lines showed deficient double-stranded break repair with both mechanisms. However homologous recombination efficiency was largely compromised in UT-SCC cell lines derived from older patients.

## **INTRODUCTION**

In 2008, the estimated number of new cancer cases diagnosed in men and women in Brazil is 466,730. Among them, the oral cancer is a malignancy with a high incidence in the country, and occupies fifth position among males and seventh among females. Analyzing the data gathered by the Brazilian National Cancer Institute (INCA), we can say that the incidence of cancer is increasing every year. The INCA estimated for 1999 that 7,950 new cases of oral cancer would be developed. In 2003 estimates indicated 10,635 new cases of oral cancer, and 2008 has further increased the estimate to 14,160 new cases (<http://www.inca.org.br/estimativas/2008/tbregiões/>).

This disease occurs most frequently among males over 40 years old [1,2], and the etiological factors most commonly related to the development of oral cancer are tobacco and alcohol [3-8]. In spite of all the factors mentioned above, the prevalence of oral cancer in younger patients (under 40 years old) is increasing [9]. However, in most cases these individuals do not smoke and do not ingest alcohol frequently [9-13]. Moreover, it is important to note that even when the main risk factors - smoking and drinking alcohol - are present, the time of exposure to these factors is significantly lower in individuals under 40 years old compared to individuals over 40 [11,12,14]. Regarding the anatomical site of higher prevalence in the development of oral squamous cell carcinoma in younger patients, most authors agree that the border of the tongue is the most common site [10,11,15].

HPV virus infection is another etiological factor to be considered in the development of oral squamous cell carcinoma in younger patients who do not smoke and drink alcoholic beverages. Some authors suggest that HPV-16, among the many genotypes of HPV, is an important factor related to the development of oropharynx cancer in young people [10,16,17]. However, the relation between HPV infection and the development of squamous cell carcinoma of the mouth is still very controversial in the literature [11]. The presence of subtypes of HPV infection that represent a high risk for the development of cancer, such as HPV16 and HPV11, is more related to the development of oropharynx tumors than oral cancer [16].

Some molecular changes that occur specifically in younger patients with oral squamous cell carcinoma have been identified. Higher microsatellite instability was observed in younger patients and non-smokers when compared to older patients [18]. Deletion in the CDKN2A (p16) tumor suppressor gene was also found in patients over 40 years old with typical characteristics for the development of oral cancer, and this was not found in young individuals and non-smokers with the same disease [13].

Thus, these significant changes in the genomic profile of this population suggest that there is a different molecular mechanism for oral carcinogenesis in younger non-smoking patients, which has not yet been clarified [13,14,16]. Due to this fact, it is necessary to investigate other factors that might be involved in the development of oral cancer in this young population.

Among the molecular mechanisms involved in the development of oral squamous cell carcinoma, defects in the process of DNA repair have been suggested to be associated with the development of oral cancer [19-21]. Defects in the repair of mitochondrial DNA induced by 4NQO (4-nitroquinolina-1-óxido) in head and neck squamous cell carcinoma were found [22]. Genetic changes related to DSB repair mechanisms can also contribute to the genetic vulnerability to risk factors in the development of oral cancer, as tobacco, causing damages to DNA and therefore leading to oral carcinogenesis [23].

The DNA repair is an important mechanism to the maintenance of the integrity of multicellular organisms. Double-stranded breaks (DSBs) are a kind of DNA lesion considered deleterious, especially if they are not repaired correctly, and they can generate chromosomal breakage, fragmentation and translocation [24,25]. The most likely destiny of any cell that is a victim of such havoc is death of the cell, but in the worst cases DSBs might trigger carcinogenesis by inactivation of the oncogenes. DSBs may be induced by exogenous causes such as ionizing radiation and mutagenic chemicals, but also by radicals that emerge from normal metabolism [26,27]. There are two distinct ways to repair double-stranded breaks (DSBs) in mammalian cells, and they complement each other: the non-homologous end-joining (NHEJ), which requires small homologous sequences between the end of the DNA and the DNA induced error, and the homologous recombination (HR), which uses homologous extensions and is generally free of errors [25,26,28].

Furthermore, some syndromes are related to defects in the DNA repair mechanism and consequently to the development of cancer. Fanconi's anemia patients have a high incidence of development of oral squamous cell carcinomas [29]. These patients present mutations in the FA family genes that encode proteins related to the DSBs repair mechanism [30-32]. Twelve genes have been identified in the FA family: *FRANCA*, *FANCC*, *FANCD1*, *FANCD2*, *FRANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCL*, *FANCM* [32]. Among these genes, at least six were related to the formation of FA complex protein, *FRANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FRANCE*, *FANCF* AND *FANCG*. *FANCD2* is not a part of the FA protein complex, and is not required for its formation and stability [30]. It has been suggested that FA genes function in both error prone DNA repair and homologous recombination, the latter through mono-ubiquitination of *FANCD2* and interaction with *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51* and *NBS1*. *FANCD2* mono-ubiquitination is required for the activation of these downstream targets. It is known that changes affecting the FA complex proteins are usually followed by the loss of *FANCD2* mono-ubiquitination and the loss of *FANCD2* nuclear foci [30]. The absence of *FANCD2* mono-ubiquitination can thus cause malfunction of the HR DNA-repair mechanism, contributing to tumor development [33-37].

