



PUC GOIÁS



MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS NULOS NOS GENES *GSTT1* E
GSTM1 E SUAS ASSOCIAÇÕES AO TABAGISMO E AO CÂNCER
DE COLO UTERINO**

ANA LÚCIA MUNARO TACCA

**GOIÂNIA
2016**



MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS NULOS NOS GENES *GSTT1* E
GSTM1 E SUAS ASSOCIAÇÕES AO TABAGISMO E AO CÂNCER
DE COLO UTERINO**

ANA LÚCIA MUNARO TACCA

Orientadora: Prof. Dra. Vera Aparecida Saddi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

**GOIÂNIA
2016**

T115e Tacca, Ana Lúcia Munaro
Estudo de polimorfismos nulos nos genes GSTT1 e GSTM1
e suas associações ao tabagismo e ao câncer de colo
uterino [manuscrito] / Ana Lúcia Munaro Tacca.-- 2016.
68 f.; il.; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês.
Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade
Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação STRICTO
SENSU em Ciências Ambientais e Saúde, Goiânia, 2016

Inclui referências

1. Fumo - Vício. 2. Polimorfismo (Genética). I.Saddi,
Vera Aparecida. II.Pontifícia Universidade Católica
de Goiás. III. Título.

CDU: Ed. 2007 -- 618.146-006

DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 10 DE MARÇO DE 2016 E CONSIDERADA
aprovada PELA BANCA EXAMINADORA:

1) Vera Aparecida Saddi
Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi / PUC Goiás (Presidente)

2) Andrea Alves Ribeiro
Profa. Dra. Andrea Alves Ribeiro / UFG (Membro Externo)

3) Antônio Márcio Teodoro Cordeiro Silva
Prof. Dr. Antônio Márcio Teodoro Cordeiro Silva / PUC Goiás (Membro)

4) Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa
Prof. Dr. Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa / PUC Goiás (Suplente)

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, Adriano Hohl, que me deu forças e me proporcionou a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois a Ele devo a oportunidade de melhorar a cada dia, de superar as adversidades, de alcançar objetivos, de evoluir um pouquinho todos os dias. Agradeço a Ele pela proteção, pela saúde e pela realização de um sonho.

Agradeço ao meu marido Adriano Hohl pela compreensão, amor e companheirismo durante toda a jornada.

Agradeço aos meus pais por estarem sempre ao meu lado em todas as escolhas da minha vida. Mesmo de longe, sei que estão sempre enviando vibrações positivas que me dão força.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Vera Aparecida Saddi, por me acolher e me ensinar tanto que não seria capaz de medir. Sempre conto às pessoas que conheço o quanto tive sorte em encontrar uma professora com tanto a ensinar.

Agradeço às amigas que fiz no mestrado: Ana Karolina Lopes, Jodie Amaral Sodário e Nathalia Nogueira Amaral. Juntas, formamos um quarteto fantástico! Um verdadeiro trabalho em equipe durante todo o desenrolar desses anos. O enriquecimento pessoal, afetivo e profissional não seria o mesmo sem vocês.

Agradeço ao secretário do Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia do Hospital Araújo Jorge, Ricardo Silva, sempre tão solícito. Sua ajuda foi valiosa em diversos momentos da pesquisa.

Agradeço à equipe do Setor de Anatomia Patológica por disponibilizar livros de registros, laudos e blocos de amostras utilizadas nesse trabalho. Agradeço também à equipe do Setor de Arquivo Médico, que tão prontamente disponibilizou os prontuários necessários para coleta dos dados necessários.

Agradeço à aluna de iniciação científica, Jéssica Enocêncio, pela ajuda prestada nas extrações de DNA e em todos os outros procedimentos laboratoriais. A convivência com uma aluna tão dedicada, simples e correta me faz ter certeza do futuro brilhante que a espera.

Agradeço à biomédica Hellen Cintra de Paula pelos ensinamentos e auxílio durante a prática laboratorial.

Agradeço a ajuda e aos ensinamentos da Jéssica Cáceres Martins nas práticas laboratoriais. Sua paciência e disponibilidade em ajudar são admiráveis.

Agradeço ao amigo Dr. César Vilanova-Costa pelos ensinamentos. Sempre brilhante em suas explicações. As tardes no laboratório são muito agradáveis com sua presença.

Agradeço às farmacêuticas Keila Patrícia Almeida de Carvalho e Kelly Segatti pelo auxílio todas as vezes que precisei.

Agradeço à biomédica Thais Aparecida Gomes Almeida que por tantos dias me ajudou com as PCRs.

Agradeço à técnica do Laboratório de Diversidade Genética da PUC GO, Ana Paula Vilela Machado Maia, por toda a compreensão e auxílio durante os dias que passei no laboratório. Sempre pronta a ajudar, é explícito seu carinho pelo seu trabalho.

Agradeço à toda equipe do Laboratório Clínico da PUC GO, onde realizei as coletas do grupo controle.

Enfim, agradeço a todos que participaram da construção do aprendizado, que auxiliaram em cada pequeno detalhe deste estudo.

RESUMO

O principal fator de risco para o câncer do colo uterino é a infecção pelo Papilomavírus humano (HPV), porém, sabe-se que outros fatores são necessários para o desenvolvimento do câncer. Dentre os fatores estudados, destacam-se o tabagismo e os fatores de suscetibilidade genética. As enzimas denominadas Glutathionas-S-Transferase (GST) são responsáveis pela metabolização dos carcinógenos do tabaco e os genes que codificam essas enzimas são altamente polimórficos. O principal objetivo deste estudo foi comparar as frequências dos polimorfismos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* em mulheres com câncer de colo uterino e em mulheres sem história de câncer, bem como as possíveis associações entre os polimorfismos genéticos, o tabagismo e o prognóstico dos tumores de colo uterino. A casuística consistiu de 135 pacientes com câncer e 100 participantes sem câncer. Os genótipos foram investigados por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados foram comparados pelo teste Chi-quadrado ou teste exato de Fisher e as análises de sobrevida pelos testes de Kaplan-Meier e comparadas por Log-rank. Entre os casos, a frequência do polimorfismo nulo para o gene *GSTM1* foi de 22,2% e para o gene *GSTT1* foi de 48,5%. Entre os controles, a frequência do polimorfismo nulo no gene *GSTM1* foi de 45,0%, enquanto para o gene *GSTT1* nulo foi de 56,0%. Importante relação entre o hábito tabagista e o câncer do colo uterino foi observada ($p=0,0062$; $OR=2,16$). Os resultados demonstraram que os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* não conferiram risco para o câncer cervical na população estudada. Além disso, o genótipo *GSTM1* presente esteve associado significativamente ao melhor prognóstico dos tumores, diminuindo o risco de metástases ($p=0,014$; $OR=3,45$). A sobrevida global foi de 78,5% e, quando estratificada pelos genótipos estudados, foi superior em pacientes com genótipos positivos, indicando maior risco de óbito na presença de dupla nulidade ($p=0,031$; $RR=2,458$).

Palavras-Chave: Câncer do colo uterino, *GSTM1*, *GSTT1*, tabagismo.

ABSTRACT

The main risk factor for cervical cancer is infection with the Human Papillomavirus (HPV). However, other risk factors are required for the development of cervical cancer, among them, smoking and genetic susceptibility have been proven relevant. Enzymes named Glutathione-S-Transferase (GST) are responsible for the metabolism of tobacco carcinogens and the genes encoding these enzymes are highly polymorphic. The objective of this study was to compare the frequencies of GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms in women with cervical cancer and in women with no history of cancer, as well as the possible associations between such genetic polymorphisms, cigarette smoking and the prognosis of cervical cancer. The series consisted of 135 patients with cervical cancer and 100 participants without cancer. Genotypes were investigated by means of polymerase chain reaction (PCR). The results were compared using the Chi-square test or Fisher's exact test, and survival analysis by Kaplan-Meier tests and Log-rank. Among the cases, the frequency for GSTM1 gene null polymorphism was 22,2%, and for the GSTT1 gene, it was 48,5%. Among the controls, the frequency of the GSTM1 gene null polymorphism was 45.0%, while for the GSTT1 gene null polymorphism it was 56.0%. Important association was demonstrated between smoking and cervical cancer ($p= 0.0062$; OR = 2.16). The results showed that the GSTM1 and GSTT1 null genotypes were not associated with cervical cancer in the population studied. In addition, GSTM1 genotype was significantly associated to a better prognosis of the tumors, decreasing the risk of metastasis ($p= 0.014$; OR = 3.45). The overall survival rate for the group was 78.5% and, when stratified by genotypes studied, survival was higher in patients with positive genotypes, indicating a higher risk of death in the presence of dual nullity ($p= 0.031$; RR = 2.458).

Keywords: Cervical cancer, GSTM1, GSTT1, smoking.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1. Epidemiologia do Câncer de Colo Uterino.....	17
2.2. O Trato Genital Feminino	18
2.3. História Natural do Câncer de Colo Uterino	20
2.4. Fatores de Risco para o Câncer de Colo Uterino	22
2.4.1 Infecção pelo Papilomavírus humano (HPV).....	22
2.4.2 Outros Agentes Infecciosos.....	23
2.4.3. Multiplicidade de Parceiros Sexuais e Início Precoce da Atividade Sexual.....	23
2.4.4. Tabagismo.....	24
2.5. Ciclo Celular e Genética do Câncer de Colo Uterino	26
2.6. Classificação Histológica dos Tumores de Colo Uterino	28
2.6.1. Carcinoma Microinvasor	28
2.6.2. Carcinoma Escamoso Invasor.....	28
2.6.3. Adenocarcinoma	29
2.7. Fatores Prognósticos no Câncer de Colo Uterino	29
2.8. Polimorfismos Genéticos em <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> e o Câncer de Colo Uterino	32
3. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivo Primário	37
3.2. Objetivos Secundários.....	37

4. METODOLOGIA.....	38
4.1. Aspectos Éticos.....	38
4.2. Seleção de Sujeitos, Coleta de Amostras Biológicas e Dados Clínicopatológicos.....	38
4.3. Análise Molecular	40
4.3.1. Extração do DNA das Amostras Tumorais	41
4.3.2. Extração do DNA das Amostras Sanguíneas.....	41
4.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	41
4.4. Análise dos Dados	43
5. RESULTADOS	44
5.1. Características Sociodemográficas e Clinicopatológicas das Pacientes com Câncer de Colo Uterino	44
5.2. Características das Participantes do Grupo Controle.....	48
5.3. Frequência dos Polimorfismos Nulos	49
5.4. Frequência dos Polimorfismos Nulos em GSTM1 e GSTT1 e o Tabagismo.....	49
5.5. Frequência dos Polimorfismos Nulos e do Tabagismo nos Fatores Prognósticos e Mortalidade	50
5.6. Sobrevida	53
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS	68

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACCG - Associação de Combate ao Câncer em Goiás

AIDS - Acquired immunodeficiency syndrome

BAX - Bcl2 associated protein X

DNA - Ácido Desoxiribonucléico

E6 - Oncoproteína viral precoce 6

E7 - Oncoproteína viral precoce 7

E2F - Fator de Transcrição

Fase G1 - Fase pré-síntese de DNA do ciclo celular

Fase S - Fase de síntese de DNA do ciclo celular

FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

GADD45 - Growth arrest and DNA damage

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GST - Glutathione - S - Transferase

GSTT1 - Glutathione - S - Transferase T1

GSTM1 - Glutathione - S - Transferase M1

HAJ - Hospital Araújo Jorge

HIV - Human immunodeficiency vírus

HPV - Papilomavírus Humano

HSIL - Lesão intraepitelial de alto grau

HSV - Herpes Simplex vírus

HTA - Histerectomia

IARC - Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

INCA - Instituto Nacional do Câncer

L1 - Oncoproteína viral tardia 1

L2 - Oncoproteína viral tardia 2

LSIL - Lesão intraepitelial de baixo grau

NIC - Neoplasia intraepitelial cervical

p16 - Proteína 16

p53 - Proteína 53

pb - Pares de bases

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

pRb - Proteína retinoblastoma

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Fotomicrografia do epitélio endocervical do colo uterino	19
FIGURA 2. Fotomicrografia mostrando a zona de transformação do epitélio escamoso e epitélio glandular do colo uterino.....	19
FIGURA 3. (A) Lesão Intraepitelial de Baixo Grau – NIC I; (B) Lesão Intraepitelial de Alto Grau – NIC III.....	21
FIGURA 4. Estrutura química das nitrosaminas presentes no tabaco	25
FIGURA 5. Estrutura química dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes no tabaco.....	25
FIGURA 6. Vias de metabolização de xenobióticos.....	33
FIGURA 7. Fluxograma com levantamento e seleção dos casos	38
FIGURA 8. Gel de poliacrilamida a 8% exibindo controle padrão de 50 pb (ladder), controle positivo, controle negativo, amostras negativas e positivas...42	
FIGURA 9. Sobrevida global das pacientes com câncer de colo uterino	52
FIGURA 10. Sobrevida ajustada ao genótipo <i>GSTM1</i>	52
FIGURA 11. Sobrevida ajustada ao genótipo <i>GSTT1</i>	53
FIGURA 12. Sobrevida ajustada ao genótipo duplo nulo.....	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação TNM/FIGO para o câncer de colo uterino	31
TABELA 2. Família das Glutathionas S Transferase. Adaptado de Cassarett e Doulls, 2008	32
TABELA 3. Trabalhos publicados entre 2005 e 2015 que avaliaram a associação entre os polimorfismos nulos de <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> e suas associações ao câncer de colo uterino	34
TABELA 4. Número de participantes do estudo e intervenções realizadas.....	39
TABELA 5. Protocolo de PCR para amplificação de um fragmento dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	41
TABELA 6. Protocolo de ciclagem.....	41
TABELA 7. Análise descritiva das características sociodemográficas do grupo de pacientes com câncer	44
TABELA 8 (A). Análise descritiva dos tratamentos administrados às pacientes com câncer de colo uterino	45
TABELA 8 (B). Análise descritiva dos fatores prognósticos do grupo de pacientes com câncer de colo uterino	46
TABELA 9. Características das participantes do grupo controle	47
TABELA 10. Polimorfismos nulos nos grupos de casos e controles	48
TABELA 11. Grupos de casos e controles subdivididos em tabagistas e não tabagistas e suas respectivas frequências de polimorfismos nulos	49
TABELA 12. Frequências de polimorfismos nulos, fatores prognósticos e óbitos.....	50

TABELA 13. Frequência do hábito tabagista entre os grupos de casos e controles..... 51

TABELA 14. Frequência do hábito tabagista entre os grupos óbitos e vivos ... 51

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino é considerado um grave problema de saúde pública, sendo o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo e o sétimo tipo de câncer mais frequente na população em geral (Ayres *et al.*, 2010; INCA, 2014). Em 2012, o câncer cervical foi responsável por 265.000 óbitos no mundo e a grande maioria registrada nos países em desenvolvimento (INCA, 2014). O câncer de colo uterino apresenta grande potencial de prevenção e cura, desde que diagnosticado precocemente, mas ainda assim, no Brasil, estimam-se, para o ano de 2016, 16.340 novos casos (INCA, 2015).

O principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de colo uterino é a infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) (Waggoner, 2003). O HPV é necessário, mas não suficiente para a evolução da neoplasia. Assim, outros fatores de risco tornam-se importantes como o tipo viral, a persistência da infecção, fatores genéticos, estado imunológico e o tabagismo (Campaner *et al.*, 2007).

Fatores de suscetibilidade genética para o desenvolvimento do câncer de colo uterino vêm sendo estudados em diversas populações (Li *et al.*, 2013; Abbas *et al.*, 2014; Roszak *et al.*, 2014), e pouco se sabe sobre a interação entre os polimorfismos e os fatores de risco para este câncer, dentre eles o tabagismo (Roszak *et al.*, 2014).

As substâncias químicas produzidas pela queima do tabaco e absorvidas pelos pulmões podem ser encontradas no muco cervical de mulheres fumantes, expondo diretamente o DNA de células cervicais aos carcinógenos (Campaner *et al.*, 2007). O tabagismo foi relacionado como importante fator de risco para o câncer de colo uterino, relacionando o tempo e a intensidade do hábito de fumar com o desenvolvimento de lesões precursoras e com o carcinoma invasivo, estimando um

aumento em duas vezes no risco de neoplasia para mulheres tabagistas (Roura *et al.*, 2013).

O cigarro é constituído por várias substâncias carcinogênicas, como as nitrosaminas e as amins aromáticas que interagem com o material genético das células formando adutos de DNA, que por sua vez, favorecem o aparecimento de mutações que dirigem o processo de carcinogênese. As substâncias químicas do cigarro são metabolizadas por enzimas da família das Citocromos P450 e Glutathione-S-transferase (GSTT e GSTM). Os genes que codificam essas enzimas são altamente polimórficos e apresentam grande variabilidade de expressão e de atividade (Leme *et al.*, 2010).

A investigação dos fatores de risco para o câncer de colo uterino, como o tabagismo, e o conhecimento das diferenças genéticas associadas ao metabolismo e a maior suscetibilidade às substâncias químicas do tabaco são os principais objetivos deste estudo e certamente resultarão em contribuições significativas para a compreensão do processo de carcinogênese do colo uterino, permitindo medidas preventivas mais eficientes.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Epidemiologia do Câncer de Colo Uterino

O câncer de colo uterino é o quarto tipo de câncer mais frequente entre mulheres no mundo (INCA, 2014) e o sétimo na classificação geral (IARC, 2011). A grande maioria dos casos de câncer de colo uterino ocorre em regiões do mundo menos desenvolvidas como a África, América Central e Caribe. O contrário ocorre em países desenvolvidos como Austrália, Ásia Ocidental e Nova Zelândia (IARC, 2011).

