



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA - FOUFU



MARCELO AUGUSTO GARCIA JUNIOR

**POLIMORFISMO (rs1610216) NO GENE DE METALOTIONEÍNA 2
(MT2) E O RISCO DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**

Uberlândia – MG

2017

MARCELO AUGUSTO GARCIA JUNIOR

**POLIMORFISMO (rs1610216) NO GENE DE METALOTIONEÍNA 2
(MT2) E O RISCO DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso.

Uberlândia – MG

2017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

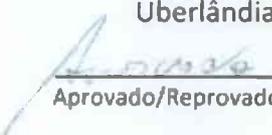
ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO (A) DISCENTE **Marcelo Augusto Garcia Júnior** DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

No dia **cinco de julho de 2017**, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado de Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pelo (a) aluno (a) **Marcelo Augusto Garcia Júnior**, COM O TÍTULO: **"POLIMORFISMO (rs 1610216) NO GENE DE METALOTIONEÍNA 2 (MT2) E O RISCO DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL"**. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Trabalhos de Conclusão de Curso desta Faculdade. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas da Graduação, legislação e regulamentação da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos e lavrada a presente ata, que após lida e achada conforme, foi assinada pela Banca Examinadora.

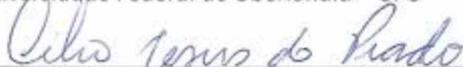
Uberlândia, 05 de julho de 2017



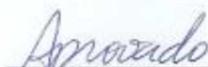
Prof. Dr. Fábio Franceschini Mitri Luiz
Universidade Federal de Uberlândia – UFU



Aprovado/Reprovado



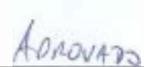
Prof. Dr. Célio Jesus do Prado
Universidade Federal de Uberlândia – UFU



Aprovado/Reprovado



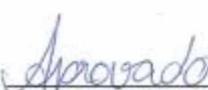
Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso
Universidade Federal de Uberlândia – UFU



Aprovado/Reprovado



Gabriela Campos Mesquita
Aluno de Doutorado – PPGO/UFU



Aprovado/Reprovado

DEDICATÓRIA

A todas as pessoas que convivem
diariamente com o câncer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais Marcelo e Vanusa, responsáveis por toda a minha educação e por sempre me apoiarem nas minhas escolhas. Se eu cheguei até esse momento, foi graças aos seus esforços em sempre me dar a melhor educação que eu pudesse ter.

Aos meus avós Carmem, Sebastião, Lenita e Dagobert; e aos meus padrinhos Denise, Biasi, Maria Teresa e Diego por sempre terem aquela palavra de incentivo e por servirem de exemplo de dedicação e esforço. Vocês me ajudaram a perceber que as vitórias vêm com o trabalho duro.

Aos meus amigos Paulo, Camila e Grazi por terem tornado esses 5 anos de graduação uma aventura muito mais do que divertida; e à Juliana e à Joelsa por terem me acolhido em um momento muito importante.

Ao Marcos, ao Lauro, à Ana Zampini, e à Duda por serem a família que eu fiz no colegial e que levarei para a vida toda. A nossa amizade é igual vinho, só melhora com o passar do tempo.

À Carolina Santana por não me deixar esquecer das minhas raízes.

Aos meus irmãos por simplesmente existirem na minha vida. Espero conseguir ser um exemplo para vocês.

Ao Matheus por ser o pontapé que me faz tomar riscos e correr atrás dos meus sonhos. Obrigado pelo apoio de sempre.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Vitorino, por ser, desde meu primeiro contato com a graduação, um exemplo de profissional e minha maior inspiração para seguir carreira acadêmica. Obrigado pela paciência e pela confiança.

Ao Prof. Dr. Adriano Loyola Mota Loyola por sempre reforçar a importância do debate no meio acadêmico. É a argumentação e o questionamento que geraram, geram e sempre gerarão o conhecimento.

Finalmente, gostaria de agradecer à FOUFU, seu corpo docente e técnico e aos colegas de curso pelo aprendizado.