Tremblay, Pintor Dos Reis et al., 2006, found a low expression of *FANCG*, and *GSTP1* was found in oral squamous cell carcinoma of younger patients [38]. Moreover, it was observed that condensed cigarette smoke may inhibit the translation of *FANCD2* mRNA into airway cells [39]. Therefore, the suppression of *FANCD2* makes cells more sensitive to clastogenic effects present in the

cigarette smoke, inducing a genetic instability. Thus, these cellular responses are able to select genetically unstable clones capable of resisting to apoptosis [38,39].

The analysis of those kinds of recombination that occur in younger patients with oral squamous cell carcinoma may elucidate some of the molecular mechanisms involved in the development of this neoplasia displayed in younger individuals that are not exposed to factors considered as high risk factors in the etiology of oral cancer [9,13]. To gain further insight into whether HR and/or NHEJ may be defective in young patients with early-onset OSCC, we assessed the defects in DNA repair in young and old patients with OSCC by evaluating the Homologous recombination (HR) and non-homologous end-joining (NHEJ), using an *in vitro* assay to examine the ability of nuclear protein extracts to rejoin linear plasmid DNA substrates.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **1. Assessment of DNA breakage rate by comet assay**

The comet assay is a technique in which cells are embedded in agar, cell membranes are removed by lysis, the DNA is allowed to unwind, and electrophoresis is performed arm idly or with a strong alkaline pH. Loops of DNA around strand breaks are more relaxed, and they are pulled towards the anode, appearing to have a comet "tail". Undamaged DNA remains tightly wound in the nucleoid, or comet "head" (SZETO et. all, 2005). This test allows us to analyze keratinocytes chromosomal breakage in young and old patients, and the analysis was performed according to the protocol described by SZETO et al. [40]. The comet assay was carried out in neutral conditions to allow the detection of main double-stranded DNA breaks. The cells were cultured in 6 weel plates, and were irradiated at a 20Gy dose. Then the cells were collected in different points of time: 0, 1, 2, 4 and 24h after irradiation, and kept in a temperature of -80°C. After all cells were collected the thawed samples were centrifuged at 3,000 rpm for 5 minutes at 4°C, the mincing media was removed leaving 100ul on the pellet and fractioned into the eppendorf's tubes. A 5ul cell suspension was mixed with melted LM agarose gel at 45°C. A 100ul mixture volume was spread onto precoated agarose slides, covered with a cover slip and kept over the cold Aluminum tray. After about 5-10 minutes the cover slip was slid, and the slides were kept in lyses solution for 2 days at 4°C. The slides were washed by immersion in prechilled TBE buffer and placed inside the electrophoresis

chamber. The slides were electrophoresed in TBE for 20 min at 32V, fixed with 95% ethanol and stained with a 2ug/ml Ethidium bromide solution, and observed with a fluorescent microscope. A total of 200 cells per sample were analyzed using an image analysis system, the Komet software. Tail moment was used in this study to measure the degree of DNA fragmentation.

## **2. Homologous recombination (HR) and non-homologous end-joining (NHEJ) assays**

The plasmid assays had many advantages, such as the ability of cells to be transiently transfected with recombination substrates, giving rise to a rapid screening assay with results within 48 hours. This makes the assay suitable for primary cell culture use, including cells with a limited ability to grow in a culture [41]. In our studies, we have used UT-SCC cell lines of younger and older patients from Finland. This analysis was performed according to a report recently described in the literature [41]. We have used a constructed plasmid assay to assess the ability of UT-SCC cell lines and normal Keratynocytes cell line to undergo DNA DSB repair, after transient transfection of two different plasmid constructs. The two plasmids were given from Secretan et al, 2004. Cells were cultured in media DMEM (Dulbecco's minimal essential media) containing 10% (v/v) fetal bovine serum, 2mM glutamine final concentration, 100 units/mL penicillin/streptomycin final concentration. They were then transfected with the lipid reagent Feugene (Roche®) according to the manufacturer's instructions.

Transfection efficiency was determined by the percentage of green fluorescent protein (GFP) positive cells. The absolute recombination efficiency



was calculated as the fraction of cells that have recombined over the total number of transfectants, i.e.  $YFP+GFP+/GFP+$ . In the NHEJ assay, the absolute recombination efficiency was then corrected by subtracting the NHEJ efficiency from the HR efficiency. At least three independent experiments were performed for both HR and NHEJ.

The efficiency of recombination by NHEJ and HR was evaluated using a *t*-test. Flow cytometry analysis was performed using the MOFLO cell sorter, Cytomatation, Colorado, US. Quantification of GFP+ cells will be performed using the CellQuest software. Flow cytometry experiments and analysis was performed as previously described by our group.

## RESULTS

### 1. Comet assay

The comet assay showed that cell lines from the groups of individuals younger and older than 40 years were capable of repairing global damage to DNA caused by ionizing radiation at the different study time points. The cells of the FANCD2<sup>-/-</sup> lineage were not able to repair DNA double-strand breaks completely, and, therefore, damage to DNA accumulated (Figure 1).

### 3. Plasmid assay to evaluate NHEJ and HR:

The plasmid assays were performed for simultaneous detection of EGFP and EYFP markers using a flow cytometer (MOFLO cell sorter, Cytomation, Colorado, US). Live cells were collected and analyzed in the flow cytometer, selected according to their light dispersion properties, and plotted onto bivariate histogram of green-fluorescence versus yellow fluorescence (Figures 2). The histogram was divided into four quadrants: double negative, double positive (EGFP+EYFP), only green (EGFP) and only yellow (EYFP). Nontransfected cells were used as controls to rule out autofluorescence (Figures 2A). Cells were also transfected with EGFP-only plasmid and EYFP-only plasmid to calibrate the flow cytometer lasers for each analysis. For positive controls, cells were transfected with circular plasmids, which correspond to 100% transfection efficiency (Figure 2B).