As baixas taxas de incidência do câncer de colo uterino em países desenvolvidos são resultantes de programas efetivos de prevenção que contemplam vacinação, rastreamento e tratamento de lesões precursoras (Aggarwal, 2015). Em contrapartida, regiões menos desenvolvidas encontram dificuldades em oferecer programas de prevenção de boa qualidade, o que reflete nas altas taxas de mortalidade, como o exemplo da Índia, onde o câncer de colo uterino é responsável por 17% dos óbitos por câncer entre mulheres de 30 a 69 anos (Bobdey *et al.*, 2015).

De acordo com a última estimativa do INCA, o câncer de colo uterino é o terceiro na lista entre os tipos de câncer que acometem mulheres no Brasil, ficando atrás apenas do câncer de mama e do câncer de cólon e reto. São esperados para o biênio 2016/2017, 16.340 novos casos para o Brasil e destes, 1.560 são estimados para a região Centro-Oeste (INCA, 2015). No Brasil, as taxas de mortalidade estão estáveis, com maior redução nas capitais (Ayres *et al.*, 2010). No mundo, as taxas de mortalidade pelo câncer de colo uterino variam entre regiões, indo de menos de 2 por 100.000 mulheres na Ásia a 27,6 por 100.000 mulheres na África (INCA, 2014).

De modo geral, o câncer de colo uterino tem evolução lenta e surge a partir dos 30 anos, mas o pico de incidência ocorre entre os 50 e 60 anos (INCA, 2014). O tipo histológico predominante é o carcinoma de células escamosas (Coelho *et al.*, 2008), porém a incidência dos adenocarcinomas tem aumentado (Teke *et al.*, 2015).

2.2. O Trato Genital Feminino

O trato genital feminino é composto pela vagina, vulva, útero (corpo e cérvix), ovários e tubas uterinas (Silva Neto, 2012). O útero está localizado no centro da pelve, à frente do reto e atrás da bexiga. É um órgão muscular com a cavidade interna em forma triangular. Suas dimensões não gravídicas são de aproximadamente 7,5 cm de comprimento, 5 cm de largura e 3 a 4 cm de diâmetro. O corpo e a cérvix uterina comunicam a vagina com a cavidade peritoneal através das tubas uterinas (Coelho *et al.*, 2008).

O corpo do útero apresenta em seu interior a cavidade uterina, em continuidade com a cérvix (colo uterino) e o canal endocervical, que por sua vez, se projeta na parte alta da vagina (Coelho *et al.*, 2008). A parte externa do colo uterino, também chamada de ectocérvix, é revestida por epitélio escamoso estratificado e não queratinizado composto por várias camadas celulares, passando pelo epitélio basal, intermediário e superficial, repousados sobre uma membrana basal. A parte interna do colo uterino, também conhecida como endocérvix, é composta pelo epitélio endocervical, que apresenta camada única de células colunares altas, situadas sobre um estroma de tecido conjuntivo e são produtoras de muco (Figura 1) (Koss & Gompel, 2006).

O encontro do epitélio estratificado escamoso e o epitélio endocervical é conhecido como zona de transformação ou junção escamo-colunar (Figura 2). Esta

região é de fundamental importância, pois acredita-se ser o principal sítio de infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) (Koss & Gompel, 2006).

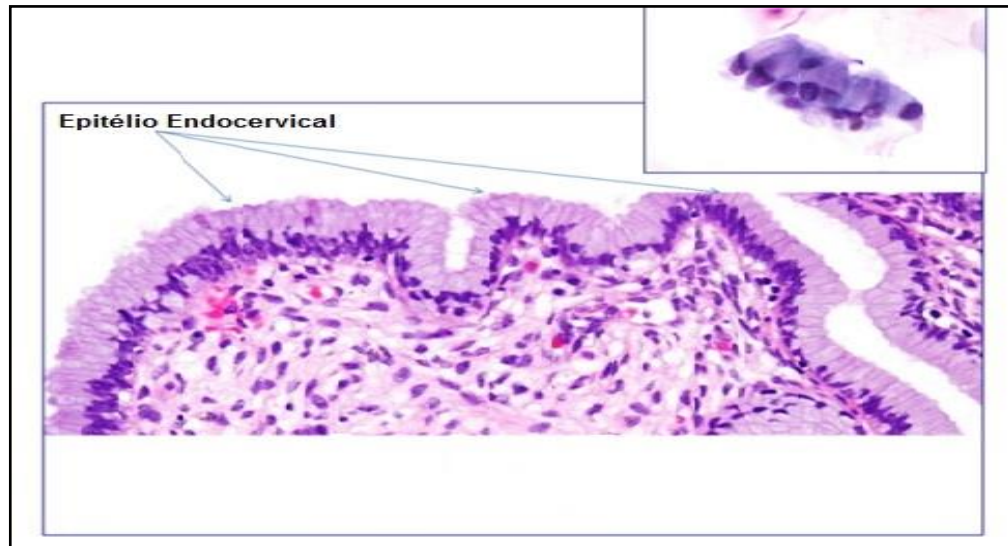


Figura 1. Fotomicrografia do epitélio endocervical do colo uterino. Adaptado de <http://www.eurocytology.eu/en/course/932>.

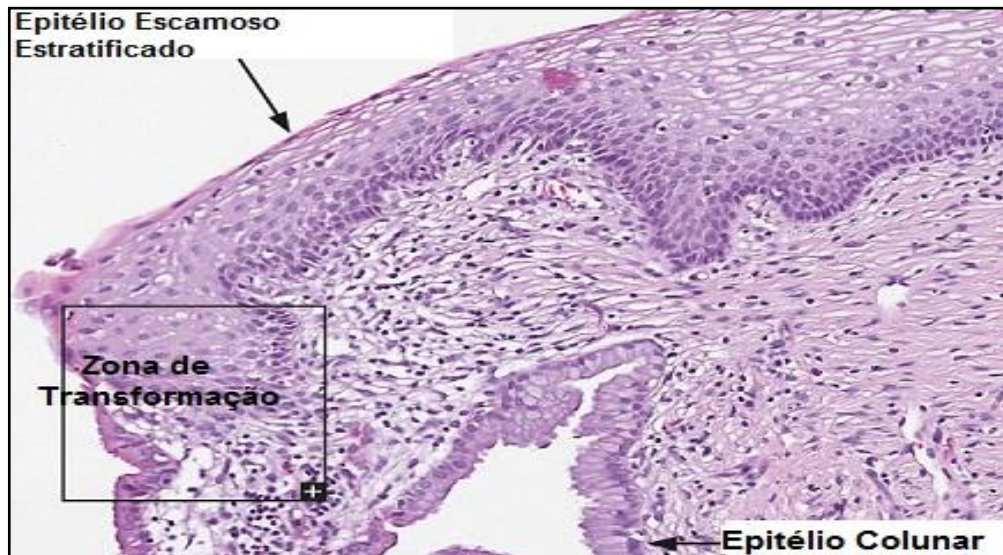


Figura 2. Fotomicrografia mostrando a zona de transformação do epitélio escamoso e epitélio glandular do colo uterino. Adaptado de <http://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/normal/cervix,+uterine+1>).

2.3. História Natural do Câncer de Colo Uterino

A história natural do câncer de colo uterino está diretamente ligada à infecção pelo HPV, uma vez que em quase todos dos casos de câncer de colo uterino invasivo, o DNA do HPV de alto risco é encontrado (Gravitt, 2011). Para que inicie a infecção, é necessário o acesso de partículas de HPV às camadas basais do epitélio escamoso, onde a atividade proliferativa das células é abundante (Ferraz *et al.*, 2012).

Nas células hospedeiras, o HPV pode permanecer sob duas situações, a primeira na forma episomal e a segunda, na forma integrada (Junior *et al.*, 2006). Na forma episomal, o genoma do vírus não fica diretamente associado ao genoma do hospedeiro, enquanto na forma integrada o genoma viral incorpora-se ao genoma do hospedeiro e parece ser nessa condição que ocorre maior possibilidade evolução para o câncer (Junior *et al.*, 2006).

A grande maioria das infecções por HPV é espontaneamente eliminada e apenas uma pequena minoria persiste e desencadeia lesões intraepiteliais precursoras ou câncer invasivo (Erickson *et al.* 2013). A idade da hospedeira e o tipo viral são importantes variáveis para a eliminação dos vírus. Mulheres jovens eliminam mais facilmente o vírus quando comparadas a mulheres mais velhas e os HPV de baixo risco são mais facilmente eliminados quando comparados aos HPV de alto risco (Erickson *et al.* 2013).

De modo geral, as lesões precursoras intra-epiteliais progridem lentamente e histologicamente se caracterizam pela desorganização das camadas do epitélio, presença de alterações nucleares e figuras de mitose (Koss & Gompel, 2006).

O mais recente sistema de classificação para as lesões precursoras do câncer de colo uterino é o Sistema Bethesda que surgiu para uniformizar as

nomenclaturas nos laudos citopatológicos e enquadrar a classe NIC II descrita por Richard entre as lesões de alto grau (Solomon & Nayar, 2005). Assim, o Sistema Bethesda classifica as lesões precursoras em duas categorias: lesões de baixo grau (LSIL) e lesões de alto grau (HSIL) (Lax, 2011).

As lesões de baixo grau acometem as camadas superficiais do epitélio e são caracterizadas pelas alterações típicas da infecção pelo HPV, como a coilocitose. São mais associadas aos tipos virais de baixo risco oncogênico como o HPV 6 e 11 (Figura 3 A). As lesões de alto grau acometem as camadas basais e parabasais do epitélio, apresentam alterações citológicas mais importantes e estão mais associadas aos tipos virais de alto risco, como os HPV 16 e 18 (Figura 3 B) (Lax, 2011).

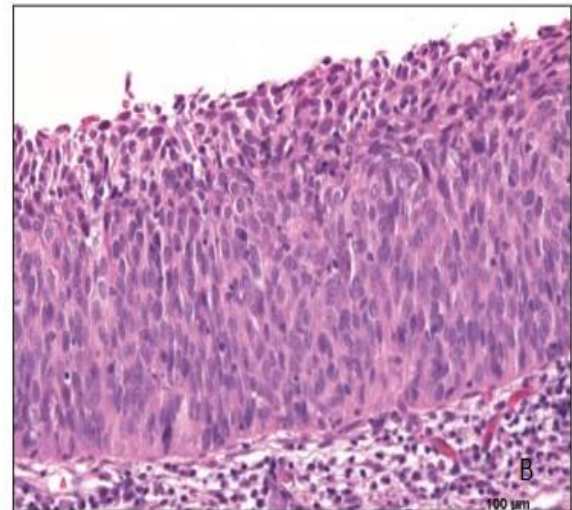
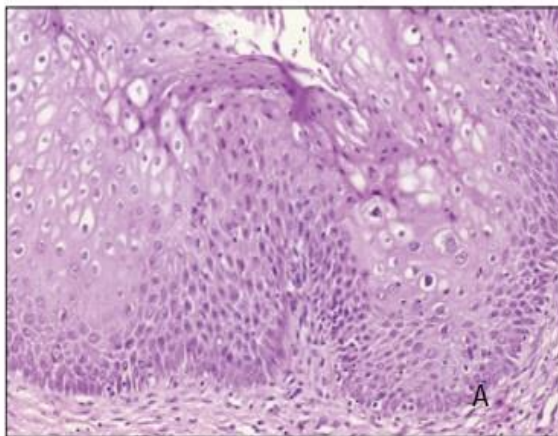


Figura 3. (A) Lesão intraepitelial de baixo grau – NIC I; (B) Lesão intraepitelial de alto grau – NIC III. Adaptado de (Lax, 2011).

2.4. Fatores de Risco para o Câncer de Colo Uterino

2.4.1 Infecção pelo Papilomavírus humano (HPV)

O fator de risco mais importante para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais e do câncer de colo uterino é a infecção persistente por HPV (Campaner *et al.*, 2007; Coelho, 2008; Ishida *et al.*, 2009; Schiffman *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2015). O DNA de HPV é encontrado em mais de 99% dos carcinomas escamosos cervicais (Walboomers *et al.*, 1999; Waggoner, 2003).

A principal via de contaminação pelo HPV é o contato sexual. Microtraumas provocados pela relação sexual tornam-se portas abertas ao vírus (Erickson *et al.*, 2013). A transmissão entre mãe e filho é documentada e pode ocorrer via contato vaginal durante o parto ou por transmissão vertical, porém as taxas de transmissão vertical variam drasticamente entre estudos (Erickson *et al.*, 2013).

Mais de 100 tipos de HPV já foram descritos, com cerca de 40 tipos capazes de infectar o trato genital (Coelho, 2008; Resende *et al.*, 2014). Os genótipos virais do HPV podem ser divididos em grupos de acordo com seu potencial carcinogênico, sendo classificados como de baixo risco (HPV 6, 11, 42, 43 e 44, 54, 70, 72, 73 e 81) ou alto risco (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59) (Silva Neto, 2012), logo, os tipos virais de alto risco são frequentemente encontrados em carcinomas ao contrário dos tipos virais de baixo risco, raramente associados a carcinomas (Bodily & Laimins, 2011). Há ainda os genótipos virais classificados como possivelmente causadores de câncer, como os HPV 68 e 73, oferecendo risco intermediário para a neoplasia (Doorbar, 2012; Halec *et al.*, 2014).

Estudos indicam que a maioria dos casos de infecção por HPV é solucionada espontaneamente, porém fatores de risco associados à infecção pelo HPV, infecções por múltiplos tipos virais e novas infecções podem tornar a exposição

persistente, levando a modificações epiteliais malignas (Ibeanu, 2011). Infecções persistentes por tipos de HPV de alto risco representam o fator mais importante para a evolução ao câncer (Bodily & Laimins, 2011).

2.4.2 Outros Agentes Infecciosos

Outras infecções sexualmente transmissíveis como *Chlamydia trachomatis*, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e *Herpes simplex* (HSV) também são associadas ao desenvolvimento do câncer de colo uterino (Coelho, 2008; Mac Graw & Ferrante, 2014). A co-infecção HIV-HPV é esperada devido ao perfil de risco semelhante para as duas infecções. Quando coexistentes, o HIV pode mudar a história natural da infecção pelo HPV, tornando-a mais agressiva (Coelho, 2008; Kleppa *et al.*, 2014). O desenvolvimento de câncer de colo uterino em mulheres HIV positivas é considerado como definidor da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Mac Graw & Ferrante, 2014).

Acredita-se que o aumento no risco do desenvolvimento do câncer de colo uterino atribuído às infecções por *Chlamydia trachomatis* e o HSV2 seja devido a resposta inflamatória provocada por esses dois agentes e à consequente formação de radicais livres, desenvolvendo uma possível instabilidade genética (Muñoz *et al.*, 2006).

2.4.3. Multiplicidade de Parceiros Sexuais e Início Precoce da Atividade Sexual

O número de parceiros sexuais é um importante fator de risco para a infecção pelo HPV, porém sua correlação direta como fator de risco para o câncer de colo uterino não é bem documentada, por isso alguns estudos vêm tentando estabelecer melhor essa relação e resultados significantes para o aumento de lesões

precursoras e também para o carcinoma cervical invasor estão sendo descritos (Liu *et al.*, 2015).

O início precoce da atividade sexual é um importante fator de risco para a infecção pelo HPV, uma vez que nas adolescentes o epitélio ainda é imaturo, com áreas mais extensas de ectopia e metaplasia (Ribeiro *et al.*, 2015). A ectopia acontece quando o epitélio endocervical se estende à parte externa no colo uterino, invadindo o epitélio da ectocérvice. Essa exteriorização da junção escamo-colunar favorece a instalação de infecções sexualmente transmissíveis (Kleppa *et al.*, 2014).

2.4.4. Tabagismo

A exposição aos componentes tóxicos do cigarro é associada a diversos tipos de câncer (WEI *et al.*, 2014), como pulmão, bexiga, pâncreas, trato respiratório superior, incluindo cavidade oral, faringe, laringe e esôfago (Vineis *et al.*, 2004; Phillips & Venitt, 2012), e em 2004, o tabagismo foi incluído, pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), como uma das causas do câncer de colo do útero (Coelho, 2008).

O cigarro é composto por milhares de produtos químicos (aproximadamente 7000 substâncias), dentre os quais, ao menos 60 são classificados como carcinogênicos. Os destaques no processo da carcinogênese são os aldeídos, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, as nitrosaminas e os metais (Arsênio, Cadmio e Cromo) (Phillips & Venitt, 2012; Sobus & Warren, 2014). O benzeno, por exemplo, é um hidrocarboneto aromático policíclico, derivado do petróleo e está presente no cigarro. Indivíduos fumantes têm taxas corpóreas de benzeno 6 a 10 vezes maiores do que indivíduos não fumantes (Bruckner *et al.*, 2012). Metabólitos do benzeno ligam-se covalentemente a proteínas e ao DNA e os derivados reativos

desses metabólitos podem provocar dano ao DNA, mutações ou apoptose (Bruckner *et al.*, 2012).

