



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 NOS GENES *GSTT1* E *GSTM1* E
SUAS ASSOCIAÇÕES AO TABAGISMO E AO CÂNCER DE
CAVIDADE ORAL**

ANA KAROLINA LOPES

**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 NOS GENES *GSTT1* E *GSTM1* E
SUAS ASSOCIAÇÕES AO TABAGISMO E AO CÂNCER DE
CAVIDADE ORAL**

ANA KAROLINA LOPES

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**

L864e Lopes, Ana Karolina

Estudo de polimorfismos nos genes GSTT1 e GSTM1 e suas associações ao tabagismo e ao câncer de cavidade oral [manuscrito] / Ana Karolina Lopes.-- 2016.

75 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, f. 58-62

1. Boca - Câncer. 2. Boca - Doenças - Aspectos genéticos. 3. Polimorfismo (Genética). I.Saddi, Vera Aparecida. II.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. III. Título.

CDU: 616.31-006.6(043)



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 11 DE MARÇO DE 2016 E CONSIDERADA
aprovada PELA BANCA EXAMINADORA:

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

2) Daniela de Melo e Silva
Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva / UFG (Membro Externo)

3) Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva
Prof. Dr. Antonio 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)

DEDICATORIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Mário Antônio e Suelene. Tudo sempre foi e sempre será por vocês.

”A vida é um imenso carrossel que está sempre a girar. E gira depressa. E nunca para. Não é fácil de subir. Não é fácil de descer. Mas, ficar de fora só olhando também não tem a menor graça.”

Rafael Magalhães

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Vera Saddi pela orientação e ensinamentos, pelo exemplo de profissional que é, exercendo com excelência suas funções com humanidade e simplicidade. Obrigada por me transformar durante este período. Obrigada por ampliar meus horizontes. Saio desta etapa com minha bagagem de conhecimento bem mais pesada, porém, ainda com bastante espaço a ser preenchido.

Ao Prof. Antonio Márcio pelos ensinamentos e por servir de inspiração para a vida docente. Posso não alcançar os voos mais altos, mas farei o melhor que eu puder, assim como a mais teimosa das gaivotas.

Ao Prof. e amigo Cesar Vilanova Costa pelos momentos de aprendizagem e descontração. Obrigada por toda contribuição neste trabalho. Seus ensinamentos foram essenciais em nossa jornada.

Às minhas queridas amigas Ana Lúcia Munaro, Jodiê do Amaral e Nathália Nogueira, por toda a colaboração para realização deste trabalho. Vocês são prova de que o trabalho é árduo, mas que com um sorriso no rosto e espírito de equipe tudo fica mais fácil. Este trabalho é nosso.

À FAPEG pela bolsa de estudos que me permitiu a conclusão do curso neste programa.

Ao setor de Anatomia Patológica da ACCG por disponibilizar o material necessário para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores e funcionários do Programa de Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde da PUC-Goiás, por toda a colaboração.

Aos colegas Ricardo Silva, Hellen Cintra, Jéssica Enocêncio, Ana Paula e Jéssica Cáceres por todo auxílio prestado com tamanha prontidão.

Aos colegas de trabalho e alunos da Escola E.C.I. por todo o apoio. Obrigada por me permitirem ensinar e aprender com vocês.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio e compreensão da minha ausência durante esses dois anos de dedicação à esta pesquisa.

Ao meu esposo, Wesley Pazini por todo apoio.

Aos meus irmãos Carlos Eduardo e Júlio César e aos meus pais Mário e Suelene que sempre apoiaram incondicionalmente as minhas escolhas. Nadamos contra a maré e juntos aprendemos a surfar.

Pra mim, a gratidão é o mais nobre dos sentimentos, pois é a constatação de que sozinha nada posso neste mundo. Portanto, agradeço a todo aquele que de alguma forma contribuiu para a realização desta pesquisa, e que por ventura o meu cansaço do fim do trabalho tenha me impedido lembrar de citar o nome.

RESUMO

O câncer de cavidade oral é considerado um problema de saúde pública em todo o mundo. Estimam-se para o biênio 2016/2017, no Brasil, 15.490 novos casos dessa patologia que é resultado de interações entre fatores genéticos e fatores ambientais, portanto, considerada como multifatorial. Genes relacionados com o processo de detoxificação de carcinógenos podem interferir no risco para o desenvolvimento de câncer de cavidade oral. Este estudo objetiva avaliar a relação entre o fator de risco tabaco, os polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1* e o risco para o câncer de cavidade oral. No estudo, foram incluídos 100 casos de pacientes diagnosticados com câncer de cavidade oral, nos anos de 2005 e 2006, no Hospital Araújo Jorge, Goiânia/GO e 70 controles de indivíduos sem história de câncer. Após extração de DNA do material parafinado do grupo de casos e de sangue periférico para grupo controle, as amostras foram avaliadas por técnica de PCR e separação por eletroforese. A frequência de polimorfismos nulos para o grupo de casos foi de 28,0% para *GSTM1* e 49,0% para *GSTT1*. No grupo controle, a frequência dos polimorfismos nulos foi de 31,5% para *GSTM1* e de 44,3% para *GSTT1*. Não foi possível estabelecer uma associação significativa entre os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e o aumento do risco para o câncer de cavidade oral, bem como não foi estabelecida nenhuma associação significativa dos polimorfismos com o hábito tabagista. A sobrevida global dos pacientes com câncer de cavidade oral incluídos neste estudo foi de 51,71%, porém, os fatores prognósticos desta patologia não foram significativamente associados aos polimorfismos de *GSTT1* e *GSTM1*, correlacionando o câncer de cavidade oral mais a fatores de risco do que a fatores genéticos. Novos estudos, que correlacionem outros genes metabolizadores de xenobióticos, precisam ser realizados a fim de elucidar a influência dos polimorfismos genéticos no aumento do risco para o câncer de cavidade oral e demais cânceres induzidos por agentes tóxicos.

Palavras-Chave: Câncer; Câncer de Cavidade Oral; *GSTM1* e *GSTT1*; Polimorfismos Genéticos; Xenobióticos.

ABSTRACT

The oral cancer is considered a public health problem worldwide. Are estimated for the biennium 2016/2017, in Brazil, 15,490 new cases of this disease that is the result of interactions between genetic and environmental factors, therefore, considered to be multifactorial. Genes related to the carcinogen detoxification process can influence the risk of developing cancer of the oral cavity. The objective of this study was to evaluate the relationship between tobacco risk factor, polymorphisms of *GSTM1* and *GSTT1* and the risk for oral cancer. The series consisted of 100 cases of patients diagnosed with oral cavity cancer, in 2005 and 2006, in the Hospital Araújo Jorge, Goiânia / GO and 70 control individuals without cancer. After DNA extraction from paraffin material from the group of cases and peripheral blood for the control group, the samples were analyzed by PCR and separated by electrophoresis. The frequency of null polymorphisms for the case group was 28.0% for *GSTM1* and 49.0% to *GSTT1*. Among the control group, the frequency of null polymorphism was 31.5% for *GSTM1* and 44.3% to *GSTT1*. The results showed that the *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes were not associated with oral cancer in the population studied, as well as no significant association of polymorphisms with smoking status has not been established. The overall survival of patients with oral cavity cancer included in this study was 51,71%, however, the prognosis of this disease were not significantly associated with the *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms. The oral cancer was more correlated with risk factors than genetic factors. Further studies correlating other xenobiotics metabolizing genes, must be performed in order to elucidate the influence of genetic polymorphisms in increasing the risk for cancer of the oral cavity and other cancers induced by toxic agents.