*“Só se pode alcançar um grande êxito quando
nos mantemos fiéis a nós mesmos.”*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

O carcinoma epidermóide oral (CEO) é o câncer de acometimento mais frequente na cavidade oral, sendo que sua agressividade e capacidade metastática estão associadas à expressão de metalotioneínas (MTs). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) são a troca de um nucleotídeo de DNA por outro, sendo o tipo mais comum de variação genética. Dessa forma, objetivou-se estudar a relação do polimorfismo rs1610216 no gene MT2 com o risco de desenvolvimento do carcinoma epidermóide oral. Foi realizado um estudo tipo caso-controle, com o grupo caso composto por 28 pacientes diagnosticados com CEO acima de 35 anos, coletado sangue para análise desse polimorfismo. O DNA genômico foi extraído através de Kit de extração (Wizard® Genomic DNA Purification Kit – Promega), a quantificação foi realizada por espectrofotometria e a qualidade do DNA extraído foi avaliada através de eletroferese em gel de agarose. A análise de SNPs foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR – polymerase chain reaction), em tempo real, utilizando sonda pré-fabricada (TaqMan Pre-Designed SNP Genotyping Assays – Life Technologies). Os dados obtidos foram avaliados pelo teste estatístico qui-quadrado com 95% de confiança. Dos 69 pacientes avaliados, 28 pertenciam ao grupo caso e 41 ao grupo controle, sendo 9 homozigotos normais (AA), 5 heterozigotos com polimorfismo (AG) e 14 homozigotos com polimorfismo (GG) no grupo caso; e 5 AA, 12 AG e 24 GG no grupo controle. A análise dos dados obtidos foi estatisticamente significativa, sugerindo relação entre o polimorfismo em MT e risco de acometimento por CEO.

Palavras-chave: Carcinoma Epidermóide Oral; Câncer de Boca; Metalotioneína; Polimorfismos de Nucleotídeo Único.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma is the most frequent cancer in the oral cavity, and its aggressiveness and metastatic ability are associated with the expression of metallothioneins (MTs). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the exchange of one nucleotide of DNA for another, being the most common type of genetic variation. Thus, the objective of this study was to approach the relationship of the rs1610216 polymorphism in the MT2 gene with the risk of developing oral squamous cell carcinoma. A case-control study was conducted, with the case group composed by 28 patients diagnosed with oral squamous cell carcinoma over 35 years old, then blood was collected for analysis of this polymorphism. The genomic DNA was extracted through the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA), the quantification was performed by spectrophotometry and the quality of the DNA extracted was evaluated by electrophoresis in agarose gel. SNP analysis was performed by real-time polymerase chain reaction (PCR) using pre-designed SNP Genotyping Assays (Life Technologies). The data were evaluated by chi-square statistical test with 95% confidence. Of the 69 patients evaluated, 28 belonged to the case group and 41 to the control group, being 9 normal homozygotes (AA), 5 heterozygotes with polymorphism (AG) and 14 homozygotes with polymorphism (GG) in the case group; and 5 AA, 12 AG and 24 GG in the control group. The analysis of the data obtained was statistically significant, suggesting a relation between the polymorphism in TM and risk of involvement by CEO.

Keywords: Oral Squamous Cell Carcinoma; Mouth Cancer; Metallothionein; Single Nucleotide Polymorphisms.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
2.	OBJETIVOS	11
a.	OBJETIVOS GERAIS	11
b.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3.	PACIENTES E MÉTODO	12
4.	RESULTADOS	14
5.	DISCUSSÃO	16
6.	CONCLUSÃO	18
7.	REFERÊNCIAS	19

1. Introdução

O carcinoma epidermóide oral (CEO) é uma neoplasia maligna de origem epitelial que compreende cerca de 5% dos cânceres em homens e 2% nas mulheres em todo o mundo. Essa neoplasia corresponde a 90% de todos os cânceres de boca existentes (INCA, 2014). Geralmente, o diagnóstico do CEO é feito em fase mais avançada levando a uma alta taxa de mortalidade (Grimm, 2012). A estimativa mundial de CEO é de cerca de 500.000 novos casos por ano, tornando essa neoplasia a sexta mais freqüente no mundo, com algumas variações regionais de mortalidade e incidência (Gil, 2009). É a quinta mais freqüente em homens no Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2014).