Dentre os principais componentes do cigarro têm-se as nitrosaminas (Figura 4) e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Figura 5).

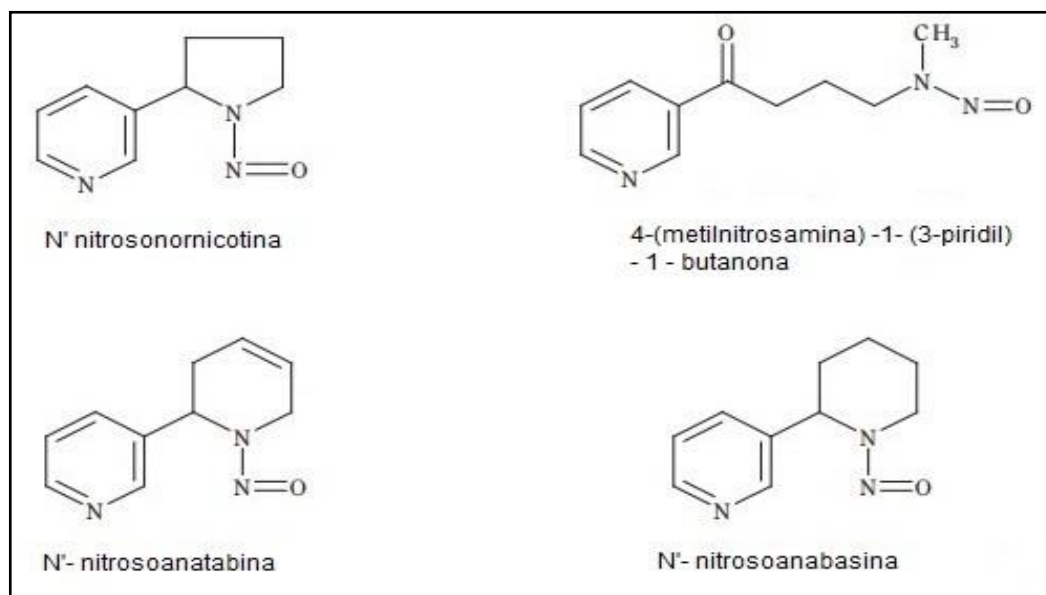


Figura 4. Estrutura química das nitrosaminas presentes no tabaco.

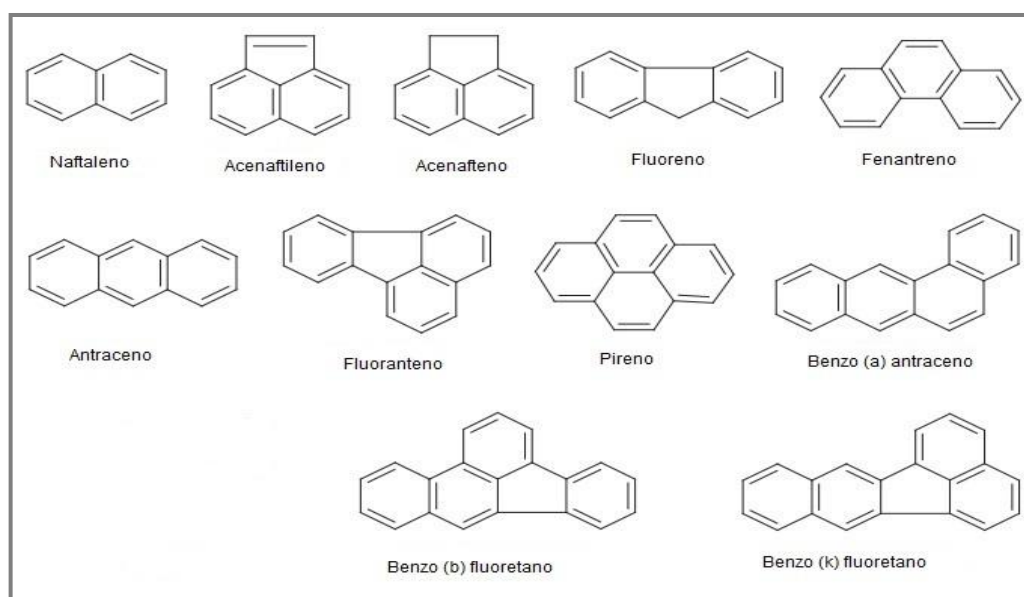


Figura 5. Estrutura química dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes no tabaco.

Os principais mecanismos de participação do tabaco no desenvolvimento de lesões cervicais e câncer de colo uterino são explicados pela modificação da resposta imune celular e humoral, pela exposição direta do DNA aos carcinógenos e pelos efeitos relacionados ao metabolismo de hormônios sexuais (Campaner *et al.*, 2007; Coelho, 2008). O tabaco e os seus derivados podem causar alterações na densidade e morfologia das células natural killer e nas células de Langerhans, importantes mecanismos de vigilância imunológica celular (Uchimura *et al.*, 2004). Além disso, a formação de adutos de DNA, provocados pelas reações do metabolismo dos compostos químicos, induz mutações iniciadoras da carcinogênese (Phillips & Venitt, 2012).

As substâncias químicas produzidas pela queima do tabaco e absorvidas pelos pulmões podem ser encontradas no muco cervical de mulheres fumantes, expondo diretamente o DNA das células cervicais aos carcinógenos (Campaner *et al.*, 2007; Kiran *et al.*, 2010). Estudos demonstram que o tabagismo é importante fator de risco para o câncer do colo uterino, relacionando o tempo e a intensidade do hábito de fumar com o desenvolvimento de lesões precursoras e com o carcinoma invasivo, estimando um aumento em duas vezes no risco de neoplasia para mulheres tabagistas (Vineis *et al.*, 2004; Roura *et al.*, 2013).

Outra importante correlação vem sendo estabelecida entre o tabagismo e o aumento no número de visitas de acompanhamento ao ginecologista, a realização de colposcopias e a duração do tratamento de lesões associadas ao HPV (Lamb *et al.*, 2013), reforçando o papel do tabagismo no câncer de colo uterino.

2.5. Ciclo Celular e Genética do Câncer de Colo Uterino

O conhecimento dos eventos de controle do ciclo celular é fundamental para a compreensão do desenvolvimento embrionário, envelhecimento, proliferação e

morte celular (Favaro, 2013). Alterações em genes de controle do ciclo celular e em genes responsáveis por fatores de crescimento modificam a capacidade de proliferação celular causando desequilíbrio tecidual, processo característico de neoplasias (Andrade & Chammas, 2008). Células tumorais exibem alta taxa de proliferação e pouca ou nenhuma sensibilidade aos estímulos de morte e fatores antiproliferativos (Andrade & Chammas, 2008).

O potencial oncogênico do HPV depende da interação das oncoproteínas virais, especialmente E6 e E7, com proteínas regulatórias do ciclo celular, principalmente p53 e pRb (Gadducci *et al.*, 2011). A interação entre proteínas virais e celulares interfere em pontos inibitórios da progressão do ciclo celular e, conseqüentemente, aumenta a taxa de proliferação das células infectadas e reduz a apoptose (Andrade & Chammas, 2008).

O gene *p53* é considerado o guardião do genoma humano, pois é uma das principais vias de controle do ciclo celular, impedindo a transformação neoplásica por meio de mecanismos que impeçam que células com DNA alterado completem o ciclo celular. Ao ativar a transcrição dos genes *p16*, *GADD45* e *BAX*, a p53 induz o reparo do DNA em G1 ou em casos de danos irreversíveis, induz a apoptose (Ferraz *et al.*, 2012). A pRb atua controlando a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Em sua forma ativa, pRB encontra-se ligada ao fator de transcrição E2F, bloqueando a ação deste e parando a célula em G1 (Ferraz *et al.*, 2012). Mutações em genes *p53* e *pRB* causam proliferação celular descontrolada, uma vez que as células perdem o controle de checagem do ciclo. A maioria, senão todos os cânceres, apresentam perda de função das vias pRB e p53 (Junior *et al.*, 2006). Nos tumores associados ao HPV, a perda da função de p53 e pRb é devida ao aumento da degradação de tais proteínas, mediada pelas proteínas virais E6 e E7, permitindo

que a célula anormal sobreviva, continue se dividindo e acumulando anormalidades (Alberts *et al.*, 2010).

2.6. Classificação Histológica dos Tumores de Colo Uterino

A cérvix uterina é a porção inferior do útero, possui estrutura cilíndrica e oca e é revestida por dois tipos celulares distintos: as células escamosas na região externa (ectocérvice) e as células colunares na porção interna (endocérvice) (Coelho, 2008; Apgar *et al.*, 2010). Cerca de 80% dos cânceres de colo uterino se desenvolvem a partir de lesões escamosas precursoras. Os adenocarcinomas de cérvix uterina são menos frequentes e contabilizam cerca de 20% dos tumores invasivos (Waggoner, 2003).

2.6.1. Carcinoma Microinvasor

São considerados carcinomas microinvasivos os tumores que invadem o estroma em no máximo 5 mm em profundidade a partir da membrana basal e cujo diâmetro não ultrapasse 7 mm (Koss & Gompel, 2006). Os carcinomas microinvasores apresentam bom prognóstico e são tratados por conização ou histerectomia simples, de acordo com o estadiamento (Koss & Gompel, 2006).

2.6.2. Carcinoma Escamoso Invasor

Um tumor cervical, que tenha invadido o estroma ao rompimento da membrana basal, é considerado invasor (Koss & Gompel, 2006; Silva Neto, 2012). Acomete células escamosas e é a neoplasia maligna mais comum do colo uterino (Solomon & Nayar, 2005).

Os tipos histológicos mais comuns de carcinoma escamoso invasor são: carcinoma queratinizante ou bem diferenciado (graduação histológica I), carcinoma

de células médias ou grandes (graduação histológica II) e carcinoma de pequenas células (graduação histológica III) (Koss & Gompel, 2006). Alguns tumores podem apresentar mais de um elemento, sendo observada a predominância para a definição do grau de diferenciação dos tumores (Koss & Gompel, 2006).

2.6.3. Adenocarcinoma

Assim como o epitélio escamoso, o epitélio glandular também pode apresentar alterações que vão de reações benignas ou inflamatórias até o câncer invasivo (Koss & Gompel, 2006). Os adenocarcinomas têm aumentado nas últimas décadas e seu diagnóstico é dificultado por fatores analíticos como dificuldade de interpretação das lesões precursoras glandulares e também pré-analíticos, como a coleta citológica sem representatividade deste epitélio (Andrade, 2008).

Ao contrário dos carcinomas escamosos, acreditava-se que os adenocarcinomas nem sempre estariam associados à infecção pelo HPV, sendo que alguns subtipos histológicos raros se desenvolvem por outras vias de carcinogênese (Andrade, 2008). Porém, em estudo realizado no Brasil, a presença do HPV foi identificada em 97,7% dos casos de adenocarcinomas (Carvalho *et al.*, 2008). Além disso, os adenocarcinomas parecem não ter associação com o tabagismo, porém podem ser relacionados ao uso prolongado de contraceptivos orais (Andrade, 2008).

2.7. Fatores Prognósticos no Câncer de Colo Uterino

A escolha do tratamento e a perspectiva de cura de cada tumor é baseada em fatores prognósticos (Marques *et al.*, 2015). Os principais fatores prognósticos para o câncer de colo uterino são tamanho tumoral, tipo histológico, profundidade da invasão estromal, metástases linfonodais e metástases à distância. O estadiamento tumoral é considerado principal fator prognóstico e foi preconizado pela Federação

Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) para refletir a disseminação do tumor, através da avaliação dos fatores: tamanho tumoral (T), comprometimento de linfonodos (N) e metástases à distância (M) (Tabela 1) (Silva Filho, 2009; Marques *et al.*, 2015).

Os tumores em células glandulares, seja adenocarcinomas ou tumores adenoescamosos, apresentam pior prognóstico quando comparados aos tumores escamosos. Os tumores glandulares apresentam maior resistência ao tratamento radioterápico, maior incidência de metástases e conseqüentemente menores taxas de sobrevida (Rodrigues *et al.*, 2008; Silva Filho, 2009).

O comprometimento de margens cirúrgicas é importante fator prognóstico pois está diretamente associado com recidivas locais (Rodrigues *et al.*, 2008), sendo indicado, quando possível, novo procedimento cirúrgico para definição de limites livres de câncer (Silva Filho, 2009). Margens comprometidas em tumores estadiados entre IB ou IIA representa possibilidade de 40% de recidiva local, enquanto a possibilidade de recidiva é de 16,7% para aqueles com margens livres (Singh & Arif, 2004).

Tabela 1. Classificação TNM/FIGO para o câncer de colo uterino. Disponível em: <http://screening.iarc.fr/atlasclassiftnm.php?lang=4>

TNM	FIGO	Tumor de colo uterino
TX		Tumor primário não pode ser avaliado
T0	0	Sem evidência de tumor primário
Tis		Carcinoma <i>in situ</i> (carcinoma pré invasor)
T1	I	Carcinoma da cérvix confinado ao útero (extensão ao corpo deve ser desprezada)
T1a	IA	Carcinoma invasor, diagnosticado somente pela microscopia. Todas as lesões visíveis macroscopicamente – mesmo com invasão superficial – são T1b/Estadio IB
T1a1	IA1	Invasão estromal de até 3mm em profundidade e 7mm ou menos de extensão horizontal
T1a2	IA2	Invasão estromal maior que 3mm e até 5mm em profundidade com extensão horizontal de 7mm ou menos
T1b	IB	Lesão clinicamente visível, limitada ao colo, ou lesão microscópica maior que T1a2/IA2
T1b1	IB1	Lesão clinicamente visível com 4 cm ou menos em sua maior dimensão
T1b2	IB2	Lesão clinicamente visível com mais de 4 cm em sua maior dimensão
T2	II	Tumor que invade além do útero, mas não atinge a parede pélvica ou o terço inferior da vagina
T2a	IIA	Sem invasão do paramétrio
T2b	IIB	Com invasão do paramétrio
T3	III	Tumor que se estende à parede pélvica, compromete o terço inferior da vagina, ou causa hidronefrose ou exclusão renal
T3a	IIIA	Tumor que compromete o terço inferior da vagina sem extensão à parede pélvica
T3b	IIIB	Tumor que se estende à parede pélvica, ou causa hidronefrose ou exclusão renal
T4	IVA	Tumor que invade a mucosa vesical ou retal ou que se estende além da pelve verdadeira
	IVB	Metástase à distância
NX		Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0		Ausência de metástase em linfonodo regional
N1		Metástase em linfonodo regional
MX		A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0		Ausência de metástase à distância
M1		Metástase à distância

2.8. Polimorfismos Genéticos em *GSTM1* e *GSTT1* e o Câncer de Colo Uterino

A glutationa é um tripeptídeo antioxidante, formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e ácido glutâmico. Participa como cofator de várias enzimas e processos de detoxificação (Carreiro, 2011). As Glutathione-S-Transferases (GST) são uma família de enzimas (Tabela 2) envolvidas na detoxificação de xenobióticos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos encontrados no cigarro, protegendo as células de efeitos deletérios e oxidativos (Joseph *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2008; Leme *et al.*, 2010).