Keywords: Cancer; Oral cancer; *GSTM1* and *GSTT1*; Genetics polymorphisms; Xenobiotics.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEORICO	17
2.1. Epidemiologia do Câncer de Cavidade Oral.....	17
2.2. Anatomia da Cavidade Oral	18
2.3. Histologia e História Natural dos Carcinomas de Cavidade Oral	19
2.4. Fatores Prognósticos do Carcinoma de Cavidade Oral	20
2.5. Fatores de Risco	21
2.5.1. Tabaco e Carcinogênese	23
2.5.2. Biotransformação de Xenobióticos	26
2.6. Polimorfismos Genéticos <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i>	28
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo Primário.....	34
3.2. Objetivos Secundários.....	34
4. METODOLOGIA.....	35
4.1. Seleção dos Sujeitos da Pesquisa	35
4.2. Amostras Biológicas para Extração de DNA	35
4.3. Aspectos Éticos da Pesquisa	36
4.4. Variáveis Dependentes	36
4.5. Variáveis Independentes	36
4.6. Critérios de Inclusão.....	36
4.7. Análise Molecular	37

4.7.1. Extração do DNA Genômico	37
4.7.2. Detecção e Genotipagem dos Polimorfismos.....	38
4.8. Eletroforese	39
4.8.1. Análise dos Dados.....	40
5. RESULTADOS	41
5.1. Variáveis Clinicopatológicas e Sociodemográficas	41
5.2. Distribuição dos Polimorfismos	44
5.2.1. Distribuição Genotípica em Indivíduos Tabagistas e Não Tabagistas....	44
5.2.2. Genótipos Combinados de GSTM1 e GSTT1	46
5.2.3. Associações dos Genótipos de GSTT1 e GSTM1 aos Fatores Prognósticos do Câncer de Cavidade Oral	46
5.2.4. Sobrevida Global e Sobrevida Associada aos Genótipos GSTM1 e GSTT1.....	50
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO.....	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACCG – Associação de Combate ao Câncer em Goiás

CA – Câncer

CCE – Carcinoma de Células Escamosas

CCECP – Carcinomas de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GST – Glutathione - S - transferase

GSTM*0 – Genótipo nulo de *GSTM1*

GSTT1*0 – Genótipo nulo de *GSTT1*

HAJ – Hospital Araújo Jorge

HPV – Papilomavírus Humano

IARC – do inglês: *International Agency for Research on Cancer*

INCA – Instituto Nacional de Câncer

pb – Pares de bases

PCR – do inglês: *Polymerase Chain Reaction*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia da cavidade oral. Adaptada de pt.slideshare.net em 17/11/2015	18
Figura 2. Classificação das lesões precursoras de câncer de cavidade oral. Adaptada de INCA, 2014	19
Figura 3. Lesões precursoras e câncer invasor em cavidade oral. Adaptada de INCA, 2002.....	20
Figura 4. Fração atribuível aos principais fatores de risco do câncer. Adaptada de INCA , 2014.....	23
Figura 5. Interação de nitrosaminas com as bases nitrogenadas do material genético. Adaptada de SZYFTER <i>et al.</i> , 1999.....	24
Figura 6. Processo do desenvolvimento da toxicidade após exposição ao composto químico. Adaptado de KLAASSEN, 2012	25
Figura 7. Processo de carcinogênese iniciado por agentes carcinógenos genotóxicos. Adaptado de CASARETT & DOULL'S, 2008	26
Figura 8. Fases da metabolização de xenobióticos. Adaptado de Schemit, 2014	27
Figura 9. Conjugação de GSH com um Xenobiótico. Adaptado de Schemit, 2014	28
Figura 10. Classes das GST humanas e suas principais enzimas. Adaptado de Casarett & Doull's, 2008.....	30
Figura 11. Fluxograma de exclusão de pacientes que não atenderam aos critérios estabelecidos para o grupo de casos do estudo.....	37

Figura 12. Visualização dos amplicons para o Gene <i>GSTM1</i> , em gel de Poliacrilamida 8%, corado com Nitrato de Prata. Ladder 50 para visualização dos fragmentos amplificados, controle positivo e controle negativo para confirmação da amplificação na PCR	40
Figura 13. Sobrevida global dos pacientes com carcinoma de cavidade oral incluídos no estudo	51
Figura 14. Sobrevida global dos pacientes com carcinoma de cavidade Oral incluídos no estudo e associação aos genótipos nulo e presente de <i>GSTM1</i> ...	52
Figura 15. Sobrevida global dos pacientes com carcinoma de cavidade oral incluídos no estudo e associação aos genótipos nulo e presente de <i>GSTM1</i> ..	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais estudos tipo caso-controle que buscam associação entre genótipos nulos de <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> e câncer de cavidade oral	32
Tabela 2. Mix para amplificação de fragmentos dos genes <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i>	38
Tabela 3. Iniciadores e condições de amplificação para análise dos polimorfismos nos genes <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i>	39
Tabela 4. Variáveis sociodemográficas dos pacientes com câncer de cavidade oral incluídos no estudo... ..	41
Tabela 5. Variáveis clinicopatológicas dos pacientes com câncer de cavidade oral incluídos no estudo	42
Tabela 6. Variáveis sociodemográficas dos indivíduos do grupo controle	43
Tabela 7. Frequência genotípica de <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> no grupo de casos de pacientes com câncer de cavidade oral e no grupo controle	44
Tabela 8. Frequência dos genótipos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> distribuídos entre indivíduos tabagistas e não tabagistas.....	45
Tabela 9. Frequência do hábito tabagista entre os grupos de casos e controles.....	45
Tabela 10. Genótipos combinados de <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> em pacientes com câncer de cavidade oral e indivíduos do grupo controle	46
Tabela 11. Frequência dos genótipos <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> nos pacientes com comprometimento linfonodal e sem comprometimento linfonodal.....	47

Tabela 12. Frequência dos polimorfismos associados ao grau tumoral dos carcinomas de cavidade oral.....	48
Tabela 13. Frequência dos polimorfismos associados ao tamanho do tumor nos carcinomas de cavidade oral.....	49
Tabela 14. Relação dos polimorfismos de <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> com óbitos registrados no grupo de casos	50

1. INTRODUÇÃO

Considerado um problema de saúde pública em todo o mundo, o câncer de cavidade oral está entre os tipos mais comuns de câncer. Para 2012, foram estimados 300.000 novos casos desta patologia em todo o mundo (Ferlay *et al.*, 2012). No Brasil, as estimativas para o ano de 2016, válidas também para o ano de 2017, são de 15.490 novos casos, dos quais, 72% atingem homens e 28% atingem mulheres (INCA, 2016). Os números que representam as taxas de mortalidade também são expressivos. Na última estimativa mundial, foram previstas 145.300 mortes causadas pelo câncer de cavidade oral em todo o mundo (Ferlay *et al.*, 2012; IARC, 2015).