Os fatores etiológicos e predisponentes para o desenvolvimento de CEO incluem principalmente tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas, mas outros fatores também estão associados, como deficiência nutricional e predisposição genética (Pires, 2013). O prognóstico da doença é variável e influenciado por vários fatores, como por exemplo o tamanho do tumor na época do diagnóstico e a presença de metástase cervical (Gil, 2009; Grimm, 2012). A evolução de cada caso de CEO relaciona-se também a fatores moleculares do tumor (Zavras, 2011; Grimm, 2012), e a compreensão dos papéis dessas moléculas pode ajudar a esclarecer os mecanismos da progressão tumoral.

A metalotioneína (MT) é uma proteína intracelular, rica em cisteína, que está envolvida na homeostase de cobre e zinco, e possui alta afinidade por íons metálicos. Ela atua em vários processos celulares, tais como proliferação celular e apoptose (morte programada da célula), e tem como função principal regular a homeostase de íons metálicos (Miles, 2000; Pedersen, 2009).

As MTs são codificadas por quatro subfamílias de genes, acoplados em sequência no cromossomo 16. São elas: MT1, MT2, MT3 e MT4. O gene MT1 em mamíferos apresenta 13 isoformas, sendo que 5 delas são inativas e são por isso chamados de “pseudogenes” (Moleirinho et al, 2011).

As MTs são encontradas no citosol e em algumas organelas celulares. Apresentam papel importante na regulação da permeabilidade da membrana mitocondrial interna. Na ocorrência de estresse oxidativo, a MT é capaz de atravessar os poros nucleares, sofrer oxidação e retornar ao citosol (Babula, 2012). Tais características podem ter impacto no processo de carcinogênese oral.

Apesar de muitos estudos terem avaliado o papel de MT em relação ao prognóstico de CEO, tendo especialmente mostrado comportamento mais agressivo da doença quando do aumento da expressão da proteína (Cardoso et al, 2002; Cherian et al 2003, Theocharis 2011),

são escassos os estudos sobre uma possível influência de MT no risco do aparecimento de CEO, e esse tipo de estudo pode ajudar a entender o processo de carcinogênese.

Polimorfismos genéticos são variações na sequência de DNA que afetam somente uma base e que apresentam frequência na população mundial maior que 1% (Wang et al, 1998). Quando ocorrem em regiões codificantes do genoma, os polimorfismos podem ser classificados como sinônimos ou não-sinônimos. Os polimorfismos sinônimos não alteram a sequência da proteína, já os não-sinônimos alteram a sequência da proteína e podem ser de dois tipos, *nonsense* quando codificam um códon de parada, e *missense* quando codificam um aminoácido diferente (Raudenska, 2013).

Em regiões não codificantes do genoma, também pode ocorrer polimorfismos de nucleotídeo único que podem afetar o processo de *splicing* (remoção dos íntrons e união dos éxons, depois de transcrito o RNA), alterar a degradação de mRNA ou modificar a ação dos fatores de transcrição (Raudenska, 2013).

São encontrados vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes MT, e a frequência desses polimorfismos varia de acordo com as populações (Moleirinho et al, 2011). Ainda hoje, é pouco explorado o significado dos polimorfismos nos genes de MT e o risco de câncer. Alguns estudos evidenciam que determinados polimorfismos, por exemplo, na região promotora do gene *MT2A*(rs28366003) afetam a expressão da proteína e podem aumentar o risco de câncer de próstata (Krzeslak et al, 2013; Forma et al, 2012) e mama (Krzeslak et al, 2014).

SNPs em diversos genes foram estudados em CEO. Os mais recentes mostram SNPs como marcador de susceptibilidade para a doença (Wang et al; 2013, Chou et al, 2014; Liu et al, 2014), SNPs relacionados com a sobrevida dos pacientes (Troy et al, 2013) ou de genótipos relacionados com menor risco de aparecimento de CEO (Hou et al, 2014).