Tabela 2. Família das Glutathione S Transferases. Adaptado de Cassarett & Doulls, 2008

Família	Classe	Gene	Enzima
Citosólica	Alpha	<i>GSTA1</i>	GSTA1-1
		<i>GSTA2</i>	GSTA2-2
		<i>GSTA3</i>	GSTA3-3
		<i>GSTA4</i>	GSTA4-4
		<i>GSTA5</i>	GSTA5-5
	Mu	<i>GSTM1</i>	GSTM1-1
		<i>GSTM2</i>	GSTM2-2
		<i>GSTM3</i>	GSTM3-3
		<i>GSTM4</i>	GSTM4-4
		<i>GSTM5</i>	GSTM5-5
	Pi	<i>GSTP1</i>	GSTP1-1
	Sigma	<i>PGDS</i>	GSTS-1
	Theta	<i>GSTT1</i>	GSTT1-1
		<i>GSTT2</i>	GSTT2-2
	Zeta	<i>GSTZ1</i>	GSTZ1-1
Omega	<i>GSTO1</i>	GSTO1-1	
	<i>GSTO2</i>	GSTO2-2	
Mitocondrial	Kappa	<i>GSTK1</i>	GSTK1-1
Microssomal (MAPEGs)	gpl	<i>MGST2</i>	MGST2
		<i>ALOX5AP</i>	Flap
		<i>LTC4S</i>	LTC.S
	gpII	<i>MGST3</i>	MGST3

Essa família de enzimas catalisa reações de metabolização de xenobióticos, como por exemplo, a nicotina, tornando-os mais hidrossolúveis e facilitando a

excreção destes compostos, conseqüentemente evitando seu acúmulo no organismo (Losi-Guembarovski & Cólus, 2001). A Figura 6 ilustra as reações de biotransformação dos xenobióticos em duas possíveis vias, a primeira com sucesso e a segunda quando não há excreção dos compostos:

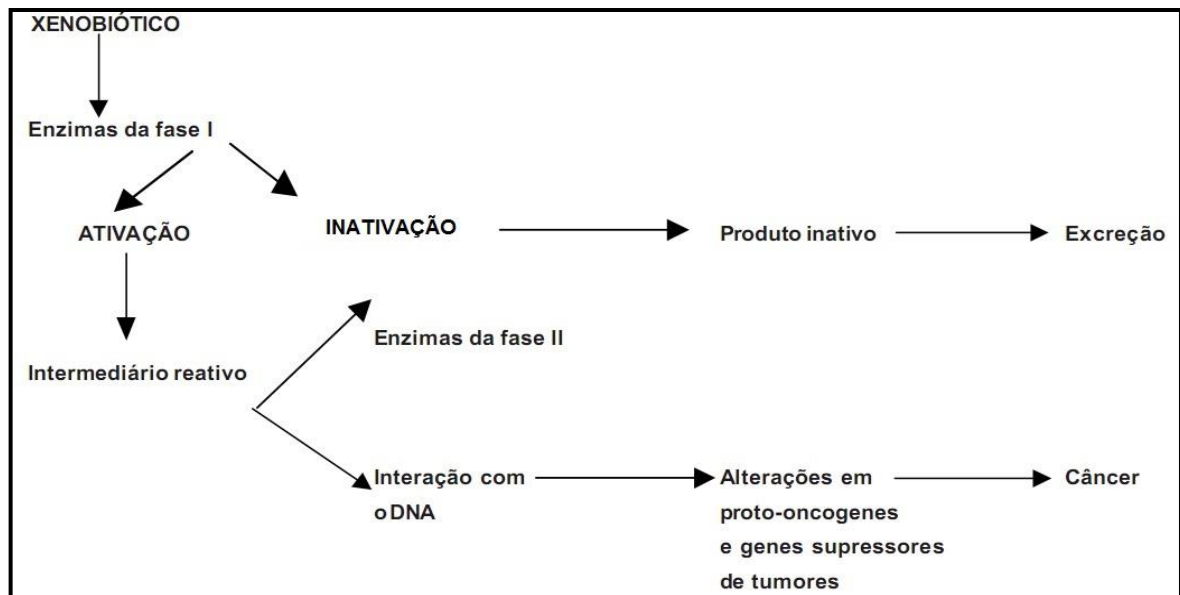


Figura 6. Vias de metabolização de xenobióticos. Adaptado de Losi-Guembarovski & Cólus, 2001.

A deleção homozigótica ou o genótipo nulo de *GSTM1* e *GSTT1* resultam em diferenças ou até ausência da atividade dessas enzimas, podendo aumentar a suscetibilidade ao câncer (Joseph *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2008; Leme *et al.*, 2010). A família das GST é classificada em vários grupos, sendo eles: alpha, mu, kappa, theta, pi, omega e zeta. A presença ou ausência do gene está relacionada à capacidade de conjugação de substâncias glutationa-dependentes, interferindo diretamente na metabolização de vários carcinógenos e conseqüentemente aumentando o risco para diversos cânceres (Leme *et al.*, 2010). Assim, a diferente capacidade entre indivíduos, de metabolizar substâncias xenobióticas, influencia na suscetibilidade ao câncer (Ishida *et al.*, 2009). Os genes que codificam essas

enzimas são altamente polimórficos e apresentam grande variabilidade de expressão e de atividade (Leme *et al.*, 2010).

O gene *GSTM1* está localizado no endereço gênico 1p13 e apresenta os alelos *GSTM1a* e *GSTM1b* que diferem pela substituição em um único par de bases (C → G) na posição 534 (Rebbeck, 1997). Os alelos podem se combinar formando genótipos homozigotos ou heterozigotos e quando ocorre homozigose nula, a atividade da enzima, produto desse gene, está ausente (Losi-Guembarovski & Cólus, 2001).

O gene *GSTT1* está localizado no endereço gênico 22q11 (Gao *et al.*, 2011) e participa do processo de detoxificação dos carcinógenos, incluindo os provenientes do tabaco. Seu polimorfismo nulo resulta em perda de atividade enzimática (Zhang *et al.*, 2012).

O gene *GSTM1* apresenta maior frequência de nulidade entre as populações já estudadas, ocorrendo em 23 a 41% dos afro-americanos e negros, em 23 a 48% dos africanos, em 33 a 63% dos asiáticos e cerca de 57% em caucasianos (Losi-Guembarovski & Cólus, 2001). No Brasil, um estudo desenvolvido em São Paulo e na Bahia, revelou a frequência de *GSTM1* nulo entre brancos (55,4%), mulatos (41,4%) e negros (32,8%) (Gattás *et al.*, 2004).

Os principais estudos com metodologia caso-controle sobre os polimorfismos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* e sua relação ao câncer de colo uterino publicados de 2005 a 2015 estão sumarizados na Tabela 3. Controvérsias entre as frequências dos polimorfismos nulos e o risco para o câncer cervical são relatados, porém, os estudos com maior representatividade populacional apontam para o aumento do risco de desenvolvimento deste câncer, para indivíduos com o polimorfismo nulo.

Tabela 3. Trabalhos publicados entre 2005 e 2015 que avaliaram a associação entre os polimorfismos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* e suas associações ao câncer de colo uterino.

Referência / País	Nº de casos – SIL + Ca	Nº de casos-Ca confirmado	Nº de controles	Tecido analisado	Método	Fatores de risco avaliados	Genótipos	Frequencia dos genótipos % geral		Freq. dos genótipos no câncer – valor absoluto e (%)	OR ¹	p valor			
								Casos	controles						
Joseph, 2005 Índia	147	102	165	Sangue periférico; Células esfoliativas cervicais	PCR	HPV	GSTM1	53,7	32,7	*	2.39	0.0001			
							GSTT1	16,3	9,7				1.82	0.091	
							CYP1A1								
Singh, 2008 Índia	150	150	168	Sangue periférico	PCR	Tabaco Etilismo	GSTM1	42,7	28,0	64 (42,7)	1.52	0.009			
							GSTT1	26,7	11,1				40 (26,7)	2.4	0.0004
							GSTM3								
Ishida, 2009 Tailândia	90	90	94	Sangue periférico	PCR	Tabaco	GSTM1	60.0	59,6	54 (60.0)	1.02	>0.05			
							GSTT1	46,7	40,4				42 (46,7)	1.29	>0.05
Kiran, 2010 Turquia	46	46	52	Sangue Periférico	PCR	-	GSTM1	54,3	57,7	25 (54,3)	**	0.73			
Djansugurova, 2013 Casaquistão	207	207	160	Sangue Periférico Amostras cervicais	PCR	Tabaco	GSTM1	14,29	2,5	31(14,29) 129 (59,45)	6.5	<0.000			
							GSTT1	59,45	26,88				3.99	1	
							Outros genes de reparo de DNA e ciclo celular							0.0	
Palma, 2010 Itália	81	25	111	Sangue Periférico Amostras cervicais	PCR	Tabaco HPV	GSTM1	60,5	52,3	15 (60)	1.37	<0.05			
							GSTT1	28,4	19,8				8 (32)	1.90	<0.05
							GSTP1								

Referência / País	Nº de casos – SIL + Ca	Nº de casos-Ca confirmado	Nº de controles	Tecido analisado	Método	Fatores de risco avaliados	Genótipos	Frequência dos genótipos % geral		Freq. dos genótipos no câncer – valor absoluto e (%)	OR ¹	p valor
								Casos	controles			
Niwa, 2005 Japão	131	131	320	Sangue periférico	PCR	Tabaco	GSTM1 GSTT1 NQO1 C609T	53,4 48,1	57,5 42,6	70 (53,4) 63 (48,1)	**	
Sobti, 2006 Índia	103	103	103	Sangue periférico	PCR	Tabaco	GSTM1 GSTT1 GSTP1	40,7 15,5	36,8 25,2	42 (40,7) 16 (15,5)	1,17 0,54	<0.05 <0.05
Stosic, 2014 Servia	97	32	50	Sangue periférico	PCR	Tabaco Idade	GSTM1 GSTT1	74,2 39,2	56,0 40,0	22 (68,75) 12 (37,50)	1.73 0.90	0.25 0.82
Nishino, 2008 Japão	124	124	125	Sangue periférico	PCR	HPV Tabaco	GSTM1 GSTT1 Outros genes do metabolismo de carcinógenos	62,1 45,2	47,2 46,4	77 (62,1) 56 (45,2)	1,83 0,84	0.019 0.520
Agorastos, 2007 Grécia	149	47	114	***	PCR	Tabaco Idade	GSTM1 GSTT1 CYP1A1	59,06 41,61	60,6 43,43	24 (51,06) 20 (42,55)	**	

1. OR ajustado para o número de casos confirmados.

*O trabalho não apresenta distribuição dos genótipos em pacientes com câncer cervical confirmado. A frequência apresentada é a geral.

**OR não calculado pelo trabalho.

***Tecido utilizado não especificado pelo trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Primário

Avaliar as possíveis associações entre os polimorfismos nulos dos genes *GSTT1* e *GSTM1*, o tabagismo e o câncer de colo uterino.

3.2. Objetivos Secundários

- ✓ Comparar a frequência dos polimorfismos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* em um grupo de pacientes com câncer de colo uterino e um grupo de mulheres sem histórico de câncer de colo uterino.
- ✓ Investigar a prevalência do tabagismo nos dois grupos de mulheres.
- ✓ Avaliar as possíveis associações entre os polimorfismos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* detectados e os fatores de risco para o câncer de colo uterino, especialmente o tabaco.
- ✓ Investigar as possíveis associações entre os polimorfismos avaliados, o prognóstico dos tumores de colo uterino e a sobrevida em 60 meses.

4. METODOLOGIA

4.1. Aspectos Éticos

O presente estudo foi realizado após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (CEP/AACG), sob o número CAAE 45582615.5.0000.0031 (Anexo 1).

4.2. Seleção de Sujeitos, Coleta de Amostras Biológicas e Dados Clínicopatológicos

A seleção do grupo de casos foi realizada por meio de busca ativa nos livros e registros do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge. A partir dos casos diagnosticados em 2006 e 2007, os carcinomas de colo uterino foram confirmados histopatologicamente e selecionados para análise de prontuários e pesquisa do polimorfismo nulo de *GSTT1* e *GSTM1*. Os casos selecionados foram aqueles que apresentaram blocos de tecido disponíveis e suficientes e dados clínico-patológicos disponíveis nos respectivos prontuários. Todo cuidado foi tomado no sentido de não esgotar os espécimes incluídos em parafina. Os dados coletados a partir dos prontuários incluíram: tipo histológico, grau histológico, estado civil, idade ao diagnóstico, história de tabagismo e etilismo, status menstrual, tipo de tratamento, estadiamento clínico (extensão da lesão, comprometimento linfonodal, metástase à distância) e status da paciente na última consulta com seguimento de até 60 meses (Anexo 2).

O cálculo amostral inicial foi baseado na estimativa anual de novos casos para o ano de 2014, com erro de 5%, e compreendia o número total de 243 casos.

Um fluxograma detalhado com os motivos das exclusões de casos foi montado a fim de facilitar a compreensão da casuística (Figura 7).

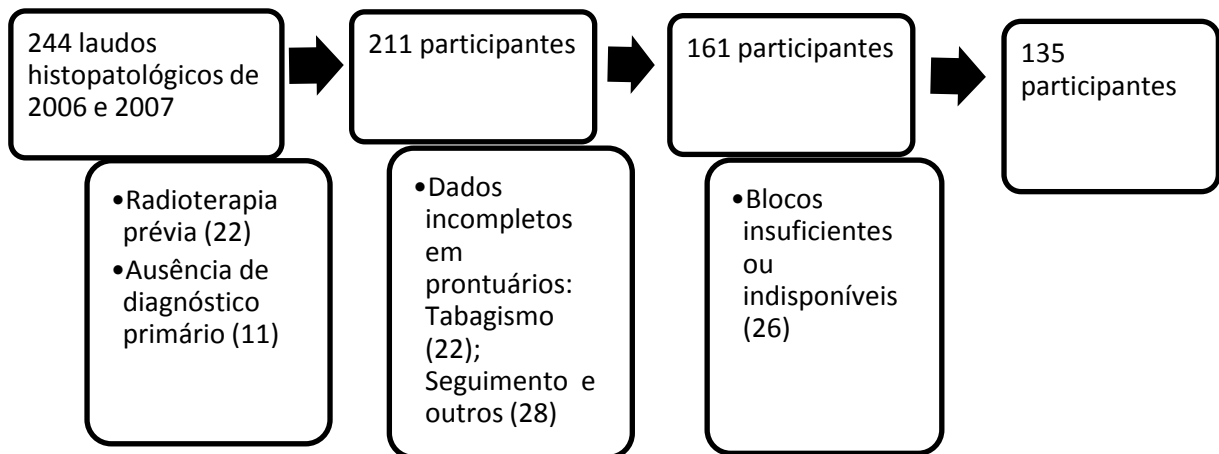


Figura 7. Fluxograma com levantamento e seleção dos casos.

O grupo controle foi composto por mulheres, pareadas pelas diferentes faixas etárias do grupo de casos, que buscaram o Laboratório da Área de Saúde da PUC GO para realização de exames de rotina. Os controles selecionados foram aqueles que não apresentavam história de carcinoma de colo uterino. Esse grupo de mulheres foi convidado a participar do estudo e aquelas que concordaram, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3), autorizando a utilização da amostra sanguínea para análise molecular dos polimorfismos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* e fornecendo dados sociodemográficos (Anexo 4).

A escolha do grupo controle foi definida no sentido de evitar maiores riscos e desconfortos às participantes, vez que as mulheres incluídas foram aquelas que procuram o Laboratório Clínico da PUC GO para exames de rotina e desta forma, já

seriam submetidas à coleta de sangue periférico. O número final de participantes para o grupo de casos foi 135 e de controles foi 100 (Tabela 4).

Tabela 4. Número de participantes do estudo e intervenções realizadas.

Grupo	Número de indivíduos	Intervenções realizadas
Grupo casos	135	Análise dos prontuários e análises moleculares dos blocos de parafina contendo amostras tumorais.
Grupo controle	100	Coleta de dados sócio-demográficos e análises moleculares das amostras sanguíneas.

4.3. Análise Molecular

Após a seleção dos casos, filetes das amostras tumorais foram cortados e armazenados em tubos estéreis de 1,5 mL. Cada tubo foi identificado de acordo com o bloco cortado e o número de filetes disponíveis era variável, dependendo da quantidade de material disponível em arquivo. Quanto ao grupo controle, a alíquota sanguínea foi armazenada em tubo próprio com EDTA, identificadas e refrigeradas.

Todas as extrações de DNA foram realizadas no Laboratório de Diversidade Genética da PUC GO e as reações em cadeia da polimerase e a eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% foram realizadas no Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia do Hospital Araújo Jorge.

4.3.1. Extração do DNA das Amostras Tumorais

A extração de DNA das amostras tumorais cervicais foi feita por meio do kit comercial Wizard, distribuído pela Promega, de acordo com protocolo de desparafinização e extração utilizado no Laboratório de Diversidade Genética da PUC GO (Anexo 5). Os tubos com os produtos das extrações foram identificados e armazenados a - 20°C para posterior utilização nas reações de PCR.

4.3.2. Extração do DNA das Amostras Sanguíneas

As extrações do DNA das amostras de sangue periférico do grupo controle foram realizadas por meio do método *salting-out* (Sambrooks, 1989) (Anexo 6). Os tubos com os produtos das extrações também foram identificados e armazenados a - 20°C para posterior utilização nas reações de PCR.

4.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada para amplificação de um fragmento de 75 bp para o gene *GSTM1* e de 70 bp para o gene *GSTT1*, conforme protocolo descrito por Halolu, 2013. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do fragmento de *GSTM1* foram: Forward 5'ATGGTTTGCAGGAAACAAGG3' e Reverse 5'CCTCCATAACACGTGAAGCA3'. Para amplificação do gene *GSTT1* foram utilizados: Forward 5'TTCCTGGGTGAGCCAGTATC3' e Reverse 5'ACTGCAGGGTCACATCCAA3'.

Os protocolos de PCR para amplificação dos fragmentos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* estão descritos nas Tabelas 5 e 6. Todas as reações foram acompanhadas de controles positivo e negativo para verificação da eficácia da amplificação. A presença e a integridade do DNA foram verificadas por meio da amplificação de um

controle endógeno, realizado em todas as amostras negativas para *GSTM1* e *GSTT1*, concomitantemente. O controle endógeno escolhido para este estudo foi o gene da enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

Tabela 5. Protocolo de PCR para amplificação de fragmentos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*.

Reagente	[] inicial	[] final	Volume para uma reação
Tampão 10x	[10x]	[1x]	2,5 ul
MgCl ₂	50 mM	2 Mm	1,0 ul
dNTP's	2 mM	0,2 mM	2,5 ul
P ¹	2,5 uM	0,05 uM	0,5 ul
P ²	2,5 uM	0,05 uM	0,5 ul
DNA	100 ng/ul	2 ng/ul	2,0 ul
Taq. Pol.	5 U/ul	0,2 U/ul	0,5 ul
H ₂ O milli-Q	q. 5p. 25ul		15,5 ul
Total	-----	-----	25, 0 ul

Tabela 6. Protocolo de ciclagem.

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
94° C	5 minutos	01
94° C	30 segundos	
57° C	30 segundos	40
72° C	30 segundos	
4° C	Infinito	01

Após o término da PCR, os produtos da amplificação foram analisados por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e revelados pela coloração com nitrato de prata. Um marcador de peso molecular (ladder) de 50 pb da marca Invitrogen foi utilizado para análise das bandas formadas.