O tipo histológico mais frequente do câncer de cavidade oral é o carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermoide, correspondendo de 90 a 95% dos casos (Barnes *et al.*, 2005; Queiroz *et al.*, 2009).

O cigarro e o álcool constituem os fatores de risco mais relevantes para o desenvolvimento de carcinomas de cavidade oral (Carli *et al.*, 2009; Lubin *et al.*, 2011; Boing *et al.*, 2011; Szymanska *et al.*, 2011; Galbiatti *et al.*, 2013; Topocov *et al.*, 2015) e, já é conhecido que a interação entre esses dois principais fatores, tabaco e álcool, é capaz de aumentar o risco de desenvolvimento desta patologia (Szymanska *et al.*, 2011). O tabaco possui substâncias e elementos cancerígenos com efeitos genotóxicos e, portanto, capazes de alterar a informação genética dos indivíduos (Galbiatti *et al.* 2013; Lin *et al.*, 2013). Essas substâncias, conhecidas como xenobióticos, são capazes de interagir com o material genético das células formando adutos de DNA, que por sua vez, são capazes de favorecer mutações celulares e hiperplasia reativa na mucosa do trato aéreo superior (Szyfter *et al.*, 1999; Leme *et al.*, 2010).

A biotransformação de xenobióticos é necessária e acontece diminuindo o tempo de permanência do toxicante no sítio-alvo e aumentando a sua velocidade de excreção, portanto é realizada por um número limitado de enzimas com ampla especificidade de substratos (Klaassen & Watkins, 2012). Dois genes polimórficos, o *GSTT1* e o *GSTM1*, que codificam enzimas envolvidas na biotransformação de carcinógenos, parecem relevantes para o desenvolvimento do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, uma vez que atuam na detoxificação de metabólitos da fumaça do tabaco (Biselli *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2013).

É fundamental que estudos que objetivam estabelecer as possíveis relações entre os fatores de risco e os polimorfismos genéticos a eles associados sejam desenvolvidos. Uma vez que as estimativas de taxas de novos casos de câncer e cavidade oral vêm demonstrando um crescimento significativo nos últimos anos (INCA, 2012; INCA, 2014), esses estudos tornam-se importantes ferramentas para aperfeiçoar os programas de prevenção e tratamento dessa patologia.

2. REFERENCIAL TEORICO

2.1. Epidemiologia do Câncer de Cavidade Oral

O câncer de cavidade oral está entre os tipos mais comuns de câncer na população mundial. Para 2012, foram estimados 300.000 novos casos desta patologia em todo o mundo. Desses, 168.900 foram estimados para a Ásia, apontando este continente como o mais incidente. Cerca de 15.900 casos foram estimados para a América do Sul, 28.600 para a América do Norte e 61.400 para a Europa. Em todos os continentes, mais de 60% dos casos acometem o sexo masculino (Ferlay *et al.*, 2015). Nos Estados Unidos, a estimativa, para 2015, foi de 30.260 novos casos de câncer de cavidade oral (Siegel *et al.*, 2015).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2016, válidas também para o ano de 2017, são de 15.490 novos casos, dos quais, 72% atingem homens e 28% atingem mulheres (INCA, 2014). Na região centro-oeste, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cavidade oral é o quinto tipo mais frequente em homens e o 12º mais frequente em mulheres, com expectativa para 2016/2017 de 680 e 210 novos casos, respectivamente (INCA, 2014).

A faixa etária predominante do carcinoma de cavidade oral está entre 50 e 60 anos. Estudos confirmam a 5ª e a 6ª décadas com maior incidência deste tipo de carcinoma (Barnes *et al.*, 2005; Ferlay *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013).

Os números que representam as taxas de mortalidade também são expressivos. Na última estimativa mundial, foram previstas 145.300 mortes causadas pelo câncer de cavidade oral em todo o mundo (Ferlay *et al.*, 2015; IARC, 2007).

2.2. Anatomia da Cavidade Oral

Considerado um problema de saúde pública em todo o mundo, os tumores de cavidade oral afetam principalmente gengivas, mucosa jugal, palato duro, língua, assoalho da boca, base da língua e palato mole (Barnes *et al.*, 2005; INCA, 2012). Revestida pelo epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado, a cavidade oral possui as seguintes delimitações: parte anterior pelos lábios, lateralmente pela mucosa jugal (bochechas), palato duro e mole superiormente, língua e arcada dentária inferiormente e, posteriormente, pelo istmo da garganta (Figura 1) (INCA, 2014; Barnes *et al.*, 2005).

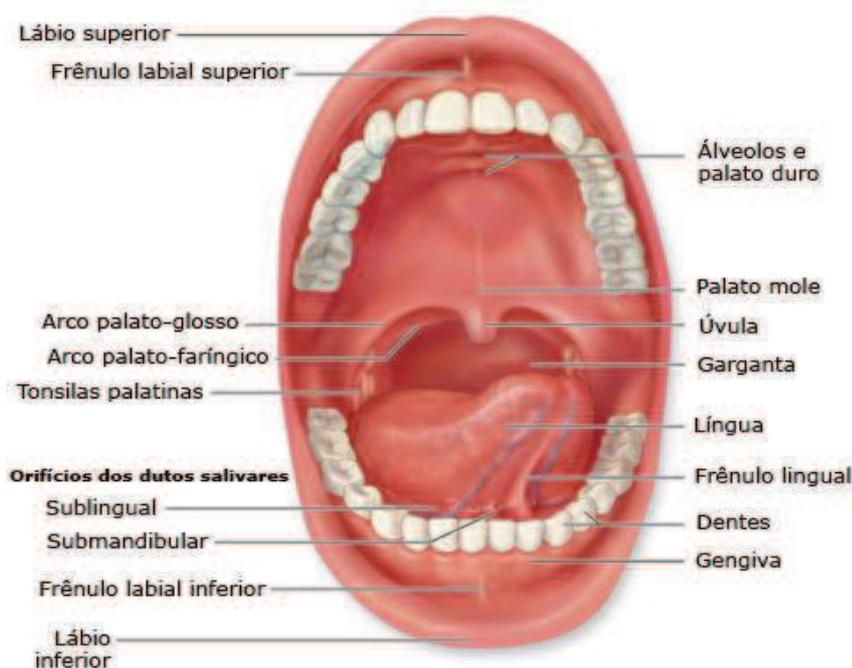


Figura 1. Anatomia da cavidade oral. Adaptada de pt.slideshare.net em 17/11/2015.