Tests were conducted to obtain an optimal amount of transfected DNA. Different DNA plasmid concentrations were tested to achieve the best transfection efficiency. DNA plasmid concentrations of 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10 µg were tested. The best transfection efficiency was obtained using a 5.0 µg concentration.

Different types of reagent used for transfection, amounts, and transfection duration were also tested. The reagent that showed the greatest transfection efficiency and that retained the highest number of live cells was FuGENE® (ROCHE) at a concentration of 5.0 µl for 48 h.

The rates of NHEJ and HR recombination efficiency in normal fibroblasts (Hs21Fs) cell lines were 97% and 95%. The recombination efficiency of the FANCD2<sup>-/-</sup> cell line was greatly affected, particularly for homologous recombination (HR) repair, and rates were 81.2% and 41.9% (Figure 3).

The results of assays showed that DNA double strand repair by nonhomologous end joining in normal keratinocytes cell lines and in oral squamous cell carcinoma cell lines from individuals younger and older than 40 years were 85.5%, 70.4% and 70.8%. A statistically significant reduction in recombination efficiency was found in the cell lines of individuals younger and older than 40 years when normal keratinocytes were compared ( $p=0.02$  and  $p=0.01$ ) (Figure 4).

The results of the comparison of homologous recombination (HR) efficiency of the cell lines from individuals younger and older than 40 years were 81.8%, 66.5% and 42%, respectively. A statistically significant reduction in

efficiency of homologous repair recombination (HR) efficiency was found in the cell lines of individuals younger and older than 40 years when normal keratinocytes were compared ( $p=0.05$  and  $p=0.001$ ) (Figure 5). The results of the comparison of homologous repair (HR) recombination efficiency in the groups of individuals with oral squamous cell carcinoma younger and older than 40 years revealed a statistically significant reduction in recombination efficiency among individuals older than 40 years ( $p=0.000$ ) (Figure 5).

## DISCUSSION

Oral cancer is highly prevalent in Brazil. Despite the large number of studies in the literature about this disease, few advances have been made in prevention, early diagnosis and treatment of oral cancer [22]. The analysis of data collected by the Brazilian National Cancer Institute (*Instituto Nacional do Cancer* – INCA) confirmed a significant increase in the incidence of this type of cancer between 1999 and 2008, from 7,950 new cases in 1999 to 14,160 in 2008. However, mortality rates decreased in recent years, according to INCA data (<http://www.inca.org.br/estimativas/2008/tbregiões/>).

Several studies described an increase in the number of new cases of young individuals with oral cancer [9,10,12-14,18]. Although still small, the number of young individuals diagnosed with oral squamous cell carcinoma in Brazil has increased gradually. Sasaki et al. (2005) found a 1.33:1 male-to-female ratio in this population, similar to that found for individuals older than 40 years. Similarly, Sherin et al. (2008) found a 3.5 times greater ratio of oral cancer incidence among men younger than 40 years. However, these findings, as well as data about traditional risk factors for the development of oral cancer (smoking and alcohol consumption), are controversial according to Llewellyn et al. (2003) because these risk factors are often not found in most cases [10].

Therefore, attention should be paid to changes in the epidemiological profile of individuals with oral cancer. Male sex, smoking and age greater than 40 years are not the only characteristics of risk groups for the development of this

type of cancer. Therefore, the development of oral squamous cell carcinoma in young individuals poses a challenge to understanding molecular mechanisms that may be associated to cancer development. These individuals develop this carcinoma at an early age after a shorter time of exposure to carcinogens than individuals older than 40 years. Genetic predisposition for the development of oral squamous cell carcinoma may be a possible explanation in the group of young individuals [11,12,14]. Studies in the literature report that molecular changes in cancer cells from individuals with oral cancer who are older or younger than 40 years, smokers or nonsmokers are different. A higher rate of heterozygosity was found in 3p, 4q and 11q13 in cases of oral squamous cell carcinoma among smokers than among nonsmokers; mutations in p53 were also prevalent in smokers with oral squamous cell carcinoma [42]. Micronuclei were more frequent and cell proliferation was greater in exfoliate cells of the oral mucosa of individuals exposed to smoking, alcohol, or both [3,8]. Microsatellite instability was more frequent among young nonsmoking individuals with oral squamous cell carcinoma [18]. The deletion of the tumor-suppressing gene CDKN2A (p16) occurs more frequently among smokers with oral cancer who are older than 40 years than among younger nonsmokers [13]. These findings suggest that young individuals with oral squamous cell carcinoma develop a cancer that is histologically similar but genetically different from the one that affects individuals older than 40 years.

However, the increase of tumor cell genetic instability, an important cause of tumor development, results from the accumulation of genetic mutations

caused by defects in the cell cycle checkpoints and DNA repair mechanisms [31]. Several syndromes, such as ataxia-telangiectasia (AT), Nijmegen breakage syndrome (NBS), Bloom syndrome and Fanconi anemia (FA), are associated with the predisposition to tumor development because of chromosomal instability caused by defects in several DNA repair genes, in cell cycle control and in apoptosis [43,44]. In cases of Fanconi anemia, the FA genes encode proteins involved in the repair of DNA double strand breaks [31]. Some authors found an association between changes in FA genes and the development of different types of tumors, such as pancreatic and breast cancers [45-47]. The hypothesis that FA genes are associated with the development of oral cancer is supported by the fact that these patients are at a high risk for the development of squamous cell carcinomas of the mouth. Alter (2003) suggested that the cancers most often developed by individuals with FA are squamous cell carcinomas of the mouth and cancers of the oropharynx, pharynx and parts of the esophagus. However, the interaction of these genes in the formation of the FA complex in the recombination repair pathway has not been fully described.