Após a revelação das bandas, o gel foi fotografado em câmera digital para análise dos resultados. As amostras consideradas positivas para *GSTM1* e/ou *GSTT1* foram aquelas que revelaram bandas nos pesos moleculares esperados.

Foram consideradas bandas reveladas em qualquer intensidade. As amostras consideradas negativas para *GSTM1* e/ou *GSTT1* foram aquelas que não revelaram bandas (Figura 8).

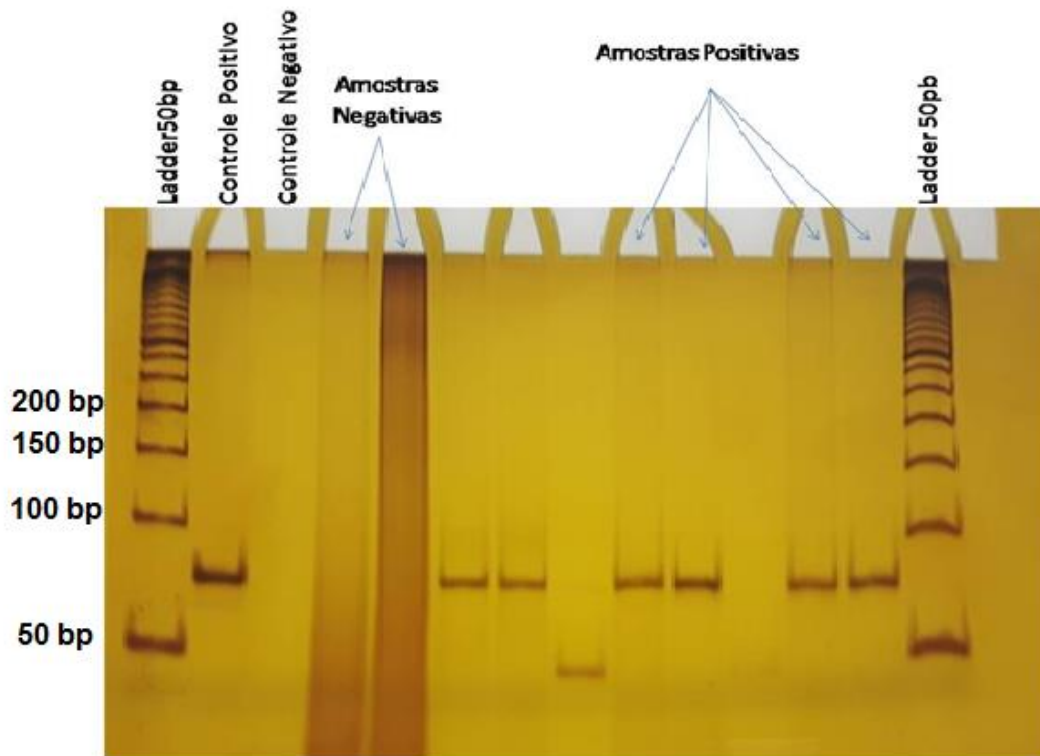


Figura 8. Gel de poliacrilamida a 8%, exibindo controle padrão de 50 pb (Ladder), controle positivo, controle negativo, amostras negativas e positivas para ampliações de um fragmento de 75 pares de bases do gene *GSTM1*.

4.4. Análise dos Dados

Os dados de todos os participantes do estudo foram transcritos para planilhas do Excel e avaliados individualmente para compor planilhas de contingência. Os dados foram comparados pelo teste do Chi-quadrado ou teste exato de Fisher, com nível de significância em 5% ($p < 0,05$), utilizando o programa Graphpad. A análise de sobrevida utilizou o método de Kaplan Meier e a comparação entre as curvas o método de Log-rank.

5. RESULTADOS

5.1. Características Sociodemográficas e Clinicopatológicas das Pacientes com Câncer de Colo Uterino

O grupo de casos foi composto por 135 mulheres com câncer de colo uterino com confirmação histopatológica. Os dados sociodemográficos das pacientes estão descritos na Tabela 7. A idade das mulheres que compõe o grupo variou de 26 a 85 anos e a média de idade foi de 49,6 anos ($\pm 14,3$). A maior frequência de mulheres era casada (40,0%). O consumo de tabaco em algum período da vida foi relatado por 44,4% das mulheres e o etilismo foi relatado por 9,6% destas. Mulheres entre 41 e 60 anos somam quase a metade (45,9%) dos casos de câncer de colo uterino deste estudo e 52,6% ainda estavam na menacme quando diagnosticaram o câncer.

Tabela 7. Análise descritiva das características sociodemográficas do grupo de pacientes com câncer.

Variável	n = 135	%
Estado civil		
Solteira	37	27,4
Casada	54	40,0
Outro	43	31,9
Não informado	01	0,7
Idade ao diagnóstico		
Até 30 anos	11	8,2
31 a 40 anos	30	22,2
41 a 50 anos	30	22,2
51 a 60 anos	32	23,7
61 a 70 anos	22	16,3
71 a 80 anos	09	6,7
81 a 90 anos	01	0,7
História de Tabagismo		
Sim	37	27,4
Não	75	55,6
Ex- tabagista	22	16,3
Masca fumo	01	0,7
História de Etilismo		
Sim	12	8,9
Não	107	79,3
Não informado	15	11,1
Ex etilista	01	0,7
Status Menstrual		
Menacme	71	52,6
Menopausa	64	47,4

As características clinicopatológicas das pacientes com câncer de colo uterino estão descritas nas Tabelas 8 (A) e 8 (B). A maioria das mulheres com câncer de colo uterino foi submetida a algum tipo de cirurgia durante o tratamento, sendo a histerectomia radical o procedimento cirúrgico mais frequente (31,1%). Quanto ao tratamento radioterápico, a combinação radioterapia + braquiterapia foi aplicada a

40,0% das participantes. Com relação ao tipo histológico, os carcinomas escamosos representam o maior número de casos (74,1%), seguido dos adenocarcinomas (17,0%). No câncer de colo uterino, o tratamento quimioterápico apresenta baixa resposta terapêutica, sendo usado apenas nos casos onde há processo metastático, o que pode ser observado neste estudo, visto que os dados de tratamento quimioterápico (12,6%) e de metástases à distância (13,3%) são quase coincidentes. Ao final de 60 meses, a mortalidade registrada foi de 23,0%.

Tabela 8 (A). Análise descritiva dos tratamentos administrados às pacientes com câncer de colo uterino

Variável	n = 135	%
Tratamento Cirúrgico		
Sim	96	71,1
Não	39	28,9
Tipo Cirúrgico		
Conização	09	6,7
HTA total	11	8,1
HTA radical	42	31,1
Conização + HTA total	10	7,4
Conização + HTA radical	24	17,8
Tratamento radioterápico		
Radioterapia externa	16	11,9
Braquiterapia	03	2,2
Radio + braquiterapia	54	40,0
Não	62	45,9
Tratamento Quimioterápico		
Sim	17	12,6
Não	118	87,4

Tabela 8 (B). Análise descritiva dos fatores prognósticos do grupo de pacientes com câncer de colo uterino.

Variável	n	%
Extensão da lesão		
I e II	106	78,5
III e IV	21	15,6
TIS	06	4,4
NE	02	1,5
Comprometimento Linfonodal		
NX	12	8,9
N0	118	87,4
N1	05	3,7
Metástase Linfonodal		
MX	01	0,7
M0	116	85,9
M1	18	13,3
Tipo Histológico		
Escamoso	100	74,1
Adenocarcinoma	23	17,0
Adeno – escamoso e colisão	12	8,9
Grau Histológico		
GI	05	3,7
GII	51	37,8
GIII	30	22,2
GX	01	0,7
NI	48	35,6
Evolução da paciente		
Viva sem doença	97	71,9
Viva com doença	07	5,2
Óbitos	31	23,0

5.2. Características das Participantes do Grupo Controle

O grupo controle foi composto por 100 mulheres saudáveis, com idade variando de 24 a 86 anos, sendo a média de 54,3 anos ($\pm 15,1$). A maioria das participantes era menopausada (58,0%). Quanto ao hábito tabagista, 27,0% das mulheres que compõem o grupo controle, declaram ter fumado em algum período da vida. Destas, 15,0% ainda fazem uso do tabaco diariamente. Os dados das participantes que compõem o grupo controle estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Características das participantes do grupo controle.

Variável	n = 100	%
Idade		
Até 30 anos	05	5,0
31 a 40 anos	15	15,0
41 a 50 anos	22	22,0
51 a 60 anos	20	20,0
61 a 70 anos	23	23,0
71 a 80 anos	11	11,0
81 a 90 anos	04	4,0
História de Tabagismo		
Sim	15	15,0
Não	73	73,0
Ex- tabagista	12	12,0
Status Menstrual		
Menacme	42	42,0
Menopausa	58	58,0

5.3. Frequência dos Polimorfismos Nulos

Os resultados dos polimorfismos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* no grupo de casos e de controles estão descritos na Tabela 10. Entre os casos, o polimorfismo nulo foi mais frequente para o gene *GSTT1* (48,5%) do que para o gene *GSTM1* (22,2%) e a dupla nulidade foi encontrada em 13,3% dos participantes.

Tabela 10. Polimorfismos nulos nos grupos de casos e controles.

Gene	Nulos (%) Casos	Presentes (%) Casos	Nulos (%) Controles	Presentes (%) Controles	<i>p</i>	OR
<i>GSTM1</i>	30 (22,2%)	105 (77,8%)	45 (45,0%)	55 (55,0%)	0,0016	0,4127
<i>GSTT1</i>	66 (48,5%)	69 (51,5%)	56 (56,0%)	44 (44,0%)	0,2808	-
<i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	18 (13,3%)	117 (86,7%)	28 (28,0%)	72 (72,0%)	0,0051	0,3956

Quanto ao grupo controle, a frequência dos polimorfismos nulos foi maior também para o gene *GSTT1* (56,0%) do que para o gene *GSTM1* (45,0%) e a dupla nulidade foi encontrada em 28,0% das participantes.

5.4. Frequência dos Polimorfismos Nulos em *GSTM1* e *GSTT1* e o Tabagismo

Os grupos de mulheres com câncer de colo uterino e sem câncer de colo uterino foram subdivididos em tabagistas e não tabagistas para possibilitar a verificação das frequências dos polimorfismos nulos e o tabagismo nos dois grupos. Das 135 participantes do grupo de casos, 60 fizeram uso do tabaco em algum período da vida. Entre os 100 controles, 27 relataram tabagismo ao longo da vida. A frequência dos polimorfismos nulos nos grupos de tabagistas e não tabagistas pode ser observada na Tabela 11.

Tabela 11. Grupos de casos e controles subdivididos em tabagistas e não tabagistas e suas respectivas frequências de polimorfismos nulos.

Variável	<i>GSTM1</i> nulo (%)	<i>GSTT1</i> nulo (%)	<i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> nulos (%)
Casos			
Tabagistas (n=60)	13 (21,7%)	23 (38,3%)	05 (8,3%)
Não tabagistas (n=75)	17 (22,7%)	43 (57,3%)	13 (17,3%)
Controles			
Tabagistas (n= 27)	11 (40,7%)	13 (48,1%)	06 (22,2%)
Não tabagistas (n= 73)	34 (46,6%)	43 (58,9%)	22 (30,1%)

5.5. Frequência dos Polimorfismos Nulos e do Tabagismo nos Fatores Prognósticos e Mortalidade

Dentre as 135 participantes do grupo de casos, 31 evoluíram a óbito em período inferior a 60 meses após o diagnóstico primário. As frequências dos polimorfismos nulos de *GSTM1* e de *GSTT1* relacionados aos fatores prognósticos e relacionados aos óbitos podem ser observadas na Tabela 12.

Tabela 12: Frequências de polimorfismos nulos, fatores prognósticos e óbitos.

Variável	<i>GSTM1</i> nulo (%)	<i>GSTM1</i> + (%)	<i>p</i>	OR	<i>GSTT1</i> nulo (%)	<i>GSTT1</i> + (%)	<i>p</i>	OR	<i>GSTM1</i> - <i>GSTT1</i> - (%)	Não <i>GSTM1</i> - / <i>GSTT1</i> - (%)	<i>p</i>	OR
Tipo Histológico												
Escamoso	20 (14,8%)	80 (59,3%)	0,293	-	51 (37,8%)	49 (36,3%)	0,400	-	13 (9,6%)	87 (64,4%)	0,847	-
Adeno + Adenoescamoso + Colisão	10 (7,4%)	25 (18,5%)			15 (11,1%)	20 (14,8%)			05 (3,7%)	30 (22,2%)		
Metástase à distância												
Sim	08 (5,9%)	10 (7,4%)	0,014	3,45	10 (7,4%)	08 (5,9%)	0,543	-	04 (3,0%)	14 (10,4%)	0,227	-
Não	22 (16,3%)	95 (70,4%)			56 (41,5%)	61 (45,2%)			14 (10,4%)	104 (77,0%)		
Metástase linfonodal												
Sim	02 (1,5%)	03 (2,2%)	0,307	-	01 (0,7%)	04 (3,0%)	0,838	-	0 (0,0%)	05 (3,7%)	0,924	-
Não	28 (20,7%)	102 (75,6%)			65 (48,2%)	65 (48,2%)			18 (13,3%)	112 (83,0%)		
Extensão da lesão												
I e II	20 (15,8%)	86 (67,7%)	0,016	0,310	46 (36,2%)	60 (47,2%)	0,006	0,239	11 (8,7%)	95 (74,8%)	0,025	0,28
III e IV	09 (7,1%)	12 (9,5%)			16 (12,6%)	05 (3,9%)			06 (4,7%)	15 (11,8%)		
Óbitos												
Sim	08 (5,9%)	23 (17,0%)	0,584	-	19 (14,1%)	12 (8,9%)	0,115	-	07 (5,2%)	24 (17,8%)	0,084	-
Não	22 (16,3%)	82 (60,7%)			47 (34,8%)	57 (42,2%)			11 (8,2%)	93 (68,9%)		

Dentre as 31 participantes que evoluíram a óbito, o polimorfismo nulo de *GSTM1* foi identificado em 25,8% destas, enquanto para *GSTT1*, a frequência foi de 61,3%. Quando a dupla nulidade esteve presente, a frequência encontrada foi de 22,6%.

Observou-se importante relação entre o hábito tabagista e o câncer ($p=0,0062$), com risco de 2,16 vezes para tabagistas desenvolverem o câncer de colo uterino (Tabela 13).

Tabela 13. Frequência do hábito tabagista entre os grupos de casos e controles.

Variável	Casos (%) (n = 135)	Controles (%) (n = 100)	p	OR
Tabagistas	60 (44,4%)	27 (27,0%)	0,0062	2,16
Não tabagistas	75 (55,6%)	73 (73,0%)		

Os óbitos relacionados ao hábito tabagista são apresentados na Tabela 14. Apesar do número de óbitos (54,8%) ser superior entre as fumantes, o consumo de tabaco não foi associado de forma significativa ao do risco de morte ($p = 0,1845$).

Tabela 14. Frequência do hábito tabagista entre os grupos de óbitos e vivos.

Variável	Óbitos (%) (n =31)	Vivos (n=104)	p valor
Tabagistas	17 (54,8%)	43 (41,3%)	0,1845
Não tabagistas	14 (45,2%)	61 (58,7%)	

No subgrupo de óbitos, a frequência dos polimorfismos duplos nulos foi mais expressiva (22,6%) do que quando comparado à frequência geral do estudo (13,3%).

5.6 Sobrevida

A sobrevida global das participantes com câncer de colo uterino, ao final de 60 meses foi de 78,5% (Figura 9).

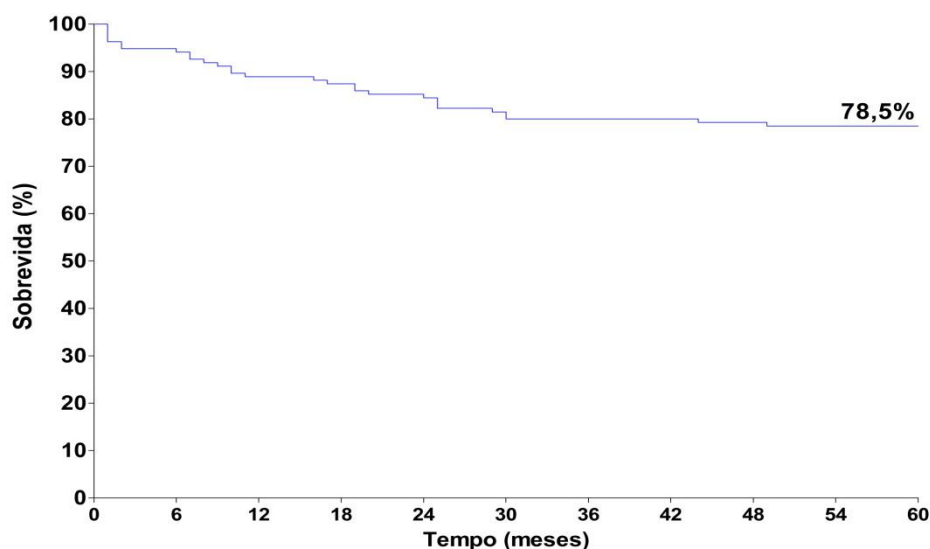


Figura 9. Sobrevida global das pacientes com câncer de colo uterino.