Estudos evidenciam que língua e assoalho bucal são localizações preferenciais de ocorrência do câncer bucal, apresentando-se assim como sítios mais acometidos (Carli *et al.*, 2009; Ferlay *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013).

2.3. Histologia e História Natural dos Carcinomas de Cavidade Oral

O tipo histológico mais frequente do câncer de cavidade oral é o carcinoma de células escamosas (CCE) ou carcinoma epidermoide, correspondendo de 90 a 95% dos casos (Barnes *et al.*, 2005; Queiroz *et al.*, 2009).

Histologicamente, o câncer oral tem início na camada epitelial superficial com o aparecimento de células epiteliais malignas que possuem comportamento invasivo em direção ao tecido conjuntivo subjacente (Venturi *et al.*, 2004; Queiroz *et al.*, 2009).

Clinicamente, o CCE pode assumir aspectos diferentes em seus estágios iniciais, apresentando-se como lesões precursoras (Venturi *et al.*, 2004; Queiroz *et al.*, 2009). As leucoplasias e eritroplasias são as principais lesões pré-malignas e quando detectadas precocemente por rastreamento clínico (Figura 2 e Figura 3), ou seja, exame visual da cavidade oral podem ser tratadas e prevenir substancialmente o número de neoplasias invasoras (Steele, 2011; Nemoto *et al.*, 2015).



Figura 2. Classificação das lesões precursoras de câncer de cavidade oral. Adaptada de INCA, 2014.

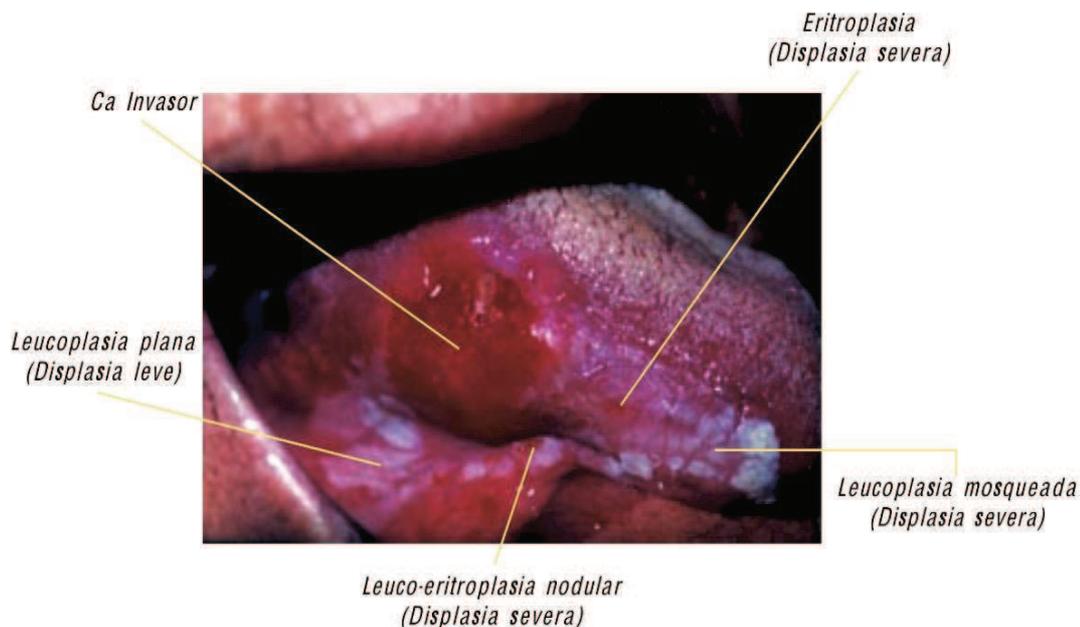


Figura 3. Lesões precursoras e câncer invasor em cavidade oral. Adaptada de INCA, 2002.

2.4. Fatores Prognósticos do Carcinoma de Cavidade Oral

Os fatores prognósticos do câncer de cavidade oral podem estar associados ao paciente ou diretamente relacionados com o tumor. Tabagismo, etilismo e idade são apresentados como fatores prognósticos relacionados ao paciente. Comprometimento linfonodal, metástase à distancia, sítio anatômico e tamanho da lesão tumoral são fatores associados especificamente ao tumor (Almeida *et al.*, 2011).

Estudos têm apresentado a borda lateral da língua seguida de assoalho bucal como os sítios mais acometidos pelo CCE de cavidade oral e que tumores localizados nesses sítios específicos podem disseminar mais facilmente, ocasionando metástases devido à vascularização sanguínea e linfática dessas regiões (Carli *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2011). Em uma revisão de literatura realizada por Almeida *et al.* (2011), o local primário do câncer de cavidade oral é bem estabelecido como um fator prognóstico desta neoplasia.

Os tumores de língua e assoalho bucal requerem tratamento mais agressivo devido à presença de vasos mais calibrosos nessa região e conseqüentemente maior chance de disseminação por metástase à distância. Em contrapartida, os tumores de mucosa jugal parecem ter comportamento biológico menos agressivo e, portanto, apresentam um melhor prognóstico (Almeida *et al.*, 2011).

O desenvolvimento do carcinoma de cavidade oral é resultado de interações entre fatores genéticos e fatores ambientais, portanto, é considerado multifatorial (Galbiatti *et al.*, 2013).

2.5. Fatores de Risco

O cigarro e o álcool constituem os fatores de risco mais relevantes para o desenvolvimento de carcinomas de cavidade oral (Carli *et al.*, 2009; Lubin *et al.*, 2011; Boing *et al.*, 2011; Szymanska *et al.*, 2011; Galbiatti *et al.*, 2013; Topocov *et al.*, 2015). Além do mais, já é conhecido que a interação entre esses dois principais fatores, tabaco e álcool, é capaz de aumentar o risco de desenvolvimento desta patologia (Szymanska *et al.*, 2011). Algumas concentrações de álcool são capazes de aumentar a permeabilidade da mucosa bucal, potencializando a ação de carcinógenos do tabaco (Carrard *et al.*, 2008). O risco para o câncer de cabeça e pescoço está diretamente associado com o aumento da duração e frequência da exposição ao cigarro, em contrapartida, a frequência de ingestão de álcool está mais associada a este tipo de câncer do que o tempo de exposição a esse fator (Topocov *et al.*, 2015).

Apesar da confirmação do tabaco e do álcool como fatores mais comuns no desencadeamento do processo de carcinogênese oral, outros fatores têm sido relatados para o aumento do risco para o câncer de cavidade oral, principalmente em indivíduos não tabagistas e não etilistas. Dentre esses fatores, os mais conhecidos

são, a má higiene bucal, o uso de próteses dentárias mal ajustadas e o Papilomavírus humano (HPV) (Ferreira *et al.*, 2012; INCA, 2014).