O polimorfismo rs1610216 ocorre no gene MT2 e já foi pesquisado em relação à câncer de mama (Krzeslak et al, 2014), de próstata (Forma et al, 2012) e de laringe (Starska et al, 2014), porém não há estudos relacionando esse polimorfismo com CEO. Apenas o estudo de Zavras e colaboradores (2011) avaliou os polimorfismos de MT1 e CEO. O estudo desse polimorfismo rs1610216 em pacientes com CEO será útil para o entendimento da carcinogênese do CEO, para avaliar a relação do risco de desenvolver esse câncer e no futuro poderá melhorar os métodos de diagnóstico e tratamento dessa doença.

2. Objetivos

a. Objetivo geral

Estudar a relação do polimorfismo rs1610216 no gene MT2 com o risco de desenvolvimento do carcinoma epidermóide oral.

b. Objetivos específicos

- Determinar a frequência do polimorfismo rs1610216 no gene MT2 nos pacientes com carcinoma epidermóide oral e em controles.
- Avaliar se esse polimorfismo está associado ao risco elevado de desenvolver o carcinoma epidermóide oral.
- Avaliar se fatores de risco como consumo de álcool e uso de cigarro influenciam o desenvolvimento do carcinoma epidermóide oral e se tem relação com o polimorfismo citado.

3. Pacientes e método

Realizou-se um estudo tipo caso-controle com base hospitalar referente ao Hospital de Clínicas de Uberlândia, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Para compor o grupo caso, foram englobados pacientes do Hospital de Clínicas de Uberlândia com diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermóide oral, tratados ou não, com idade maior que 35 anos. Não foram incluídos pacientes que estivessem realizando tratamento na época para evitar um desconforto adicional.

Para compor o grupo controle, foram englobados pacientes que procuraram atendimento no Hospital Odontológico, sendo pareados por gênero e idade, de aproximadamente 5 anos, com os pacientes do grupo controle e que não apresentaram histórico de câncer ou de lesões orais potencialmente malignas, como por exemplo leucoplasia.

Os participantes do estudo foram entrevistados utilizando um questionário de informações demográficas (idade e gênero), dados sobre a saúde geral e hábitos como tabagismo e alcoolismo. As informações sobre o tumor (tamanho, possíveis metástases, grau histológico) foram adquiridas a partir dos registros hospitalares, sempre relativos ao momento do diagnóstico.

Além do questionário, foi feita a coleta de 3ml de sangue em tubos com anti-coagulante (EDTA) por meio de punção venosa padrão realizada por membros da equipe com treinamento adequado; o sangue foi mantido em refrigeração a 4°C.

Para extração de DNA foram utilizados 500µl de cada amostra sendo que o restante foi armazenado para suprir necessidade eventual de repetições, e descartado após o término do estudo.

O DNA genômico foi extraído através de Kit de extração (Wizard® Genomic DNA Purification Kit – Promega – USA), a quantificação foi realizada por espectrofotometria e a qualidade do DNA extraído foi determinada através de eletroferese em gel de agarose.

A análise de SNPs foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*), do tipo RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). A técnica consiste em “quebrar” o DNA em partes, através de enzimas de restrição e os fragmentos resultantes foram separados de acordo com o comprimento por gel de eletroforese. Dessa forma, variações na sequência do DNA resultaram em fragmentos de tamanhos diferentes.

Os dados obtidos foram avaliados pelo teste estatístico qui-quadrado. Ajustes para variáveis como idade, gênero, tabagismo e alcoolismo também foram realizados. Um modelo de regressão logística condicional foi realizado para combinar os riscos relativos, sendo os intervalos de confiança de 95% em ambos os grupos e pacientes.