Quando ajustada ao genótipo *GSTM1*, a sobrevida foi de 80,0% para o genótipo *GSTM1* positivo e de 73,3% para o genótipo *GSTM1* nulo (Figura 10). A diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p=0,368$).

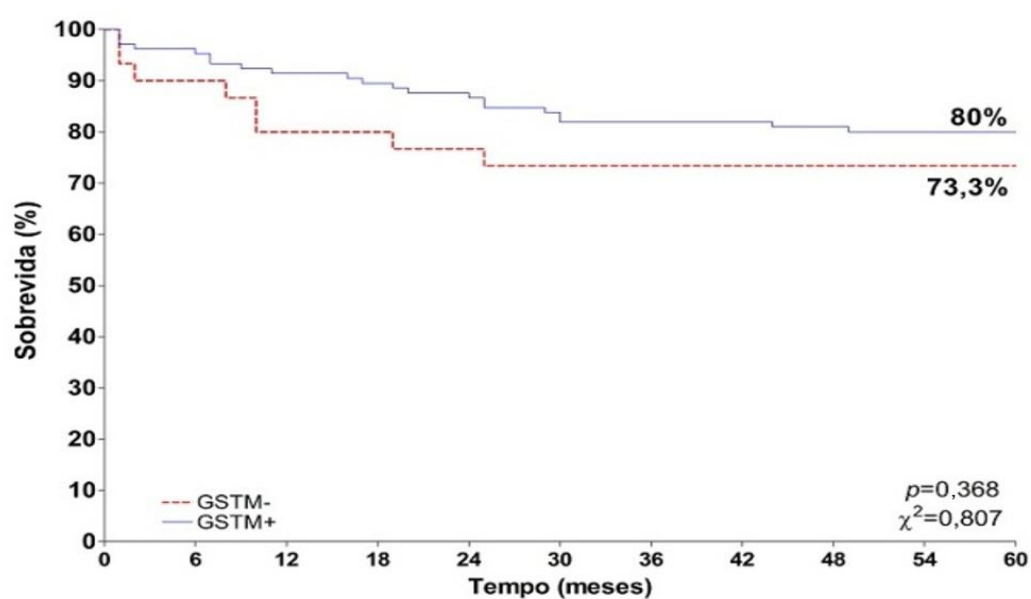


Figura 10. Sobrevida ajustada ao genótipo *GSTM1*.

Para *GSTT1*, a sobrevida ajustada ao genótipo positivo foi de 85,5%, enquanto para *GSTT1* nulo foi de 71,2% (Figura 11). A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p=0,034$) e o risco para o óbito foi de 2,2 quando o genótipo nulo foi detectado.

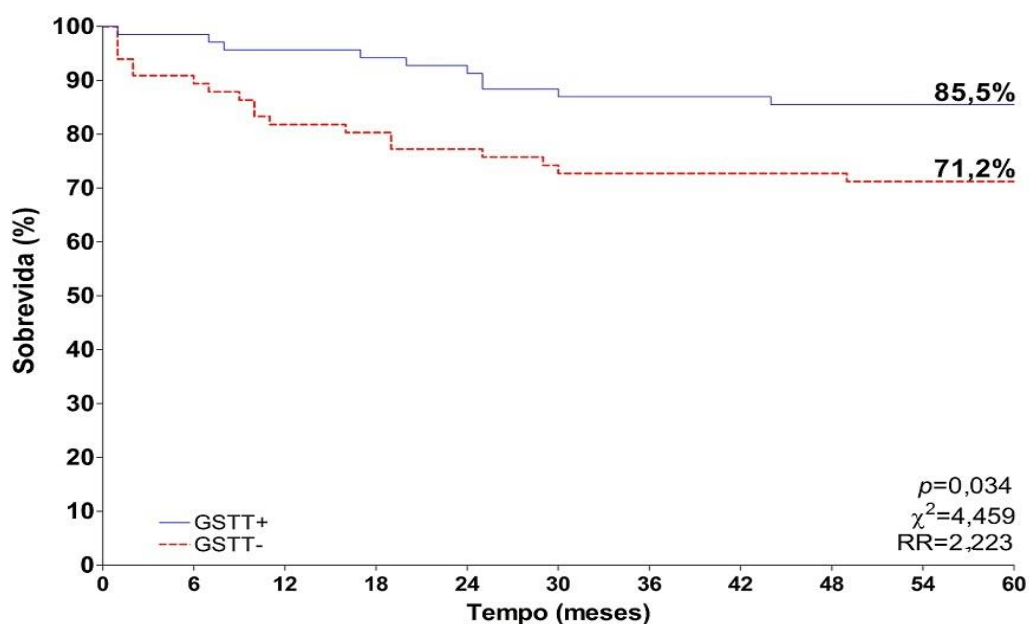


Figura 11. Sobrevida ajustada ao genótipo *GSTT1*.

Quando os genótipos foram avaliados de forma combinada, a sobrevida das pacientes que apresentam a dupla nulidade foi de 61,1%, enquanto a sobrevida daquelas que possuíam ao menos um dos alelos com genótipo positivo foi de 81,2% (Figura 12). Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,031$), com risco de óbito de 2,5 vezes para a condição de dupla nulidade.

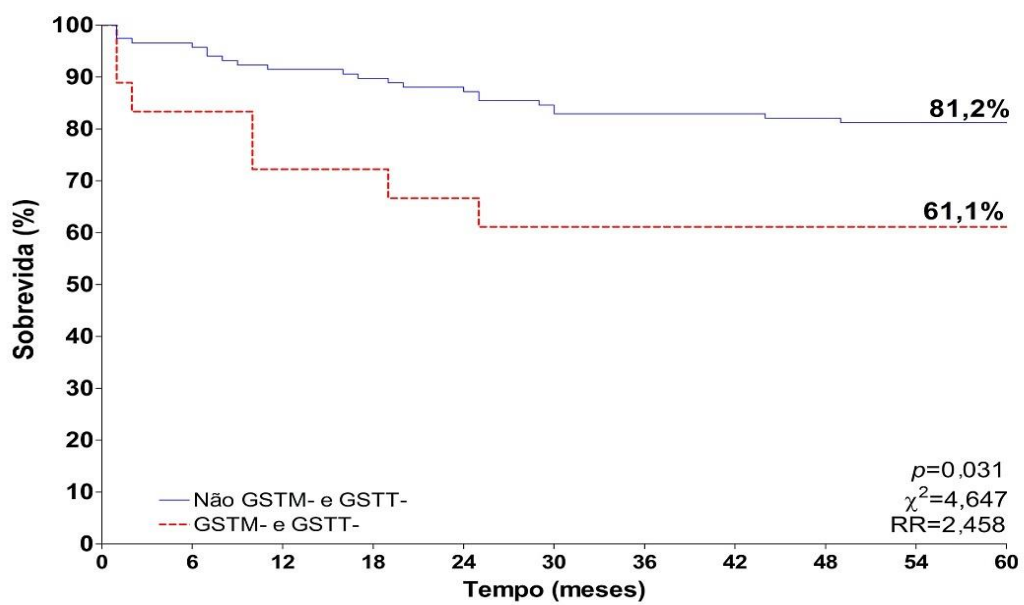


Figura 12. Sobrevida ajustada ao genótipo duplo nulo.

6. DISCUSSÃO

As análises dos dados deste estudo mostraram diferença significativa entre as frequências dos polimorfismos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* em grupo de pacientes com câncer de colo uterino e controles. Uma associação significativa ($p=0,0016$) para o polimorfismo nulo de *GSTM1* e o câncer de colo uterino, sugere que o genótipo positivo para *GSTM1* confira apenas melhor prognóstico para a doença (OR=0,4127). Relação importante entre *GSTM1* nulo e a presença de metástases à distância foi observada ($p=0,014$), uma vez que o genótipo presente de *GSTM1* reduziria o risco de metástases em aproximadamente 3,5 vezes.

Outros fatores prognósticos importantes como acometimento linfonodal, extensão da lesão e o número de óbitos, se mostraram menos frequentes na presença do genótipo positivo para *GSTM1*. Quanto aos óbitos, apesar de não se mostrar estatisticamente significante ($p=0,084$), observou-se que a maioria dos pacientes vivos, ao final do estudo (68,9%), apresentou genótipo funcional, ou seja, alguma atividade enzimática, em relação aos portadores do genótipo nulo combinado para os dois genes estudados. Esse dado se reflete na sobrevida que se mostrou maior em todas as situações onde havia ao menos um genótipo positivo, indicando risco de óbito na presença de dupla nulidade ($p=0,031$; RR=2,458).

Apenas um estudo avaliou a sobrevida associando os polimorfismos de *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes com câncer de colo uterino. Neste estudo os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* foram associados à maior sobrevida e menor risco de morte quando detectada nulidade dos genes (Abbas *et al.*, 2015). É importante ressaltar que no referido estudo, houve associação ao tratamento aplicado, onde todas as participantes estavam em estágios avançados da doença e foram submetidas a tratamento com cisplatina que é um quimioterápico detoxificado

pelas GST. Portanto a discordância entre os resultados pode ser explicada pela especificidade do grupo avaliado. Sabe-se que a superexpressão das GST em células tumorais pode determinar resistência ao tratamento com cisplatina ou compostos derivados e, neste caso, a nulidade genética seria favorável a esses indivíduos (Abbas *et al.*, 2015).

Em relação ao tabagismo, não foram observadas diferenças significativas entre os polimorfismos nulos e o número de óbitos ($p=0,1845$), porém a relação já bem estabelecida em outros estudos (Phillips & Venitt, 2012; Sobus & Warren, 2014; Wei *et al.*, 2014), entre o tabaco e o risco para o câncer, também foi observada em nosso estudo ($p=0,0062$; OR= 2,163).

Vários estudos vêm tentando esclarecer a relação entre os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* e variados tipos de câncer, como o de bexiga, pulmão, próstata, rins, ovário, cabeça e pescoço e outros (Leme *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2010; Haholu *et al.*, 2013; Matic *et al.*, 2013). Entretanto, devido à relação já bem consolidada entre o câncer de colo uterino e o HPV, os estudos acerca desses polimorfismos associados à cérvix uterina, não são tão frequentes e exibem diferenças entre as populações. Com os relatos de presença de carcinógenos derivados de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no muco cervical, o interesse pelo estudo das enzimas detoxificadoras passou a se ampliar para outros sítios anatômicos, como o colo uterino.

No Brasil, só um estudo publicado (Carvalho *et al.*, 2008) investigou a frequência dos polimorfismos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* em adenocarcinomas cervicais e controles sem câncer. Assim, nosso estudo é o único no Brasil a investigar a frequência dos polimorfismos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* no câncer de colo uterino incluindo os tipos histológicos escamosos, mistos e adenocarcinomas e,

além disso, relacionar com controles saudáveis. Os outros estudos brasileiros acerca do tema investigaram apenas a frequência do polimorfismo na população em geral ou avaliou os genótipos nulos em neoplasias em outros sítios anatômicos (Losi-Guembarovski & Cólus, 2001; Gattás *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2010; Leme *et al.*, 2010).

A relação entre os polimorfismos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* com o câncer de colo uterino é controversa em diferentes populações. Em estudos realizados em diferentes países como Índia (Joseph *et al.*, 2006), Itália (Palma *et al.*, 2010) e Casaquistão (Djansugurova *et al.*, 2013), o polimorfismo nulo de *GSTM1* e *GSTT1* foi considerado fator de risco para o desenvolvimento do câncer de colo uterino. Já em outros estudos, em países como Tailândia (Ishida *et al.*, 2009), Turquia (Kiran *et al.*, 2010) e Sérvia (Stosic *et al.*, 2014), o polimorfismo nulo de *GSTM1* e *GSTT1* não foi fator de risco para o câncer de colo uterino. Em estudo realizado na Colômbia (Sierra-Torres *et al.*, 2006), os polimorfismos nulos em *GSTM1* e *GSTT1* não afetaram o risco para as lesões intraepiteliais de alto grau, sugerindo outros fatores como mais importantes para a evolução ao câncer, como infecções por HPV de alto risco, exposição a compostos mutagênicos e polimorfismos em outros genes do metabolismo, como o *CYP2E1*.

As discordâncias entre estudos podem ser explicadas principalmente pelas diferentes frequências desses polimorfismos em diferentes populações, que podem variar de 26,0% em africanos a 53,1% em caucasianos (Natphopsuk *et al.*, 2015). Além disso, outros fatores podem estar associados ao favorecimento ou não do desenvolvimento do câncer, como o estilo de vida e exposição ambiental a xenobióticos.

Recente estudo publicado reafirma estudo prévio realizado na Tailândia e conclui que a deleção de *GSTM1* não é fator de risco para o câncer de colo uterino. Este estudo parece ter maior acurácia, uma vez que não apenas o genótipo nulo para *GSTM1* foi pesquisado e sim, as variantes heterozigotas para esse gene (Natphopsuk *et al.*, 2015).

Algumas limitações foram encontradas para o desenvolvimento deste estudo, como o tamanho amostral, a falta de informações em prontuários e as limitações das técnicas moleculares utilizadas. Para o tamanho amostral, apesar dos esforços, não foi possível obedecer à amostra populacional calculada estatisticamente, tornando-se, portanto, amostragem por conveniência. Quanto à técnica molecular, a PCR convencional não nos permite a diferenciação entre homozigotos e heterozigotos, limitando nossos resultados ao genótipo nulo ou presente.

Por meio dos resultados encontrados, acreditamos que *GSTM1* nulo não é fator de risco para o câncer de colo uterino. Para *GSTM1* concluímos que seu genótipo funcional é fator de melhor prognóstico para os cânceres de colo uterino. Assim, o genótipo nulo de *GSTM1* também não se caracteriza como fator preditivo para o câncer em questão.

Novos estudos com câncer cervical e metabolismo de xenobióticos devem abranger outros genes que atuem sinergicamente na tarefa de eliminar os compostos tóxicos e mutagênicos do organismo. A inclusão de genes da família do citocromo P450 e o estudo detalhado das GST, incluindo heterozigotos, poderiam aumentar as possibilidades de elucidação dos fatores que predispõe o câncer de colo uterino.

7. CONCLUSÕES

- ✓ Os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* não conferem risco para o câncer de colo uterino na população estudada.
- ✓ A frequência do polimorfismo nulo para o gene *GSTT1* foi maior do que para o polimorfismo nulo em *GSTM1* na população estudada.
- ✓ O tabagismo foi mais frequente no grupo de pacientes com câncer e esteve associado significativamente ao câncer de colo uterino.
- ✓ O genótipo *GSTM1* presente esteve associado significativamente ao melhor prognóstico dos tumores, diminuindo o risco de metástases.
- ✓ A sobrevivência ao final de 60 meses foi maior na presença de ao menos um genótipo positivo indicando risco de óbito na presença de dupla nulidade ($p=0,031$; $RR=2,458$).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS M. *et al.* Association of *CYP1A1* gene variants rs4646903 (T>C) and rs1048943 (A>G) with cervical cancer in a North Indian population. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** 2014.

ABBAS M. *et al.* Glutathione S-Transferase Gene Polymorphisms and Treatment Outcome in Cervical Cancer Patients under Concomitant Chemoradiation. **Plos One.** 2015, 10 (11).

AGGARWAL, P. Cervical cancer: Can it be prevented? **World Journal of Clinical Oncology.** 5(4): 775 – 780. 2014.

AGORASTOS, T. *et al.* Glutathione-S-transferase M1 and T1 and cytochrome P1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to cervical intraepithelial neoplasia in Greek women. **European Journal of Cancer Prevention,** 2007, (16): 498-504.

ALBERTS B. *et al.* Biologia Molecular da Célula. **Câncer. Artmed.** 5 ed. 2010.

ANDRADE, L. A. L. D. A. Diagnóstico Histológico das Neoplasias Glandulares Intra-epiteliais e invasivas. In: COELHO, R. F. G.*et al.* Câncer do colo do útero. São Paulo. **Tecmedd.** 2008.

ANDRADE, L. N. S.; CHAMMAS, R. Biologia da célula tumoral: uma visão ecológica. In: COELHO, R. F. G.*et al.* Câncer do colo do útero. São Paulo. **Tecmedd.** 2008.

APGAR, B. S. *et al.* Colposcopia - Princípios e Prática. Atlas e Texto. **Revinter.** 2 ed. 2010.

AYRES, A. R. G.; AZEVEDO & SIVA, G. Infecção cervical pelo HPV no Brasil. **Rev. Saúde Pública.** 44(5): 963 – 974. 2010.

BOBDEY, S. *et al.* Cancer Screening: Should Cancer Screening be Essential Component of Primary Health Care in Developing Countries? **International Journal of Preventive Medicine.** 6:56. 2015.

BODILY, J.; LAIMINS, L. A. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. **Cell.** 2011, vol 19, n 1.

BRUCKNER, J. V. *et al.* Efeitos Tóxicos de Solventes e Vapores. In: KLAASSEN, C. D. e WATKINS J. B. Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull. 2 ed. **Artmed,** 2012.

CAMPANER, A. B.*et al.* Importância do tabagismo na carcinogênese do colo uterino. **Femina.** Vol 35. nº 11. Novembro 2007.