Identificado como o agente sexualmente transmissível mais frequente entre homens e mulheres, o HPV está associado às lesões proliferativas na pele e membranas mucosas, bem como ao câncer (Canepa *et al.*, 2013). Em 2009, a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) revisou o papel carcinogênico do HPV em patologias humanas e confirmou sua forte associação com a carcinogênese cervical, de pênis, canal anal, cavidade oral, laringe e esôfago (IARC, 2007; Canepa *et al.*, 2013). O HPV destaca-se também como importante fator de risco associado aos carcinomas dessa região anatômica, pois se associa frequentemente com neoplasias benignas e malignas de cavidade oral, sendo que, dentre as malignas, o mais comum é o carcinoma espinocelular (Esquenazi *et al.*, 2010).

O surgimento do câncer de cavidade oral em adultos jovens, ou seja, com até 45 anos de idade, está mais associado à história familiar do que à fatores ambientais propriamente ditos (Almeida *et al.*, 2011; Topocov *et al.*, 2015). Diferentemente das estatísticas realizadas com populações mais velhas, acima de 45 anos, que apontam uma incidência maior para o sexo masculino do que para o feminino (Ferlay *et al.*, 2015), os estudos realizados com adultos jovens, apontam uma taxa maior para mulheres em relação aos homens (Topocov *et al.*, 2015).

Em sua estimativa mais recente, o INCA relacionou os principais fatores de risco associados ao câncer. Nesta estimativa, o tabaco corresponde 30% e a alimentação corresponde 35% dos fatores de risco independentemente do tipo de câncer, mostrando que os hábitos de vida tem grande influência no aumento do risco para o desenvolvimento de carcinogênese (Figura 4) (INCA, 2014).

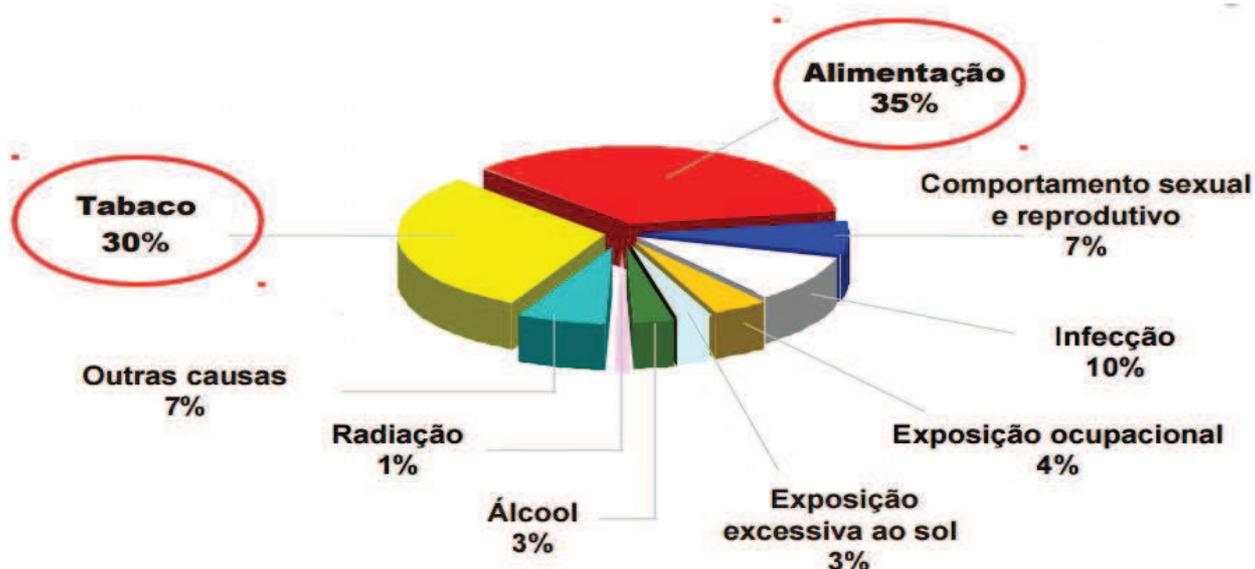


Figura 4. Fração atribuível aos principais fatores de risco do câncer. Adaptada de INCA, 2014.

2.5.1. Tabaco e Carcinogênese

O tabaco possui substâncias e carcinógenos com efeitos genotóxicos e, portanto, capazes de alterar a informação genética dos indivíduos (Galbiatti *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2013).

Cerca de 4.000 substâncias químicas são encontradas no cigarro, como solventes orgânicos, ácidos, metais pesados e até mesmo materiais radioativos como Polônio 210 e Urânio 235 e 238. Além desses, o cigarro ainda possui compostos inorgânicos, aldeídos voláteis, etil carbonato e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Szyfter *et al.*, 1999; Bhisey *et al.*, 2012; Galbiatti *et al.*, 2013).

O tabagismo é reconhecido como doença crônica devido à dependência da nicotina. O usuário de produtos de tabaco é exposto a centenas de substâncias tóxicas, dentre elas as N-nitrosaminas e aminas aromáticas que são capazes de interagir com o material genético das células formando adutos de DNA (Figura 5), que

por sua vez, são capazes de favorecer mutações celulares e hiperplasia reativa na mucosa do trato aéreo superior (Szyfter *et al.*, 1999; Leme *et al.*, 2010).

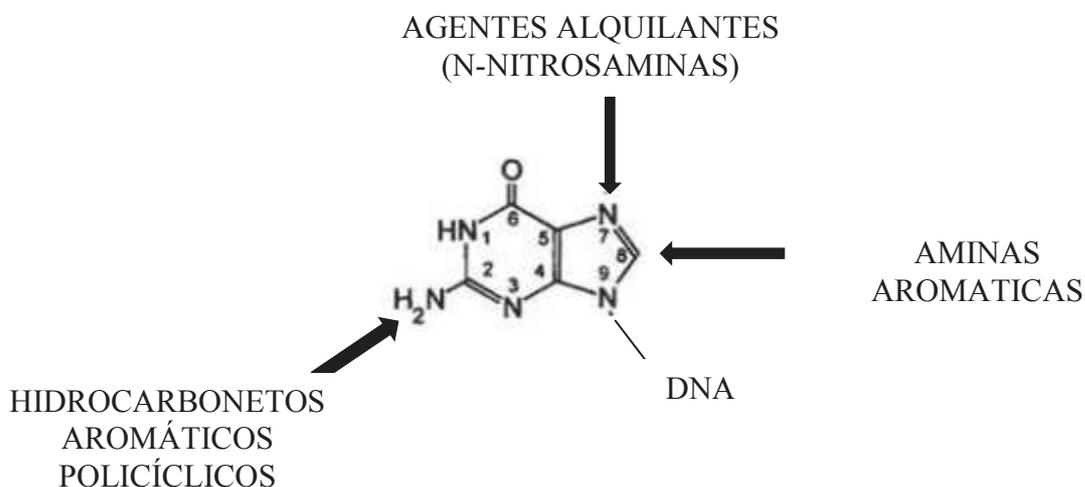


Figura 5. Interação de nitrosaminas com as bases nitrogenadas do material genético. Adaptada de SZYFTER *et al.*, 1999.