Therefore, studies should be conducted to establish an early diagnosis of these lesions, to explain molecular mechanisms and disease progression, and to develop new therapies to treat and reduce mortality among individuals with oral cancer. For that purpose, functional studies should be conducted to evaluate the molecular mechanism of DNA double strand break repair pathways, a fundamental mechanism of genome integrity maintenance [24,25] that may be

involved in the promotion of genetic instability and the development of oral squamous cell carcinoma, the most important form of oral cancer [2].

Two different assays were used to evaluate the capacity of cells from individuals with oral squamous cell carcinoma to repair DNA double strand breaks. The first trial, the comet assay, revealed that keratinocytes from individuals younger and older than 40 years were capable to repair DNA damage in a certain period of time. These results suggest that epithelial cells, regardless of the type of repair mechanism, have the capacity to repair DSBs globally. However, it should be investigated whether these cells activate apoptosis mechanisms due to cumulative DNA damage.

An experimental plasmid assay was used to evaluate homologous and nonhomologous mechanisms of repair of neoplastic epithelial cells. This plasmid DNA assay to assess the efficiency of DNA double strand break repair has several advantages, such as the possibility of transfecting cells with recombining sequences, which speeds up analysis in 48 hours. It is a useful technique for primary cell cultures, particularly for cells whose capacity to grow in culture is limited. This assay provided a functional analysis of the mechanisms of DNA double strand break (DSB) repair and a good description of defects in DSB repair that occurs in cells of squamous cell carcinoma of the mouth in patients younger and older than 40 years.

Initially, the plasmid assay was used to test a cell line of normal fibroblasts (Hs21Fs), a FANCD2<sup>-/-</sup> cell line, and a negative and a positive control to assess efficiency. Results showed that the cell line with the FANCD2 gene knockout had



a significant reduction in efficiency, particularly in homologous recombination (HR) repair. This may be explained by the fact that the FANCD2 gene belongs to the FA family. Genes of these family, together with the BRCA1, BRCA2 and RAD51 genes, are directly associated with DSB repair pathways and with homologous repair in particular [33-37,48].

Later, the results of the plasmid assay in the test group showed that there was a statistically significant reduction in HR in both study groups when compared with normal keratinocytes. However, there was a greater reduction in the group of cells from individuals older than 40 years, and this result was similar to those obtained for the FANCD2<sup>-/-</sup> cell line.

The assay that used the pCMS-end plasmid to evaluate cell capacity to repair DSB by means of NHEJ showed a statistically significant reduction of this type of repair in both study groups. However, there were no statistically significant differences between the groups of cells from individuals younger than 40 years when compared with the group of cells from individuals older than 40 years. This result suggests that, in this case, the defect in the homologous recombination pathway significantly contributed to genetic instability in these neoplastic cells, although the repair pathway changed due to nonhomologous end-joining. This finding underlines the need to investigate FA genes and the development of oral squamous cell carcinomas, particularly in individuals younger than 40 years. A recent study conducted by Hays et al. (2008) found that condensed cigarette smoke may suppress levels of FANCD2 expression and induce genetic instability, which makes these cells more sensitive to the

mutagenic agents found in cigarettes. This finding, together with the reduction in homologous recombination repair in individuals older than 40 years, further supports the hypothesis of a cumulative effect of carcinogens found in tobacco and the importance to evaluate the expression of the FANCD2 gene in smokers with oral squamous cell carcinoma.

Therefore, data found in this study, together with the loss of function of FA genes that may lead to genetic instability, suggest that the deregulation of genomic expression of FA genes may be associated with genomic instability and the subsequent development of oral squamous cell carcinoma. Moreover, the association of the age variable with HR DNA repair should be investigated. Our results suggest that the efficiency of HR repair is reduced as individuals grow older: the neoplastic cells of individuals older than 40 years were less capable to use DSB repair mechanisms. These results are in agreement with those reported by Kang et al. (2005), who found that senescing normal human oral keratinocytes (NHOK) had a greater frequency of DNA end joining errors. Therefore, cell aging may result in part from the accumulation of errors in DSB repair and abnormal DNA end joining, which leads to genomic instability.

The results of this study are in agreement with those reported by Shin et al. (2006), who also found a reduction in DNA repair in a culture of oral squamous cell carcinoma cells. Cheng et al. (1998) conducted a study with individuals with low DNA repair activity and found that they had a greater predisposition to the development of head and neck cancers; Sturgis et al. (1999)

found the same susceptibility in association with the polymorphous DNA repair gene XECC1.

The main purpose of this type of study is the development of monoclonal therapies. Some drugs, such as cetuximab, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor, have already been used in the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck [18,49,50]. The detection of molecular mechanisms involved in DNA repair pathways in oral squamous cell carcinomas may contribute to the development of specific drugs for the treatment of oral cancer and, maybe, the reduction of mortality rates associated with this disease.