CARREIRO, D. M. Terapia Nutricional no Estresse Oxidativo. In: SILVA, S. M. C. S; MURA, J. D. P. Tratado de Alimentação. **Nutrição e Dietoterapia.** 2 ed. Roca. 2011.

CARVALHO, C. R. *et al.* Polymorphisms of p53, *GSTM1* and *GSTT1*, and HPV in uterine cervix adenocarcinoma. **Eur J Gynaecol Oncol.** 2008; 29(6):590-3.

CASSARETT & DOULLS, Toxicology, the basic science of poisons. 7^o edição; C. D. Kaassen 2008.

COELHO, R. F. G. *et al.* Cancer do colo do útero. **Tecmedd.** São Paulo. 2008.

DJANSUGUROVA, L. B. *et al.* The determination of genetic markers of age-related cancer pathologies in populations from Kazakhstan. **Frontiers in Genetics** 2013, (4): article 70.

DOORBAR, J. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine.** 2012. F55-70.

ERICKSON, B. K.; ALVAREZ, R. D.; HUH, W. K. Human papillomavirus: What every provider should know. **American Journal of Obstetrics and Gynecology.** 2013.

FAVARO, R. Ciclo celular e mitose. In: SIVIERO, F. **Biologia celular: bases moleculares e metodologia de pesquisa.** 1 ed. São Paulo: Roca. 2013.

FERRAZ, L. C.; SANTOS, A. B. R.; DISCACCIATI, M. G. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **J Health Sci Inst.** 30(2): 107 – 11. 2012.

GADDUCCI, A. *et al.* Smoking habit, immune suppression, oral contraceptive use, and hormone replacement therapy use and cervical carcinogenesis: a review of the literature. **Gynecological Endocrinology**, 27(8): 597 – 604. August 2011.

GAO, L. *et al.* Null Genotypes of *GSTM1* and *GSTT1* Contribute to Risk of Cervical Neoplasia: An Evidence-Based Meta-Analysis. **Plos One.** Vol 6. 2011.

GATTÁS, G. I. F. *et al.* Ethnicity and glutathione S-transferase (*GSTM1/GSTT1*) polymorphisms in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** (37):451 – 458. 2004.

GRAVITT, P. E. The know unknowns of HPV natural history. **The Journal of Clinic Investigations.** Vol 121.n^o 12. December, 2011.

GUEMBAROVSKI, R. L.; CÓLUS, I. M. S. Glutathione S-Transferase M1 (*GSTM1*): ethnic distribution and relation with cancer. **Semina: Ci. Biol. Saúde.** (22): 3 - 9. Londrina. 2001.

HALEC, G. *et al.* Pathogenic role of the eight probably/possibly carcinogenic HPV types 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 and 82 in cervical cancer. **J Payhol.** 2014 (4): 441-451.

HAHOLU, A. *et al.* Is There any association of Glutathione -S-Transferase T1 (*GSTT1*) and Glutathione-S-transferase M1 (*GSTM1*) gene polymorphism with gastric cancers? **Pol J Pathol** 2013; 64 (4): 247-252.

IARC. A Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer Biology and Therapy*. 11: 3, 295-306, 2011. Disponível em https://globocan.iarc.fr/pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=cervix

IBEANU O. A. Molecular pathogenesis of cervical cancer. **Cancer Biology and Therapy** 11: 3, 295-306, 2011.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, p. 1-124, 2014.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>

ISHIDA, W. et al. Glutathione S-Transferase (*GSTM1* and *GSTT1*) Polymorphisms in Cervical Cancer in Northeastern Thailand. **Asian Pacific J Cancer Prev** 2009; (10): 365-368.

JOSEPH, T. et al. Germline genetic polymorphisms of *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* genes in Indian cervical cancer: Associations with tumor progression, age and human papillomavirus infection. **Gynecologic Oncology**. (101): 411-417. 2006.

JUNIOR, J. E.; GIRALDO, P. C; GONÇALVES, A. K. Marcadores imunoistoquímicos de lesões precursoras do câncer de colo uterino associados ao HPV: O papel da proteína de supressão tumoral p16INK4A. **J. Bras. Doenças Sex. Transm.** 18(1): 62 – 65. 2006.

KIRAN, B. et al. GST (*GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1*) polymorphisms in the genetic susceptibility of Turkish patients to cervical cancer. **J Gynecol Oncol**. vol 21. n. 3:169 – 173.2010.

KLASSEN, D. C. & WATKINS, J. B. Fundamentos em Toxicologia de Cassaret e Doull. **Artmed**, 2. ed, 2012.

KLEPPA, E. et al., Cervical ectopy: associations with sexually transmitted infections and HIV. A cross-sectional study of high school students in rural South Africa. **Sex Transm Infect** 2015; 91:124-129.

KOSS, L. G.; Gompel, C. Introdução à citopatologia ginecológica com correlações histológicas e clínicas. São Paulo: **Roca**. 2006.

LAMB, J. et al. Cigarette smoking and the frequency of colposcopy visits, treatments and re-referral. **Nurs Prox NZ**. mar (29) (1): 24 – 33. 2013.

LAX, S. Histopatologia of cervical precursor lesions and cancer. **Acta Dermatoven APA**. Vol 20.n 3. 2011.

LEME, C. D. et al.; Análise dos genes *GSTT* e *GSTM* em pacientes com cancer de cabeça e pescoço. **Rev Assoc Med Bras**. 56(3): 299 – 303. 2010.

LI Y, et al. *CYP1B1 C4326G* polymorphism and susceptibility to cervical cancer in Chinese Han women. **Tumour Biol.** 2013 Dec; 34(6):3561-7.

LIU, Z. C. *et al.* Multiple Sexual Partners as a Potential Risk Factor for Cervical Cancer: a Meta-analysis of Epidemiological Studies. **Asian Pacific Journal Cancer Prevention.** Vol 16. 2015.

MAC Graw, S. L.; FERRANTE, J. M. Update on prevention and screening of cervical cancer. **World Journal of Clinical Oncology.** 10, 5 (4): 744 – 752. October 2014.

MARQUES, C. L. T. Q. *et al.* Estadiamento. Oncologia Uma abordagem multidisciplinar. Recife. **Carpe Diem.** 2015.

MATIC, M. *et al.* *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1*, and *GSTT1* polymorphisms and susceptibility to smoking-related bladder cancer: A case-control study. **Urologic Oncology**, 2013, (31): 1184-1192.

MUÑOZ, N.*et al.* Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine.** 24S3 (2006) S3/1-S3/10.

NATPHOPSUK, S. *et al.* Lack of Participation of the *GSTM1* Polymorphism in Cervical Cancer Development in Northeast Thailand. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.** 2015 (16): 1935-1937.

NISHINO, K. *et al.* Cigarette smoking and glutathione S- transferase M1 polymorphism associated with risk for uterine cervical cancer. **J. Obstet. Gynaecol**, 2008, 6 (34): 994-1001.

NIWA, Y. *et al.* Association of the NAD(P)H: quinine oxidoreductase C609T polymorphism and the risk of cervical cancer in Japanese subjects. **Gynecologic Oncology**, 2005 (96): 423-429.

OLIVEIRA, A. L. *et al.* *GSTT1*, *GSTM1*, and *GSTP1* polymorphisms and chemotherapy response in locally advanced breast cancer. **Genetics and Molecular Research.** 9 (2): 1045-1053 (2010).

PALMA, S. *et al.* Interaction between glutathione-S-transferase polymorphisms, smoking habit, and HPV infection in cervical cancer risk. **J Cancer Res Clin Oncol**, 2010, (136): 1101-1109.

PHILLIPS, D. H.; VENITT, S. DNA and protein adducts in human tissues resulting from exposure to tobacco smoke. **International Journal of Cancer:** 131: 2733 – 2753. 2012.

REBBECK, T. R. Molecular Epidemiology of the Human Glutathione S – Transferase Genotypes *GSTM1* and *GSTT1* in Cancer Susceptibility. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.** Vol 6. 1997: 733-743.

RESENDE, L. S. A. *et al.* A portrait os single and multiple HPV type infections in Brazilian women of different age strata with squamous or glandular cervical lesions. **BMC Infectious Diseases** 2014, 14:214.

RIBEIRO, A. A. *et al.*, HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors. **Infectious Angents and Cancer**. 2015. 10:16.

RODRIGUES, F. F. O. *et al.* Estadiamento Cirúrgico. In: COELHO, R..F. G. *et al.* Cancer do colo do útero. São Paulo. **Tecmedd**. 2008.

RODRIGUES, I. L. *et al.* Evaluation of the influence of polymorphic variants *CYP1A1*2B*, *CYP1B1*2*, *CYP3A4*1B*, *GSTM1*0*, and *GSTT1*0* in prostate cancer. **Urologic Oncology**. Vol 29, 6 : 654–663.

ROSZAK, A. *et al.* *CYP1A1 Ile462Val* Polymorphism as a Risk Factor in Cervical Cancer Development in the Polish Population. **Mol DiagnTher**. 2014 Mar 14.

ROURA, E. *et al.* Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. **Int J Cancer**. Doi: 10.1002/ijc:28666. 2013.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHIFFMAN, M. *et al.* Human Papillomavirus Testing in the Prevention os Cervical Cancer. **JNCI**. Vol 103. 5. 2011.

SIERRA-TORRES, C. H. *et al.*, Exposure to Wood Smoke, HPV infection and Genetic Susceptibility for Cervical Neoplasia Among Women in Colombia. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 47: 553-561, 2006.

SILVAFILHO, A. L. Emprego dos marcadores de prognóstico no tratamento para o carcinoma invasor de colo uterino. **Ver Bras Ginecol e Obstet**. 31(9): 468 – 473. 2009.

SILVA NETO, J. C. Citologia do trato genital feminino. Rio de Janeiro. **Revinter**. 2012.

SINGH, H. *et al.* Association of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTM3* gene polymorphisms and susceptibility to cervical cancer in a North Indian population. **American Journal of Obstetrics and Gynecology** 303. 2008.

SINGH, N.; ARIF, S. Histopathologic parameters of prognosis in cervical cancer – a review. **Int J Gynecol cancer**.14: 741 – 750. 2004.

SOBTI, R. C. *et al.* Interaction of passive smoking with GST (*GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1*) genotypes in the risk of cervical cancer in India. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, 2006, (166): 117-123.

SOBUS, S.; WARREN, G. W. The Biologic Effects of Cigarette Smoke on Cancer Cells. **Cancer**, December 1. 2014.

SOLOMON, D.; NAYAR, R. Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal - Definições, critérios e notas explicativas. **Revinter**. 2 ed. 2005.

STOSIC, I. et al. Glutathione S-Transferase T1 and M1 Polymorphisms and Risk of Uterine Cervical Lesions in Women from Central Serbia. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 2014, (15): 3201-3205.

TEKE, F. *et al.* Evaluation of outcome and prognostic factors in 739 patients with uterine cervix carcinoma: a single institution experience. **Contemp Oncol (Pozn)**. 19 (2): 130 – 136. 2015.

UCHIMURA, N. S. *et al.* Os efeitos do tabagismo na densidade das células de Langerhans do colo uterino. **Acta Scientiarum. Health Sciences**. Vol. 26. nº2. p. 369 – 373. Maringá. 2004.

VINEIS, P. *et al.* Tobacco and Cancer: Recent Epidemiological Evidence. **Journal of the National Cancer Institute**. Vol 96.nº 2. 2004.

WAGGONER, S. E. Cervical Cancer. **The Lancet**. Vol 361. June 28. 2003.

WALBOOMERS J. M. M. *et al.* Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**. 189: 12-19, 1999.

WEI, L. *et al.* Tobacco exposure results in increased E6 and E7 oncogene expression, DNA damage and mutation rates in cells maintaining episomal human papillomavirus 16 genomes. **Carcinogenesis**. Vol 35.10: 2373-2381. 2014.

ZHANG, Z. Y. *et al.* Meta-analysis of the Association Between *GSTM1* and *GSTT1* Gene Polymorphisms and Cervical Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. Vol 13. 2012.

ANEXOS

ANEXO 1

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO TABAGISMO E ETILISMO EM CARCINOMAS DE CAVIDADE ORAL E CARCINOMAS DE COLO UTERINO

Pesquisador: VERA APARECIDA SADDI

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 45582615.5.0000.0031

Instituição Proponente: ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CANCER EM GOIAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.128.857

Data da Relatoria: 24/06/2015

Apresentação do Projeto:

ja apresentados e apos explicações pertinentes

Objetivo da Pesquisa:

ja apresentados

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

melhor esclarecidas

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

todos comentarios ja apresentados

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

termos de acordo

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

esclarecimentos aceitos apos explicações do pesquisador e mudanças do TCLE ficaram de acordo com as normas

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO

CEP: 74.605-070

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepaccg@accg.org.br

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS -



Continuação do Parecer: 1.128.857

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

parecer acatado

GOIANIA, 29 de Junho de 2015

Assinado por:

Elismauro Francisco de Mendonça
(Coordenador)

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO

CEP: 74.605-070

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepaccg@accg.org.br

ANEXO 2

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS E ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

Projeto: ESTUDO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM GSTM1 E GSTT1 E SUAS POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES AO TABAGISMO E AO CÂNCER CERVICAL.

Prontuário: _____ Data do diagnóstico: ____/____/____

Nome: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ Telefone: _____

Estado civil: (1) Solteiro (2) Casado (3) Outro (4) Não informado

Escolaridade: (1) Fundamental (2) Ens. Médio (3) Superior (4) Não informado

Idade à primeira relação sexual: _____ (1) Não informado

Opção sexual: (1) Homossexual (2) Heterossexual (3) Não informado

Antecedente câncer (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Histórico familiar (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Tabagismo: (1) Sim (2) Não (3) Ex tabagista (4) Não informado

Frequência: (1) Às vezes (2) Diariamente (3) Não informado

Quantidade: (1) < 1 maço (2) de 1 a 3 maços (3) > 3 maços

Etilismo: (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Frequência: (1) Às vezes (2) Diariamente (3) Não informado

Tipo de bebida: (1) Destilados (2) Fermentado (3) Não informado

Uso de anticoncepcionais orais: (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Status menstrual: (1) Menacme (2) Menopausa (3) Não informado

DIAGNÓSTICO

Exame ginecológico: ____/____/____ Resultado: _____

Diagnóstico citológico: ____/____/____ Resultado: _____

Diagnóstico por biópsia: ____/____/____ Tipo de biópsia: _____

Resultado: _____

Diagnóstico por cirurgia: ____/____/____ Resultado: _____

Outras informações: _____

Número do AP a ser analisado: _____ Data do exame: ____/____/____

TRATAMENTO CIRÚRGICO: (1) Sim (2) Não

TIPO CIRÚRGICO: (1) Conização (2) Histerectomia total (3) Histerectomia Radical

TRATAMENTO RADIOTERÁPICO: (1) Radioterapia externa (2) Braquiterapia

TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO: (1) Sim (2) Não

ESTADIAMENTO CLÍNICO: _____

Tamanho do tumor: _____ (1) Não específico

Extensão da lesão: (1) IA (2) IB (3) IIA (4) IIB (5) IIIA (6) IIIB (7) IVA
(8) IVB (9) Não especificado

Comprometimento linfonodal: (1) NX (2) NO (3) N1, LN comprometidos _____

Local _____

Metástase: (1) MX (2) MO (3) M1, Local: _____

DADOS ANTAMO PATOLÓGICO

Tipo histológico: (1) Ca Escamoso (2) Adenocarcinoma (3) Adeno-escamoso

(4) Outros _____

Grau tumoral _____ Índice mitótico _____

Levantamento da quantidade de biopsias e características das peças:

EVOLUÇÃO DO PACIENTE:

(1) Viva, sem evidência de doença, último seguimento ____/____/____.

(2) Viva, com evidência de doença, último seguimento ____/____/____.

(3) Óbito, data ____/____/____.

Coletado por: _____, em ____/____/____.

ANEXO 3

Projeto de Pesquisa:

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO TABAGISMO E ETILISMO EM CARCINOMAS DE CAVIDADE ORAL E CARCINOMAS DE COLO UTERINO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO GRUPO CONTROLE – COLO DO ÚTERO

Pesquisador Responsável (orientadora): Dra. Vera Aparecida Saddi

Mestrandas envolvidas no projeto:

Ana Karolina Lopes

Ana Lúcia Munaro Tacca

Jodiê do Amaral Sodário Costa

Você está sendo convidado (a) para participar voluntariamente de um projeto de pesquisa intitulado: “ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO TABAGISMO E ETILISMO EM CARCINOMAS DE CAVIDADE ORAL E CARCINOMAS DE COLO UTERINO”. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade.

Antes de decidir se você aceita participar, é importante que entenda porque esta pesquisa está sendo realizada, os seus objetivos, todos os procedimentos a serem realizados, os possíveis benefícios, riscos e desconfortos.

A qualquer momento, antes, durante e depois da pesquisa, você poderá solicitar maiores esclarecimentos. Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis, Dra. Vera Aparecida Saddi, nos telefones: (62) 8247-9596 ou com as mestrandas: Ana Lucia Munaro Tacca, Ana Karolina Lopes ou Jodiê do Amaral Sodário Costa, telefone (62)8167-3178. Se você tiver alguma dúvida sobre os seus direitos ou questões éticas como participante de pesquisa, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, situado no endereço: Rua 239 no. 206 – 2º. Andar, Setor Leste Universitário, Goiânia, Goiás, pelo telefone (62) 32437050 no horário de 8:00 às 17:00 h ou pelo e-mail: cepaccg@accg.org.br.