Das N-Nitrosaminas, as mais encontradas no cigarro são as NNK2-4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1butanona, as NAT (N-Nitrosoanabastina) e as NNN (N-Nitrosornicotina). Essas substâncias têm sido apresentadas pelo IARC como carcinógenos humanos potenciais (IARC 2007; Bhisey, 2012).

Essas substâncias químicas com capacidade tóxica são conhecidas como xenobióticos. O processo de toxicidade (Figura 6) envolve a liberação do toxicante para o alvo, a interação com as moléculas-alvo ou alteração do ambiente, que por sua vez iniciarão distúrbios na função e/ou estrutura celular. As células então iniciam os mecanismos de reparo. Quando as alterações induzidas pelo xenobiótico (toxicante) excedem a capacidade reparadora ou quando o reparo não funciona, a toxicidade ocorre (Klaassen & Watkins, 2012).

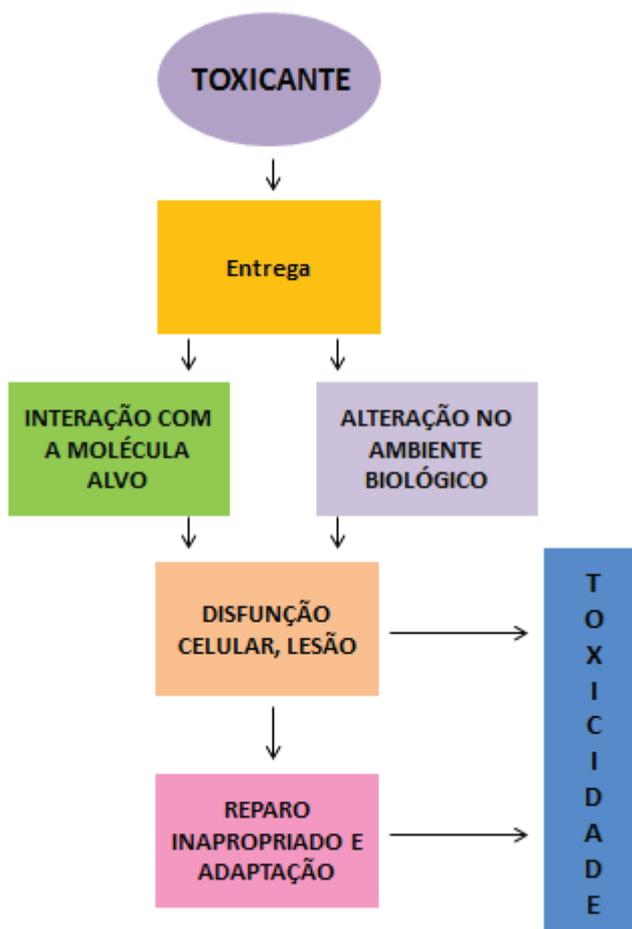


Figura 6. Processo do desenvolvimento da toxicidade após exposição ao composto químico. Adaptado de KLAASSEN, 2012.

As alterações necessárias para o surgimento de um tumor geralmente constituem em divisões celulares e acúmulos de danos como perdas, ganhos ou rearranjos genéticos, ou ainda, alterações pontuais na sequência do DNA. Essas alterações envolvem diversos genes relacionados com o crescimento e a proliferação celular. Esses genes são na maioria das vezes proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Quando o processo oncogênico se instala, há uma expressão aumentada dos proto-oncogenes e a inativação dos genes supressores de tumor

(Wünsch Filho & Gattás, 2001). A Figura 7 mostra como pode acontecer o mecanismo de carcinogênese iniciado por agentes carcinógenos genotóxicos.

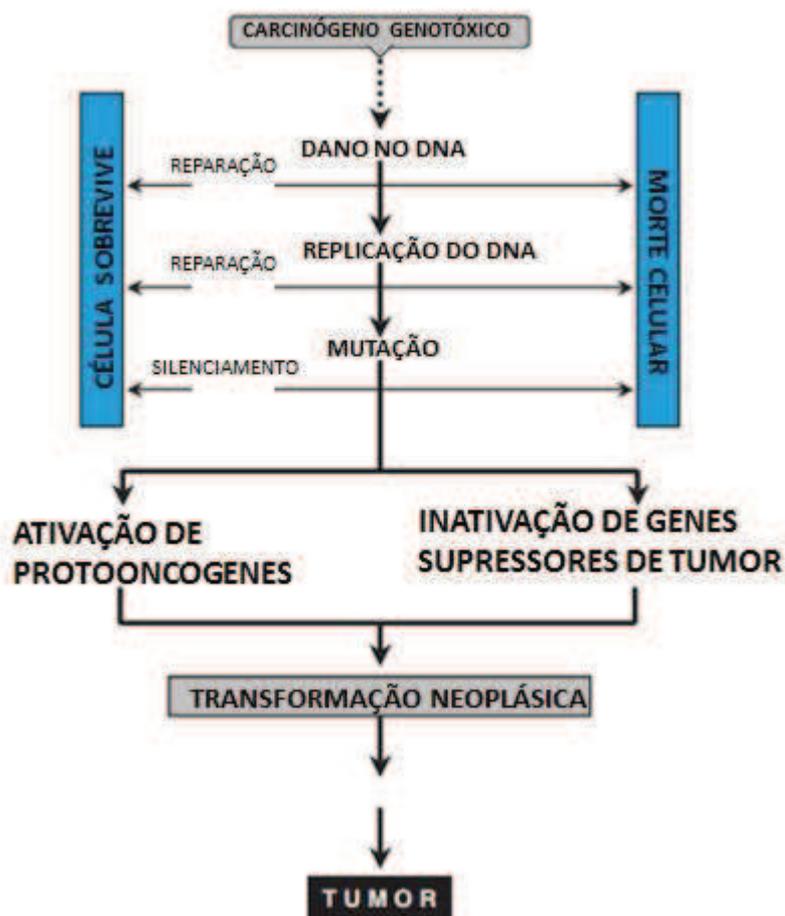


Figura 7. Processo de carcinogênese iniciado por agentes carcinógenos genotóxicos. Adaptado de CASARETT & DOULL'S, 2008.

2.5.2. Biotransformação de Xenobióticos

Ao contrário do processo de toxicidade, existe o processo de detoxificação, compreendido pelas biotransformações que eliminam o toxicante ou previnem sua formação. A biotransformação de xenobióticos acontece diminuindo o tempo de permanência do toxicante no sítio alvo e aumentando a sua velocidade de excreção,

portanto é realizada por um número limitado de enzimas com ampla especificidade de substratos (Klaassen & Watkins, 2012).