**REFERENCES**

- [1] J. Conley and J.A. Sadoyama Squamous cell cancer of the buccal mucosa. A review of 90 cases, *Arch Otolaryngol* 97 (1973) 330-333.
- [2] D.R. Sawyer and N.K. Wood Oral cancer. Etiology, recognition, and management, *Dent Clin North Am* 36 (1992) 919-944.
- [3] P.L. Bohrer, M.S. Filho, R.L. Paiva, I.L. da Silva and P.V. Rados Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens, *Acta Cytol* 49 (2005) 265-272.
- [4] X. Du, C.A. Squier, M.J. Kremer and P.W. Wertz Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine, *J Oral Pathol Med* 29 (2000) 80-85.
- [5] G.R. Ogden and A.J. Wight Aetiology of oral cancer: alcohol, *Br J Oral Maxillofac Surg* 36 (1998) 247-251.
- [6] G.R. Ogden, A.J. Wight and J.G. Cowpe Quantitative oral exfoliative cytology. Effect of alcohol on normal buccal mucosa, *Anal Quant Cytol Histol* 21 (1999) 126-130.
- [7] G.R. Ogden, A.J. Wight and P. Rice Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry, *J Oral Pathol Med* 28 (1999) 216-220.
- [8] R.L. Paiva, M. Sant'Ana Filho, P.L. Bohrer, S. Lauxen Ida and P.V. Rados AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study, *Anal Quant Cytol Histol* 26 (2004) 175-180.

- [9] N. Sherin, T. Simi, P.M. Shameena and S. Sudha Changing trends in oral cancer, *Indian J Cancer* 45 (2008) 93-96.
- [10] K.R. Dahlstrom, J.A. Little, M.E. Zafereo, M. Lung, Q. Wei and E.M. Sturgis Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study, *Head Neck* 30 (2008) 75-84.
- [11] S.K. Hirota, F.P. Braga, S.S. Penha, N.N. Sugaya and D.A. Migliari Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: a comparative analysis, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 13 (2008) E227-231.
- [12] J. Mackenzie, K. Ah-See, N. Thakker, P. Sloan, A.G. Maran, J. Birch and G.J. Macfarlane Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology?, *Oral Oncol* 36 (2000) 387-389.
- [13] E.M. O'Regan, M.E. Toner, P.C. Smyth, S.P. Finn, C. Timon, S. Cahill, R. Flavin, J.J. O'Leary and O. Sheils Distinct array comparative genomic hybridization profiles in oral squamous cell carcinoma occurring in young patients, *Head Neck* 28 (2006) 330-338.
- [14] C.D. Llewellyn, N.W. Johnson and K.A. Warnakulasuriya Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review, *Oral Oncol* 37 (2001) 401-418.
- [15] T. Sasaki, D.R. Moles, Y. Imai and P.M. Speight Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age, *J Oral Pathol Med* 34 (2005) 129-133.

- [16] M. Lingen, E.M. Sturgis and M.S. Kies Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers: clinical and biologic characteristics and implications for management, *Curr Opin Oncol* 13 (2001) 176-182.
- [17] V.M. van Houten, P.J. Snijders, M.W. van den Brekel, J.A. Kummer, C.J. Meijer, B. van Leeuwen, F. Denkers, L.E. Smeele, G.B. Snow and R.H. Brakenhoff Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas, *Int J Cancer* 93 (2001) 232-235.
- [18] Y. Wang, J. Irish, C. MacMillan, D. Brown, Y. Xuan, C. Boyington, P. Gullane and S. Kamel-Reid High frequency of microsatellite instability in young patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma: lack of involvement of the mismatch repair genes hMLH1 AND hMSH2, *Int J Cancer* 93 (2001) 353-360.
- [19] C. Scully, J.K. Field and H. Tanzawa Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications, *Oral Oncol* 36 (2000) 404-413.
- [20] C. Scully, J.K. Field and H. Tanzawa Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations, *Oral Oncol* 36 (2000) 311-327.
- [21] C. Scully, J.K. Field and H. Tanzawa Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control, *Oral Oncol* 36 (2000) 256-263.

- [22] M.M. Kim and J.A. Califano Molecular pathology of head-and-neck cancer, *Int J Cancer* 112 (2004) 545-553.
- [23] D.T. Bau, H.C. Tseng, C.H. Wang, C.F. Chiu, C.H. Hua, C.N. Wu, S.Y. Liang, C.L. Wang, C.W. Tsai and M.H. Tsai Oral cancer and genetic polymorphism of DNA double strand break gene Ku70 in Taiwan, *Oral Oncol* (2008).
- [24] J. Kao, B.S. Rosenstein, S. Peters, M.T. Milano and S.J. Kron Cellular response to DNA damage, *Ann N Y Acad Sci* 1066 (2005) 243-258.
- [25] K.K. Khanna and S.P. Jackson DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection, *Nat Genet* 27 (2001) 247-254.
- [26] E. Weterings and D.C. van Gent The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis, *DNA Repair (Amst)* 3 (2004) 1425-1435.
- [27] E. Sonoda, H. Hohegger, A. Saberi, Y. Taniguchi and S. Takeda Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair, *DNA Repair (Amst)* 5 (2006) 1021-1029.
- [28] D.C. van Gent, J.H. Hoeijmakers and R. Kanaar Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection, *Nat Rev Genet* 2 (2001) 196-206.
- [29] E.R. Snyder, J.L. Ricker, Z. Chen and C.V. Waes Variation in cisplatin sensitivity is not associated with Fanconi Anemia/BRCA pathway inactivation in head and neck squamous cell carcinoma cell lines, *Cancer Lett* 245 (2007) 75-80.