Você tem total liberdade para recusar sua participação. Esta recusa em nada interferirá na assistência que você receberá e você não será penalizado (a) ou responsabilizado de forma alguma. Se aceitar participar e depois retirar seu consentimento em nada será prejudicado (a).

Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o pesquisador e/ou equipe de pesquisa terão conhecimento de sua identidade e nos comprometemos a mantê-la em sigilo ao publicar os resultados dessa pesquisa.

Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias, sendo a primeira de guarda e confidencialidade do Pesquisador (a) responsável e a segunda ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

O câncer do colo do útero é um problema de saúde pública importante e ocupa a segunda posição entre os cânceres que acometem as mulheres. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, o principal é a infecção pelo Papilomavírus humano (HPV). Porém o HPV sozinho não é suficiente para o desenvolvimento desse câncer e outros fatores de risco vêm sendo estudados, como o tabagismo (hábito de fumar) e fatores genéticos que podem aumentar a chance da mulher desenvolver esse câncer.

Em uma determinada população, as pessoas são muito parecidas umas com as outras, porém, existem diferenças no material genético (DNA) dos indivíduos, que podem estar associadas a uma maior ou menor chance de desenvolver certas doenças. No caso do câncer do colo do útero, essas diferenças individuais estão associadas principalmente com a capacidade do organismo humano transformar e eliminar as substâncias químicas, como aquelas presentes no cigarro. Sendo assim, diferenças genéticas podem determinar se o indivíduo tem maior ou menor chance de desenvolver doenças associadas ao cigarro, como o câncer do colo do útero.

O objetivo deste projeto de pesquisa consiste em avaliar a frequência de variações genéticas em um grupo de pacientes com câncer do colo do útero e um grupo controle, formado por indivíduos que não apresentam história pessoal ou familiar do colo do útero.

O material genético (GSTT1 e GSTM1) a ser estudado está presente em células do sangue. As variações a serem estudadas estão relacionadas com a capacidade do indivíduo transformar e eliminar as substâncias químicas do cigarro. Essas variações genéticas podem tornar o indivíduo mais ou menos sensível às substâncias tóxicas do cigarro e dessa forma desenvolver ou não um câncer do colo do útero.

Como você é uma pessoa saudável, fará parte do grupo controle, sem história pessoal ou familiar de câncer do colo do útero e os dados a serem estudados em uma amostra do seu sangue serão comparados com aqueles estudados em mulheres com câncer do colo do útero.

Caso você aceite participar, deverá assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e doar uma amostra de sangue. A amostra usada será apenas a que sobrar da sua coleta normal para os exames de rotina, para os quais você procurou este laboratório. Esta amostra (2ml) será transferida ao **Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia da Associação de Combate ao Câncer em Goiás**, sob a responsabilidade da coordenadora do laboratório, Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi, que é a pesquisadora responsável pelo presente projeto. As amostras sanguíneas colhidas de todos os participantes da pesquisa serão armazenadas em um freezer e formarão uma coleção de amostras, que é chamada de biorrepositório, ou seja um repositório de material biológico. Essas amostras serão usadas para os exames de variação genética (GSTT1 e GSTM1) mencionados neste projeto de pesquisa, e se você concordar, poderão ser utilizadas para o desenvolvimento de outras pesquisas futuras, desde que avaliadas e aprovadas pelos Comitês de Ética em Pesquisa das instituições responsáveis. A princípio, essas amostras serão guardadas durante cinco anos, até que o estudo seja concluído e os resultados obtidos sejam publicados em revistas científicas. Após o período de cinco anos, o material biológico coletado (alíquota sanguínea) poderá ser usado em outras pesquisas, se você concordar, ou ser descartado,

conforme as normas vigentes de órgãos técnicos competentes, mantendo sempre em sigilo a identidade dos sujeitos da pesquisa.

O procedimento de coleta será realizado por um profissional treinado, seguindo as normas de segurança estabelecidas e evitando maiores riscos. Entretanto, caso você apresente algum problema médico ou desconforto durante ou após a coleta da amostra, o pesquisador lhe prestará assistência total e você receberá atendimento e acompanhamento médico integral.

Os resultados do presente estudo deverão contribuir para o conhecimento das variações genéticas na população do Estado de Goiás e identificar as pessoas mais ou menos sensíveis às substâncias tóxicas do cigarro.

Caso você queira conhecer os resultados desta pesquisa com mais detalhes, você pode procurar os pesquisadores responsáveis a qualquer momento, por meio do email (verasaddi@gmail.com) ou pelo telefone (62)82479596.

A pesquisa não oferece um benefício direto para você, mas os achados do estudo possibilitarão o desenvolvimento de medidas de prevenção mais eficazes e tratamentos cada vez mais específicos e individualizados para o câncer do colo do útero, além de explicar melhor os efeitos do cigarro no organismo da mulher. Não existe outra forma de obter dados sobre o procedimento em questão e que possa ser mais vantajosa.

Este estudo não acarretará nenhuma despesa ou compensação para você, pois a conversa com o pesquisador, a assinatura do TCLE e a coleta serão realizadas durante sua coleta para exames de rotina. Contudo, caso haja alguma despesa gerada pela sua participação na pesquisa, ou caso seja comprovado algum dano decorrente de sua participação na pesquisa, você terá garantido seu ressarcimento integral.

Você tem o direito garantido de requerer indenização em caso de danos, comprovadamente decorrentes da sua participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

A sua participação no estudo é voluntária, se resumirá ao período de leitura do TCLE e coleta da amostra sanguínea, que deverão durar cerca de 30 minutos, não sendo necessário seu comparecimento em qualquer consulta médica ou exame extra para este estudo. Você tem total liberdade para retirar o consentimento para a pesquisa a qualquer momento.

Local e data: _____

Nome e assinatura do Pesquisador Responsável: _____

CONSENTIMENTO DO PARTICIPANTE

Eu, _____, RG _____, CPF _____, endereço _____,

abaixo assinado, concordo em participar do estudo “ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO TABAGISMO E ETILISMO EM CARCINOMAS DE CAVIDADE ORAL E CARCINOMAS DE COLO UTERINO” como participante de pesquisa.

Fui devidamente informado e esclarecido pelo Pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade e que todas as informações obtidas serão mantidas sob sigilo. Recebi uma cópia deste documento com todas as páginas rubricadas e assinadas por mim e pelo Pesquisador Responsável. Assim, autorizo a coleta, o armazenamento e a utilização do material biológico colhido. Autorizo também a divulgação dos dados obtidos neste estudo, na forma de apresentações em congressos e artigos científicos publicados em revistas especializadas.

- Eu concordo que a amostra de sangue coletada neste estudo seja utilizada para pesquisas futuras, sem necessidade de assinatura de novo TCLE, desde que o estudo seja aprovado pelos Comitês de Ética das Instituições participantes.

- Eu não concordo que a amostra de sangue coletada neste estudo seja utilizada para pesquisas futuras, sem assinatura de um novo TCLE.

- Eu desejo ser informado (a) sobre o resultado do teste genético realizado em minha amostra de sangue, quanto à minha maior ou menor suscetibilidade às substâncias tóxicas do cigarro.

Local e data: _____

Nome e assinatura do participante da pesquisa ou do responsável legal

Assinatura Dactiloscópica:



Nome e assinatura do pesquisador responsável

ANEXO 4

Projeto: ESTUDO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM GSTM1 E GSTT1 E SUAS POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES AO TABAGISMO E AO CÂNCER CERVICAL.

Ficha para coleta de dados de grupo controle

- 1- Nome: _____ 2- Data de nascimento: ____/____/____
- 3- Procedência: _____ 4- Telefone: _____
- 5- Estado civil: (1) Solteiro (2) Casado (3) Outro (4) Não informado
- 6- Escolaridade: (1) Fundamental (2) Ens. Médio (3) Superior (4) Não informado
- 7- Profissão: _____ 8- Renda aproximada: _____
- 9- Idade à primeira relação sexual: _____ (1) Não informado
- 10- Opção sexual: (1) Homossexual (2) Heterossexual (3) Não informado
- 11- Possui alguma doença crônica: (1) Sim (2) Não (3) Não informado
Se sim, qual _____
- 12- Antecedente de câncer: (1) Sim (2) Não (3) Não informado
- 13- Histórico familiar de câncer: (1) Sim, qual _____ (2) Não
(3) Não informado
- 14- Histórico familiar de diabetes: (1) Sim (2) Não (3) Não informado
- 15- Histórico familiar de doenças cardíacas: (1) Sim (2) Não (3) Não informado
- 16- Alguma doença familiar: (1) Sim, qual _____ (2) Não
- 17- Faz consultas ginecológicas regularmente: (1) Sim, com que frequência
_____ (2) Não
- 18- Tabagismo: (1) Sim (2) Não (3) Ex tabagista (4) Não informado
- 19- Frequência: (1) Às vezes (2) Diariamente (3) Não informado
- 20- Quantidade: (1) < 1 maço (2) de 1 a 3 maços (3) > 3 maços
- 21- Etilismo: (1) Sim (2) Não (3) Ex etilista (4) Não informado
- 22- Frequência: (1) Às vezes (2) Diariamente (3) Não informado
- 23- Tipo de bebida: (1) Destilados (2) Fermentado (3) Não informado
- 24- Uso de anticoncepcionais orais: (1) Sim (2) Não (3) Não informado
- 25- Status menstrual: (1) Menacme (2) Menopausa (3) Não informado

Coletado por: _____, em ____/____/____.

ANEXO 5

EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO EMBLOCADO EM PARAFINA UTILIZANDO XILOL

1. OBJETIVO:

Este procedimento destina-se a extração de DNA de tecidos emblocados em parafina utilizando solvente orgânico para a remoção da parafina, digestão com Proteinase-K, precipitação das proteínas com Kit Promega, precipitação do DNA com Isopropanol e Etanol 70% para a purificação do DNA.

2. DEFINIÇÕES:

EPI- Equipamento de proteção individual.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1- Equipamentos:

- Microtubos de polipropileno de 1,5 ml
- Micropipetas de 20, 200 e 1000 µl e respectivas ponteiros
- Centrífuga sem refrigeração (até 13000 rpm)
- Banho-Maria de 55 à 65°C
- Espectrofotômetro
- Aparatos para gel de agarose
- Parafilme
- Papel Absorvente
- Fonte

3.2 – Reagentes para a extração do DNA

- **Água deionizada**
- **Água MiliQ Autoclavada**
- **Kit Promega:** Solução de Lise e Precipitação de Proteínas
- **Proteinase-K 2,0%** (100mg Proteinase K e 5 ml de TE pH 9). Filtrar em filtro de 0,45µm e estocar a -20°C por tempo indeterminado.
- **Etanol 100%:** Manter alíquotas em tubo falcon estéril a - 4°C.

- **Etanol 70%:** Manter alíquotas em tubo falcon estéril, com 70 ml de etanol 100% e 30 ml de água deionizada e estocar a – 4 °C. Preparar com água Milli-Q estéril e em proveta estéril.
- **Xileno:** Manter alíquotas em tubo falcon estéril a - 4°C.
- **Isopropanol:** Manter alíquotas em tubo falcon estéril a – 4°C.

3.3– Reagentes para eletroforese em gel de poliacrilamida:

- **Gel de Agarose:** Solução estoque para 100mL de gel, pesar 0,8g de agarose e transferir para o balão Erlenmeyer. Adicionar 100mL de TBE 1X. Fundir a solução no microondas até homogeneizar (aproximadamente 3 vezes por 30seg na potência máxima – evitar fervura). Acrescentar 2µL de Brometo de Etídeo (10mg/mL) e misturar com agitação leve.
Obs.: Brometo de Etídeo é carcinogênico e mutagênico e deve ser manuseado com luvas.
- **Solução de TBE 10X** (108 g Tris base, 55g ácido bórico, 40 mL; 0,5 M EDTA pH 8,0 , 1000mL de H₂O q.s.p.). Estocar a temperatura ambiente. Descartar a solução se houver precipitados ou presença de contaminação.
- **Tampão TBE 1X:** 1 parte de TBE 10X e 9 partes de água. Estocar a temperatura ambiente.
- **Tampão de amostra 6x:**(azul de bromofenol e xilenocianol a 0,25% cada e ficoll 15% em água) (Sambrook *et al.*, 1989)
- **TEMED** (N, N, N', N'-Tetrametiletilenodiamina)
- Persulfato de amônia a 10%: 10g de persulfato de amônia em 100 ml em água deionizada. Fazer alíquotas de 1 ml e estocar a -20 °C.
- Marcador de peso molecular
- Etanol Absoluto
- Ácido Acético Glacial
- Formaldeído 37%
- Nitrato de prata 20%
- Hidróxido de Sódio 30%
- DNA extraído
- Solução de Hipoclorito 1,0%

3.4- Desinfecção de bancadas, fluxo laminar e acessórios:

- A desinfecção do Fluxo laminar, bancadas, micropipetas, microcentrifugas deverá ser feita com Hipoclorito de sódio 1,0%.

3.5- EPI:

- Luva e Avental – utilizar durante todo o procedimento lembrando que, para o manuseio de reagentes de PCR recomenda-se a utilização de luvas e aventais que não foram expostos anteriormente a produto amplificado. Não entrar com avental exposto a produto amplificado na sala de preparo da PCR e nem na sala de extração de DNA.
- Máscara - Utilizar enquanto estiver manuseando o Xileno. Trabalhar preferencialmente em capela ou em local que contenha exaustão.

4. PROCEDIMENTO:

Desparafinização das Amostras

1. Colocar um fragmento de tecido em um tubo de 1,5 mL e adicionar 500 µL de xileno. Incubar por 15 minutos a 65°C.
2. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos para formar um pellet de tecido. Descartar o xileno.
3. Repetir as etapas 1 e 2 mais duas vezes para completar o processo de remoção da parafina.
4. Adicionar 500 µL de etanol 100% e incubar por 15 minutos a 65°C.
5. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos para formar um pellet do tecido. Descartar o etanol.
6. Repetir as etapas 4 e 5 mais duas vezes para completar a remoção da parafina.

Lise Celular

1. Adicionar 200 µL de solução de lise celular, macerando o tecido com a ponteira.
2. Adicionar ao lisado 10 µL de proteinase K (20mg/mL).
3. Misturar o conteúdo homogeneizando com a ponteira e incubar a 65°C até completar a digestão (Overnight).

Obs: Alguns tecidos requerem maior tempo e maiores concentrações de proteinase K para completar a digestão.

Precipitação de Proteínas

1. Resfriar as amostras a temperatura ambiente.
2. Adicionar 50 µL de solução de precipitação de proteínas ao lisado de células e homogeneizar com a ponteira.
3. Incubar a -20°C durante 15 minutos.
4. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos.

Obs: O precipitado de proteínas formará um pellet no fundo do tubo. Caso o precipitado não estiver visível, repetir as etapas 2 e 4.

Precipitação do DNA

1. Transferir o sobrenadante **com o DNA** para um microtubo de 1,5 mL limpo e adicionar 200 µL de isopropanol 100%.
2. Misturar bem por inversão
3. Incubar durante uma hora a -20°C. (Melhor resultado Overnight)
4. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos. Descartar o isopropanol por inversão.
5. Secar o tubo sobre um papel absorvente durante 15 minutos.
6. Adicionar 200 µL de etanol 70% e inverter os tubos varias vezes para lavar o pellet de DNA.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos. Descartar o etanol por inversão.
8. Secar o tubo sobre papel absorvente durante 15 minutos.

Hidratação do DNA

1. Adicionar 20 µL de agua ultrapura autoclavada.
2. Armazenar a -20°C.

4.2 . Eletroforese em gel de agarose

Preparo do gel a 0,8% :(para 100 ml da solução de trabalho):

Pesar 0,8g de agarose e transferir para o balão Erlenmeyer. Adicionar 100mL de TBE 1X. Fundir a solução no microondas até homogeneizar (aproximadamente 3 vezes por 30seg na potência máxima – evitar fervura). Acrescentar 2µL de Brometo de Etídeo (10mg/mL) e misturar com agitação leve. Despejar no aparato e aguardar a polimerização.

Preparo da amostra para a eletroforese:

Misturar 2µl de DNA extraído com 3 µl do tampão de amostra em cada canaleta. Incluir na eletroforese uma canaleta para o marcador de peso molecular (diluição de acordo com o fabricante). Efetuar a corrida em tampão TBE 1X a 120V por 15 minutos.

Levar ao transluminador UV para a visualização das bandas no gel.

5- RESULTADOS

Os DNAs deverão ser analisados, para verificar a eficiência da extração, realizado em espectrofotômetro por comprimento de onda entre 260nm e 280nm e comparada com a formação de bandas no gel de agarose a 0,8%.

6- REGISTRO E INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Os materiais recebidos para extração de DNA são registrados em planilha no ato do recebimento, os resultados gerados são registrados em livro ata pelo próprio colaborador e as conclusões finais na planilha de recebimento.

Após eletroforese, caso não ocorra a aparecimento de banda ou ocorra a geração de um forte rastro (sem bandas) no gel, as quantidades de DNA na deverão ser revisadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. Biotechniques, 17: 915-9, 1994.