O metabolismo ou biotransformação de xenobióticos (Figura 8) acontece em quatro categorias de reações: hidrólise, redução, oxidação e conjugação. Essas categorias podem também ser classificadas em Fase I (hidrólise, redução e oxidação) e Fase II (conjugação). Nas três primeiras reações, ou fase I, os xenobióticos são preparados para a conjugação, ou fase II, sofrendo principalmente hidroxilação, o que torna as moléculas mais hidrossolúveis. Na conjugação, acontece a detoxificação dos xenobióticos para que sejam eliminados pelo organismo (Casarett & Doull's, 2008).

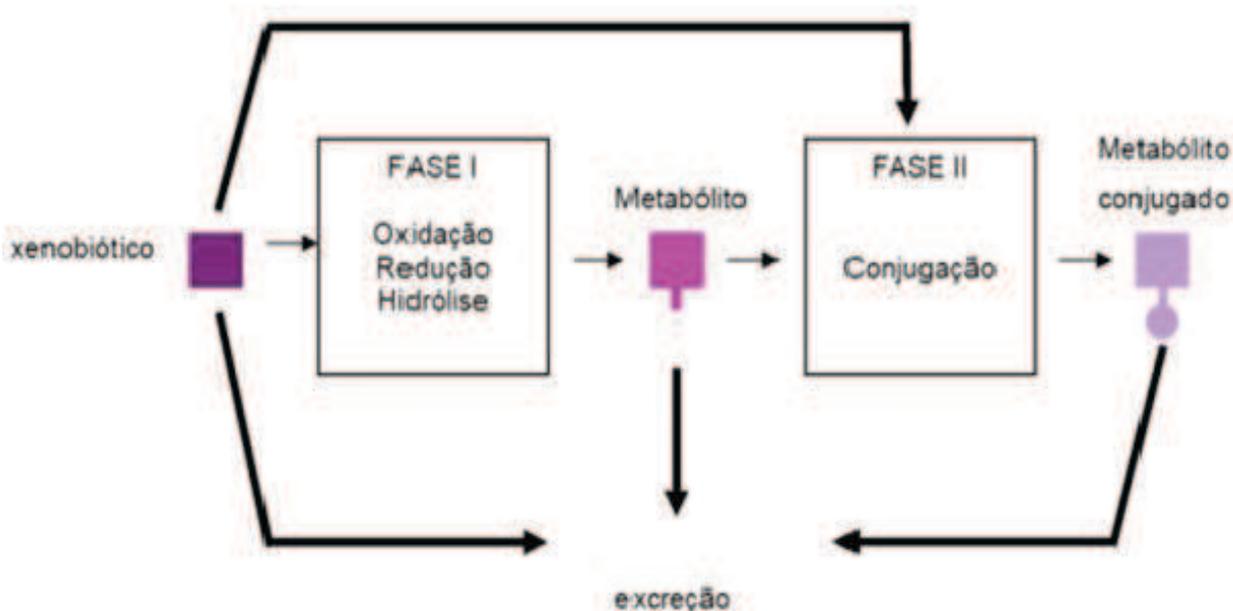


Figura 8. Fases da metabolização de xenobióticos. Adaptado de Schemit, 2014.

Dois genes polimórficos, o *GSTT1* e o *GSTM1*, que codificam enzimas envolvidas na biotransformação de carcinógenos, parecem relevantes para o desenvolvimento do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, uma vez que atuam na detoxificação de metabólitos da fumaça do tabaco. Apesar de escassos, alguns estudos têm mostrado que os polimorfismos do gene *CYP1A1* também estão

associados aos metabólitos do tabaco e aos carcinomas de cavidade oral e orofaringe (Biselli *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2013).

2.6. Polimorfismos Genéticos *GSTT1* e *GSTM1*

Algumas substâncias químicas do cigarro como as nitrosaminas, precisam ser metabolizadas para exercerem sua função deletéria, ou seja, somente após a ativação metabólica, essa substância terá a capacidade de causar danos ao DNA (Bandeira *et al.*, 2014).

A biotransformação de xenobióticos presentes, por exemplo, no tabaco ou no álcool envolve reações bioquímicas com a participação de várias enzimas (Figura 9). A produção dessas enzimas é determinada geneticamente durante os processos de tradução e transcrição (Bandeira *et al.*, 2014).

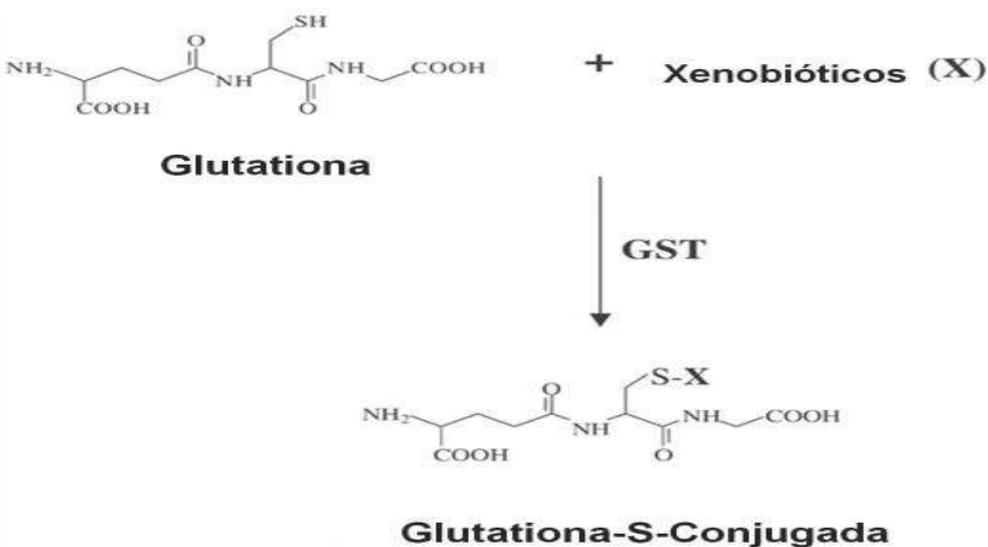


Figura 9. Conjugação de GSH com um Xenobiótico. Adaptado de Schemit, 2014

Dentre as famílias de enzimas envolvidas no mecanismo de biotransformação de xenobióticos, as Glutathionas-S-Transferase (GST) se destacam com um importante papel no processo de detoxificação. Elas atuam na segunda fase do mecanismo, promovendo a metabolização de substâncias como os hidrocarbonetos aromáticos

policíclicos encontrados no cigarro, e atuam protegendo as células de efeitos oxidativos deletérios (Gattás *et al.*, 2006; Leme *et al.*, 2010). Alterações na via metabólica responsável pela produção de enzimas de biotransformação de xenobióticos podem gerar alterações quanto a sua biodisponibilidade e excreção (Klaassen & Watkins, 2012; Bandeira *et al.*, 2014). O gene *GSTM1* está localizado na posição 1p13.3 (ID: 2944) e o gene *GSTT1* na posição 22q11.2 (ID: 2952) (Sá *et al.*, 2014), quando em deleção homozigótica o genótipo nulo de *GSTM1* e *GSTT1* resulta em diferenças fisiológicas e até na ausência da atividade dessa enzima, podendo favorecer a suscetibilidade ao câncer (Leme *et al.*, 2010). A família das GST é formada por várias classes de enzimas (Figura 10), denominadas: alpha (A) no cromossomo 6, Mu (M) no cromossomo 1, kappa (K) de localização desconhecida, theta (T) no cromossomo 22, pi (P) no cromossomo 11, sigma (S) no cromossomo 4, ômega (O) no cromossomo 10 e zeta (Z) no cromossomo 14 (Casarett & Doull's, 2008; Halolu *et al.*, 2013).