4. Resultados

Foram coletadas amostras de DNA de 28 pacientes pertencentes ao grupo caso e de 41 pacientes do grupo controle. Os dados relacionados às características dos grupos caso e controle são apresentadas na Tabela 1. Do grupo caso, os extremos de idade foram 50 e 58 anos, enquanto no grupo controle foram de 30 e 74 anos. O tamanho médio dos tumores foi 3,72cm, sendo que a localização mais comum foi a língua e apenas 3 apresentaram metástase. A variação genotípica de casos e controles é apresentada na Tabela 2, Em ambos os grupos (casos e controles) predominaram indivíduos homozigotos para o alelo variante G (GG). Verificou-se que nos casos a proporção de indivíduos homozigotos para o alelo de referência A (AA) foi maior do que a verificada no grupo de controles.

Tabela 1 – Características gerais dos grupos caso e controle.

CARACTERÍSTICAS	SEXO		IDADE MÉDIA	FUMANTES	ETILISTAS	HISTÓRICO FAMILIAR DE CÂNCER
	M	F				
CASOS (n = 28)	19	9	55	7	18	6
CONTROLES (n = 41)	28	13	52	8	9	17

Tabela 2 – Variação genotípica relativa ao polimorfismo rs1610216 do gene MT1, entre casos de carcinoma epidermóide oral e controles.

GENÓTIPO	AA (n = 14)	AG (n = 17)	GG (n = 39)
CASOS (n = 28)	9	5	14
CONTROLES (n = 41)	5	12	24

A análise estatística, feita através do teste de qui-quadrado com 95% de confiança, revelou um valor $p = 0,0431$, enquanto o valor de do risco relativo (RR) foi de 0,3794 em um intervalo confiança entre 0,1421 e 1,013. A razão de chances (odds ratio), por sua vez, apresentou valor igual a 0,2932 em um intervalo de confiança entre 0,08599 e 0,9998. Para

esses cálculos, foram considerados apenas dois grupos: presença do polimorfismo (AG ou GG) e ausência (AA).

5. Discussão

O estudo de Babula e seus colaboradores (2012) demonstrou que as metalotioneínas, em mamíferos, possuem forte relação com a proliferação celular, fator significativo em neoplasias. Nesse aspecto, Cherian (2003) afirma que a atuação dessa família de proteínas protege as células humanas da apoptose evitando o dano genético ao DNA e controlando o estresse oxidativo. Miles, em 2000, também aponta como funções das MTs a homeostase de metais e desintoxicação celular. Dos genes que codificam as 4 principais famílias de MTs presentes nos humanos, os genes MT1 e MT2 codificam proteínas ubíquas, enquanto MT3 e MT4 evoluíram para desempenhar papéis específicos no cérebro e epitélio, respectivamente, segundo Moleirinho (2011).

A presença de polimorfismos nos genes decodificadores dessa família de proteínas tem sido amplamente estudada por Krześlak (2014), que realizou dois estudos associando SNPs a diferentes tipos de tumores malignos. Seu primeiro estudo, publicado em 2013, provou que o SNP rs28366003 na família MT2A está ligado à maior incidência de câncer de próstata. Seu segundo estudo, divulgado em 2014, provou relação significativa entre o mesmo SNP e câncer de mama. Os dados obtidos por Starska (2014) também suportam essa evidência, uma vez que apontam a variabilidade genética presente em MT2A como fator etiológico para câncer na laringe.

A utilização de MTs como marcadores para presença de diversas doenças é apontado por Raudenska (2014). Esse uso também é corroborado por Liu e seus colaboradores, em 2014, uma vez que associaram o polimorfismo rs4880 ao processo de desenvolvimento tumoral do CEO, enfatizando que o mesmo pode ser usado como marcador genético para susceptibilidade de acometimento. Em contrapartida, Troy (2013), havia demonstrado que determinados tipos de polimorfismos são fatores determinantes na sobrevida de pacientes acometidos com CEO na orofaringe.

Mais recentemente, Korpanty (2017) associa polimorfismos a adenocarcinoma esofágico e Dumpala associa o aumento da expressão de metalotioneínas ao prognóstico negativo de CEO. Por fim, o estudo mais relevante a respeito da relação de polimorfismos em metalotioneínas e CEC, indica que os indivíduos com os genótipos de MT-1 rs11076161 AA, rs964372 CC, e rs7191779 GC podem sofrer uma proteção significativa contra CEO.