- [30] M. Grompe and A. D'Andrea Fanconi anemia and DNA repair, *Hum Mol Genet* 10 (2001) 2253-2259.
- [31] N. Motoyama and K. Naka DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability, *Curr Opin Genet Dev* 14 (2004) 11-16.
- [32] L.J. Niedernhofer, A.S. Lalai and J.H. Hoeijmakers Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair, *Cell* 123 (2005) 1191-1198.
- [33] N.G. Howlett Fanconi anemia: Fanconi anemia, breast and embryonal cancer risk revisited, *Eur J Hum Genet* 15 (2007) 715-717.
- [34] S. Hussain, J.B. Wilson, A.L. Medhurst, J. Hejna, E. Witt, S. Ananth, A. Davies, J.Y. Masson, R. Moses, S.C. West, J.P. de Winter, A. Ashworth, N.J. Jones and C.G. Mathew Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways, *Hum Mol Genet* 13 (2004) 1241-1248.
- [35] S. Hussain, E. Witt, P.A. Huber, A.L. Medhurst, A. Ashworth and C.G. Mathew Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1, *Hum Mol Genet* 12 (2003) 2503-2510.
- [36] H. Kitao, K. Yamamoto, N. Matsushita, M. Ohzeki, M. Ishiai and M. Takata Functional interplay between BRCA2/FancD1 and FancC in DNA repair, *J Biol Chem* 281 (2006) 21312-21320.
- [37] K. Yamamoto, A. Nihrane, J. Aglipay, J. Sironi, S. Arkin, J.M. Lipton, T. Ouchi and J.M. Liu Upregulated ATM gene expression and activated DNA crosslink-induced damage response checkpoint in Fanconi anemia: implications for carcinogenesis, *Mol Med* 14 (2008) 167-174.



- [38] S. Tremblay, P. Pintor Dos Reis, G. Bradley, N.N. Galloni, B. Perez-Ordonez, J. Freeman, D. Brown, R. Gilbert, P. Gullane, J. Irish and S. Kamel-Reid Young patients with oral squamous cell carcinoma: study of the involvement of GSTP1 and deregulation of the Fanconi anemia genes, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132 (2006) 958-966.
- [39] L.E. Hays, D.M. Zodrow, J.E. Yates, M.E. Deffebach, D.B. Jacoby, S.B. Olson, J.F. Pankow and G.C. Bagby Cigarette smoke induces genetic instability in airway epithelial cells by suppressing FANCD2 expression, *Br J Cancer* 98 (2008) 1653-1661.
- [40] Y.T. Szeto, I.F. Benzie, A.R. Collins, S.W. Choi, C.Y. Cheng, C.M. Yow and M.M. Tse A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies, *Mutat Res* 578 (2005) 371-381.
- [41] M.B. Secretan, Z. Scuric, J. Oshima, A.J. Bishop, N.G. Howlett, D. Yau and R.H. Schiestl Effect of Ku86 and DNA-PKcs deficiency on non-homologous end-joining and homologous recombination using a transient transfection assay, *Mutat Res* 554 (2004) 351-364.
- [42] W.M. Koch, M. Lango, D. Sewell, M. Zahurak and D. Sidransky Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity, *Laryngoscope* 109 (1999) 1544-1551.
- [43] L.H. Thompson and D. Schild Recombinational DNA repair and human disease, *Mutat Res* 509 (2002) 49-78.

- [44] K.M. Thoms, C. Kuschal and S. Emmert Lessons learned from DNA repair defective syndromes, *Exp Dermatol* 16 (2007) 532-544.
- [45] E. Barroso, R.L. Milne, L.P. Fernandez, P. Zamora, J.I. Arias, J. Benitez and G. Ribas FANCD2 associated with sporadic breast cancer risk, *Carcinogenesis* 27 (2006) 1930-1937.
- [46] C.D. Rogers, M.S. van der Heijden, K. Brune, C.J. Yeo, R.H. Hruban, S.E. Kern and M. Goggins The genetics of FANCC and FANCG in familial pancreatic cancer, *Cancer Biol Ther* 3 (2004) 167-169.
- [47] M.S. van der Heijden, J.R. Brody, E. Gallmeier, S.C. Cunningham, D.A. Dezentje, D. Shen, R.H. Hruban and S.E. Kern Functional defects in the fanconi anemia pathway in pancreatic cancer cells, *Am J Pathol* 165 (2004) 651-657.
- [48] M. O'Driscoll and P.A. Jeggo The role of double-strand break repair - insights from human genetics, *Nat Rev Genet* 7 (2006) 45-54.
- [49] J. Harding and B. Burtneess Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chemeric human-murine monoclonal antibody, *Drugs Today (Barc)* 41 (2005) 107-127.
- [50] N.F. Saba, X. Wang, S. Muller, M. Tighiouart, K. Cho, S. Nie, Z.G. Chen and D.M. Shin Examining expression of folate receptor in squamous cell carcinoma of the head and neck as a target for a novel nanotherapeutic drug, *Head Neck* (2008).

Figure 1:

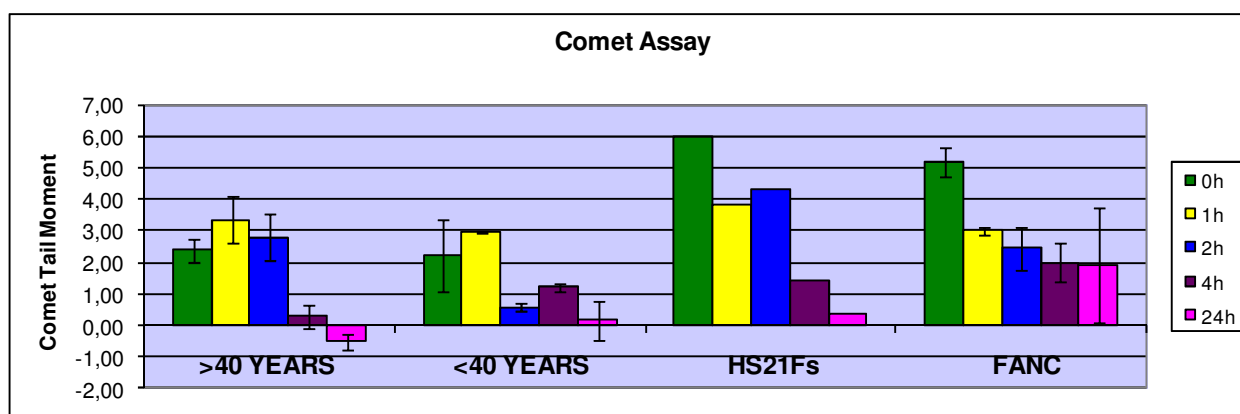


Figure 2:

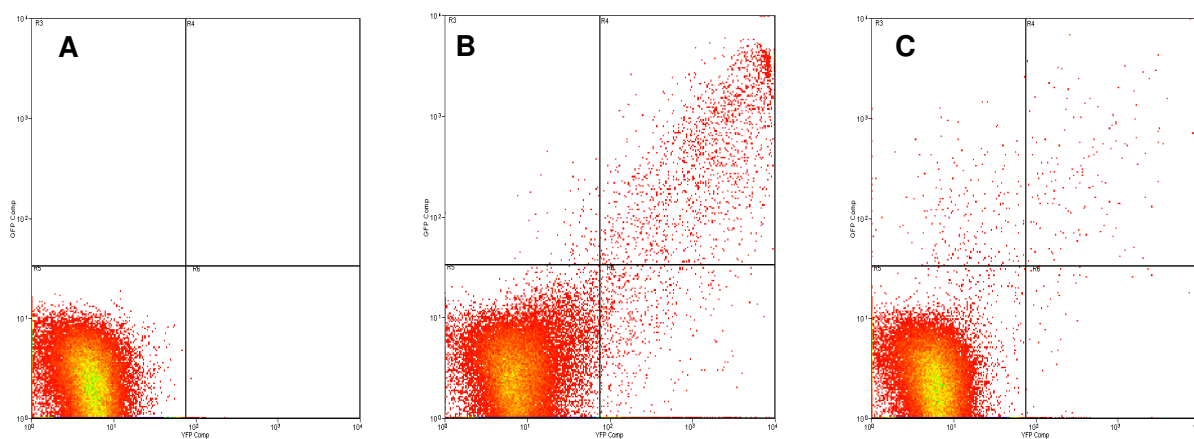


Figure 3:

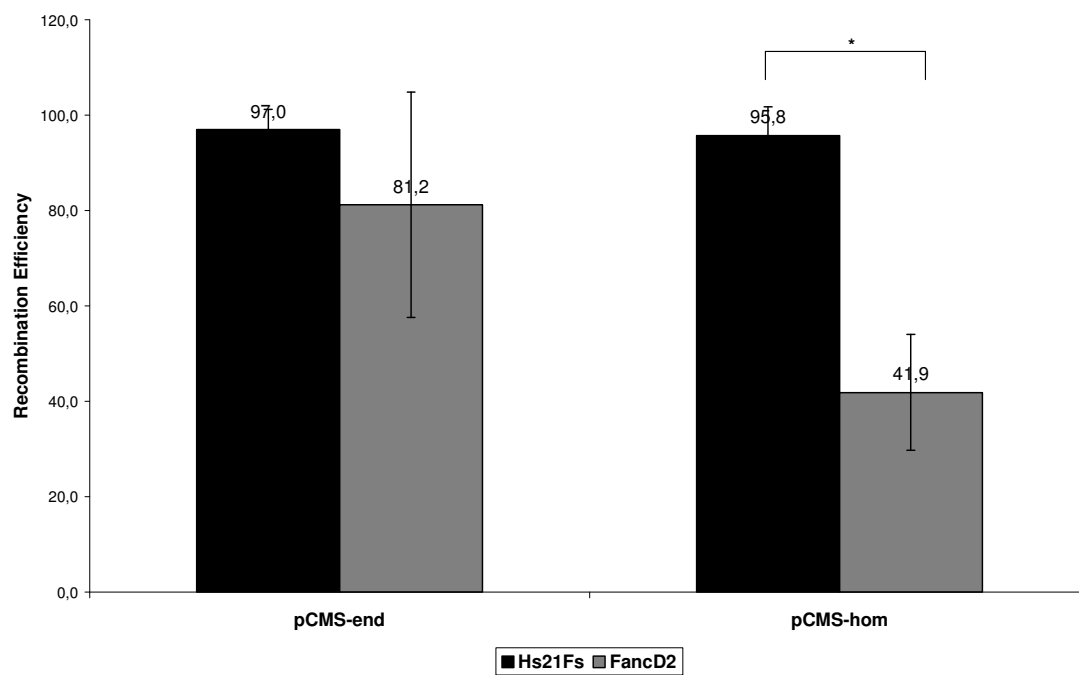


Figure 4:

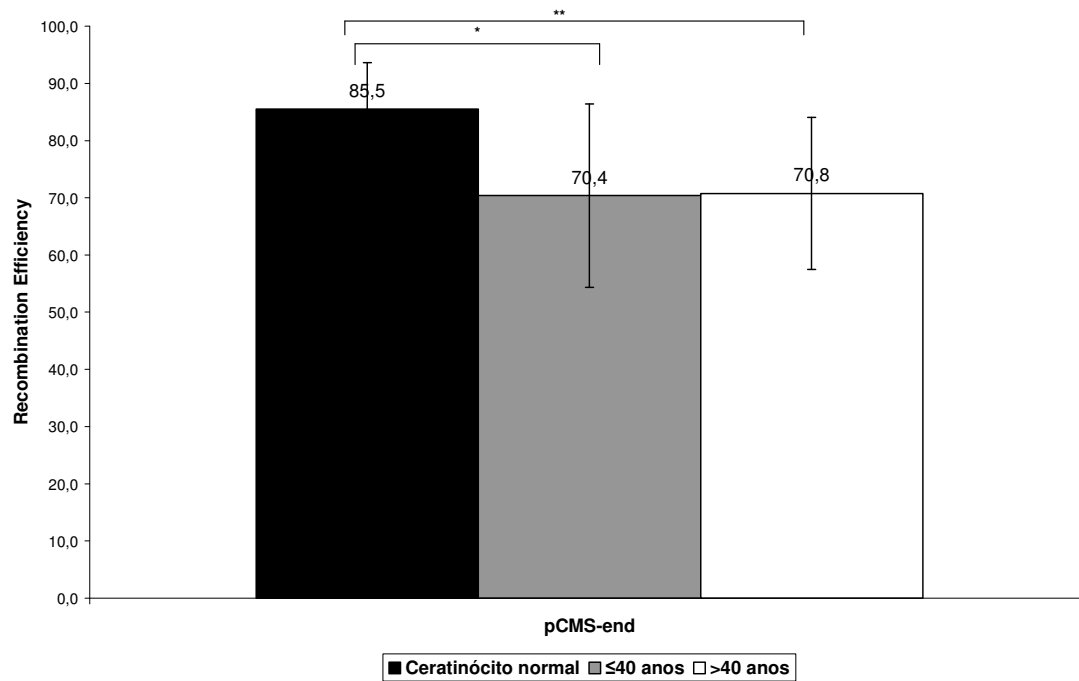
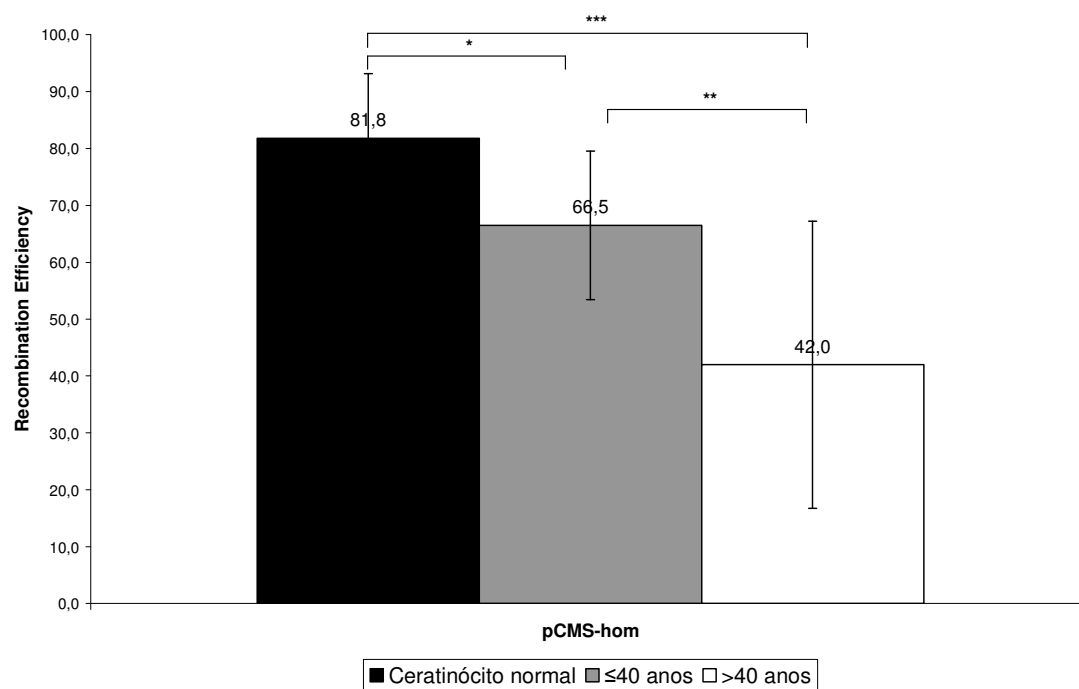


Figure 5:



### Figure Legends

**Figure 1:** Repair of DNA DSB after irradiation (20Gy) at time zero or intervals (1-24h). The bars represent the mean tail moment values  $\pm$  Standard Error of tail moment mean of three different cell lines.

**Figure 2:** Representative set of a FACS density produced following transient transfection with (A) control (non-transfected cells only), (B) circular pCMs-end, (C) linear pCMS-end.

**Figure 3:** Recombination efficiency during DSB repair in Hs21FS e FancD2 cells. Points designated with one star symbol significantly differ with  $P \leq 0,005$ .

**Figure 4:** Recombination efficiency during DSB repair in UT-SCC cell lines from young and older patients. Points designated with one star symbol significantly differ with  $P \leq 0,02$  and two stars symbols represent  $P \leq 0,01$ .

**Figure 5:** Recombination efficiency during DSB repair in UT-SCC cell lines from young and older patients. Points designated with one star symbol significantly differ with  $P \leq 0,05$  and two star symbols represent  $P \leq 0,0001$  and three star symbols represent  $P \leq 0,001$ .