O polimorfismo rs1610216 foi estudado por Starska (2015) e sua correlação com câncer de mama foi descartada, bem como sua relação com papiloma sinonasal invertido também foi considerada inexpressiva (Starska, 2014). É um polimorfismo missense

codificante, ou seja, sua presença não gera um códon de parada, resultando apenas na substituição de um aminoácido na cadeia de proteínas.

Os resultados da pesquisa desenvolvida vão de acordo com o estudo de Zavras (2011) e de Korpanty (2017), os quais apontam uma relação entre SNP e CEO, porém diferem dos estudos de Starska (2014 e 2015). Isso pode ser explicado devido aos diferentes fatores moleculares envolvidos no processo de carcinogênese do CEO e das outras neoplasias malignas estudadas por esses autores (Zavras, 2011; Grimm, 2012).

O valor obtido no teste estatístico de qui-quadrado comprova que a presença do polimorfismo está associada ao acometimento por CEO ($p < 0,05$), mesmo resultado obtido por Korpanty (2017), sendo que o valor de risco relativo inferior a 1 propõe que a ação do polimorfismo seja protetora, ao contrário do que propõe Starska (2014 e 2015), uma vez que este aponta a presença de SNPs como fator de risco.

Por fim, o resultado obtido no cálculo da razão de chances aponta efetividade de aproximadamente 70%. Dessa forma, para os pacientes acometidos por CEO, esses resultados apontam melhor prognóstico para aqueles com o polimorfismo estudado (rs1610216).

6. Conclusão

Os resultados obtidos sugerem a relação entre a presença do polimorfismo rs1610216 e o acometimento por CEO, sendo essa relação de fator de proteção. Entretanto, mais estudos são necessários, para verificar a efetividade real do fator de proteção sugerido.

O risco relativo entre o grupo caso e o grupo controle indica que a presença do polimorfismo atua como fator de proteção. Há necessidade de novos estudos utilizando espaço amostral maior em busca de maior fidedignidade dos resultados.

O presente estudo corrobora a relação estudada por Zavras (2011). Assim, é seguro dizer que, pelo do fator de proteção representado pelo polimorfismo, sua presença está associada ao prognóstico positivo.

7. Referências

1. Babula P, Masarik M, Adam V, Eckschlager T, et al. Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics*, 2012; (4): 739-750.
2. Cardoso SV, Barbosa HM, Candellori IM, Loyola AM, Aguiar MC. Prognostic impact of metallothionein on oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*, 2002; 441 (2) : 174-178.
3. Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothionein in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res* 2003; 533:201–209
4. Chou YE, Hsieh MJ, Hsin CH, Chiang WL, Lai YC, Lee YH, Huang SC, Yang SF, Lin CW. CD44 Gene Polymorphisms and Environmental Factors on Oral Cancer Susceptibility in Taiwan. *PLoS One*. 2014 Apr 3;9(4):e93692.
5. Forma E, Krzeslak A, Wilkosz J, Jozwiak P, Szymczyk A, Rozanski W, Brys M. Metallothionein 2^a genetic polymorphisms and risk of prostate cancer in a Polish population. *Cancer Genet*. 2012; 205 (9): 432-435.
6. Gil Z, Carlson DL, Boyle JO, et al. Lymph node density is a significant predictor of outcome in patients with oral cancer. *Cancer* 2009; 115: 5700–10.
7. Grimm M. Prognostic value of clinicopathological parameters and outcome in 484 patients with oral squamous cell carcinoma: microvascular invasion (V+) is an independent prognostic factor for OSCC. *Clin Transl Oncol*. 2012;14:870-80.
8. Hou YY, Lee JH, Chen HC, Yang CM, Huang SJ, Liou HH, Chi CC, Tsai KW, Ger LP. The Association of miR-499a Polymorphism and Oral Squamous Cell Carcinoma Progression. *Oral Dis*. 2014 Apr 2. Epub ahead of print.
9. INCA - Estimativa 2014: Incidência do Câncer no Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro, 2014.

10. Krześlak A, Forma E, Józwiak P, Szymczyk A, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Różański W, Bryś M. Metallothionein 2^a genetic polymorphisms and risk of ductal breast cancer. *Clin Exp Med*. 2014; 14 (1): 107-113.
11. Krześlak A, Forma E, Chwatko G, Józwiak P, Szymczyk A, Wilkosz J, Różański W, Bryś M. Effect of metallothionein 2A gene polymorphism on allele-specific gene expression and metal content in prostate cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2013; 268: 278–285.
12. Liu Y, Zha L, Li B, Zhang L, Yu T, Li L. Correlation between superoxide dismutase 1 and 2 polymorphisms and susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *Exp Ther Med*. 2014 Jan;7(1):171-178.
13. Miles, A.T.; Hawksworth, G.M.; Beattie, J.H.; Rodilla, V. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2000, 35,35-70.
14. Moleirinho, A.; Carneiro, J.; Matthiesen, R.; Silva, R.M.; Amorim, A.; Azevedo, L. Gains, losses and changes of function after gene duplication: Study of the metallothionein family. *PLoS One* 2011, 6, e18487.
15. Pedersen M, Larsen A, Stoltenberg M, Penkowa M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog Histochem Cytochem* 2009; 44:29–64
16. Pires FR, Ramos AB, Oliveira JB, Tavares AS, Luz OS, Santos TC. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. *J Appl Oral Sci*. 2013; 21 (5): 460 – 467.
17. Raudenska M, Gumulec J, Podlaha O, Sztalmachova M, Babula P, Eckschlager T, Adam V, Kizek R, Masarik M. Metallothionein polymorphisms in pathological processes. *Metallomics*. 2014; 6(1): 55-68.
18. Starska K, Krześlak A, Forma E, Olszewski J, Lewy-Trenda I, Osuch-Wójcikiewicz E, Bryś M. Genetic polymorphism of metallothionein 2A and risk of laryngeal cancer in a Polish population. *Med Oncol*. 2014; 31(7): 75.
19. Theocaris S, Klijanjenko J, Giaginis C, Rodriguez J, Jouffoy T, Girod A, Point D, Tsourouflis G, Sastre-Garau X. Metallothionein expression in mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with clinicopathological parameters and patient survival. *Histopathol*. 2011; 59(3): 514-525.

20. Troy JD, Weissfeld JL, Diergaarde B, Youk AO, Buch SC, Romkes M, Grandis JR. Polymorphisms in NAT2 and GSTP1 are associated with survival in oral and oropharyngeal cancer. *Cancer Epidemiol.* 2013 Aug;37(4):505-11
21. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R et al. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science* 1998; 280: 1077.
22. Wang JR, Gramling SJ, Goldstein DP, Cheng D, Chen D, Azad AK, Tse A, Hon H, Chen Z, Mirshams M, Simpson C, Huang SH, Marquez S, O'Sullivan B, Liu FF, Roberts H, Xu W, Brown DH, Gilbert RW, Gullane PJ, Irish JC, Reisman DN, Liu G. Association of two BRM promoter polymorphisms with head and neck squamous cell carcinoma risk. *Carcinogenesis.* 2013 May;34(5):1012-7.
23. Zavras, A. I., Yoon, A. J., Chen, M. K., Lin, C. W., Yang, S. F. Metallothionein-1 Genotypes in the Risk of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2011; 18:1478–1483.
24. Korpany GJ, Eng L, Qiu X, Olusesan Faluyi O, Renouf DJ, Cheng D, Patel D, Chen Z, Tse BC, Knox JJ, Dodbiba L, Teichman J, Azad AK, Wong R, Darling G, Reisman D, Cuffe S, Liu G, Xu W. Association of BRM promoter polymorphisms and esophageal adenocarcinoma outcome. *Oncotarget.* 2017 Apr 25;8(17):28093-28100.
25. Dumpala RK, Guttikonda VR. Immunoexpression of Metallothionein in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Maxillofac Oral Surg.* 2015 Dec;14(4):914-9.