FAMILIA	CLASSE	GENE	ENZIMA	
Citosólica	Alpha	GSTA1	GSTA1-1	
		GSTA2	GSTA2-2	
		GSTA3	GSTA3-3	
		GSTA4	GSTA4-4	
		GSTA5	GSTA5-5	
	Mu	GSTM1	GSTM1-1	
		GSTM2	GSTM2-2	
		GSTM3	GSTM3-3	
		GSTM4	GSTM4-4	
		GSTM5	GSTM5-5	
	Pi	GSTP1	GSTP1-1	
	Sigma	PGDS	GSTS-1	
	Theta	GSTT1	GSTT1-1	
		GSTT2	GSTT2-2	
	Zeta	GSTZ1	GSTZ1-1	
	Omega	GSTO1	GSTO1-1	
		GSTO2	GSTO2-2	
	Mitocondrial	Kappa	GSTK1	GSTK1-1
	Microsomal (MAPEGs)	gpI	MGST2	MGST2
ALOX5AP LTC4S			Flap LTC.S	
gpII		MGST3	MGST3	

Figura 10. Classes das GST humanas e suas principais enzimas. Adaptado de Casarett & Doull's, 2008.

A presença ou a ausência de alguns desses genes relaciona-se às variações na capacidade de conjugação de substâncias glutationa-dependentes, interferindo diretamente na metabolização de vários carcinógenos e, conseqüentemente, aumentando o risco para diversos tipos de câncer. Os genes que codificam essas enzimas se expressam de maneira bastante heterogênicamente na população mundial e apresentam muitas variações de atividade em diferentes indivíduos (Leme *et al.*, 2010).

O alelo *GSTM1* nulo é resultado de uma deleção homozigótica (-/-) que leva a ausência do gene, portanto acarreta a ausência também da atividade enzimática (Charrier *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2006).

A enzima *GSTM1* é codificada pelo gene *GSTM1* e oferece proteção contra danos no DNA e é sintetizada em tecidos como fígado, rins, pulmão, intestino e baço (Casarett & Doull's, 1998; Yan *et al.*, 2006).

Da mesma forma que *GSTM1* nulo, o *GSTT1* nulo (-/-) também é consequência de uma perda de um fragmento contendo o gene *GSTT1* resultando a ausência da atividade enzimática (Guo *et al.*, 2008).

Diferentes estudos buscam estabelecer a associação entre os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* e o risco para o câncer de cavidade oral. Estes estudos são, muitas vezes, divergentes e contraditórios. Alguns autores afirmaram associação dos dois genótipos nulos, *GSTM1* e *GSTT1* com o aumento do risco para o câncer (Ruwali *et al.*, 2011; Anantharaman *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2014). Dois estudos, concluíram a existência dessa relação apenas com o genótipo nulo de *GSTM1* e destacou o genótipo nulo de *GSTT1* como fator de proteção para o desenvolvimento de câncer de cavidade oral (Sharma *et al.*, 2006; Anantharaman *et al.*, 2007). Gattás *et al.* (2006) estabeleceu a relação apenas entre o *GSTM1* e o aumento do câncer. Outros autores, por meio de seus estudos, não estabeleceram nenhuma relação entre os genótipos nulos *GSTT1* e *GSTM1* e aumento do risco para câncer de cavidade oral (Sugimura *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006; Biseli *et al.*, 2006; Buch *et al.*, 2008; Yadav *et al.*, 2010). Alguns dos principais estudos que buscam essa associação estão sistematicamente listados na Tabela 1.

Tabela 1. Principais estudos tipo caso-control que buscam associação entre genótipos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* e câncer de cavidade oral.

Primeiro autor, ano	Região do estudo	Nº de casos	Nº de controles	Tecido analisado	Sítio de tumor mais frequente	Metodologia utilizada	Fatores de risco avaliados	Genótipos nulos	Frequência dos genótipos % casos	OR	p
Singh, 2014	Ahmedabad, India	122	127	Sangue	Cavidade Oral	PCR	Tabaco	GSTM1	43,4	1,55	0.117
Ruwali, 2011	Lucknow, India	500	500	Sangue	Cavidade oral	PCR multiplex	Tabaco e álcool	GSTM1 GSTT1	47,2 23	1,95 1,92	0.02 0.06
Anantharaman, 2011	Mumbai, India	665	802	Sangue Periférico	Cavidade Oral	PCR	Tabaco e álcool	GSTM1 GSTT1	45,86 6,76	1.50 0.47	0.001 0.001
Yadav, 2010	India	136	270	Sangue periférico	Cavidade oral	PCR multiplex	Tabaco e Betel	GSTM1 GSTT1	49 31	1.02 1.18	0.48 0.93
Amtha, 2009	Jakarta, Indonésia	81	162	Sangue periférico	Cavidade Oral	PCR multiplex	Tabaco, álcool e betel	GSTM1 GSTT1	60,5 45,7	1.19 1.19	0.527 0.463
Buch, 2008	Pittsburgo, EUA	197	416	Sangue	Cavidade Oral	PCR	Tabaco e álcool	GSTM1 GSTT1	64,3 34,4	- -	0.5 0.22

Tabela 1. Principais estudos tipo caso-controle que buscam associação entre genótipos nulos de GSTT1 e GSTM1 e câncer de cavidade oral.

Anantharaman, 2007	Mumbai, India	458	729	Sangue Periférico	Cavidade Oral	PCR	Tabaco	GSTM1	44	37	1.29	0.05
								GSTT1	10	16	0.57	0.004
Sugimura, 2006	Nagoya, Japão	122	241	Sangue periférico	-	PCR	Tabaco e álcool	GSTM1	48,3	52,3	0.87	0.547
								GSTT1	37,7	43,6	0.78	0.282
Sharma, 2006	India	40	87	Tumor (casos) Sangue Periférico(controles)	Cavidade oral	PCR	Tabaco e álcool	GSTM1	52,5	33,33	2,2	0.06
								GSTT1	42,5	14,9	4,2	0.002
Peters, 2006	Boston, EUA	692	753	Sangue periférico	Cavidade Oral	PCR	Tabaco e álcool	GSTM1	58,2	53,7	1.20	-
								GSTT1	17,6	21,5	0.77	-
Biselli, 2006	São Paulo, Brasil	60	60	Sangue periférico	Cavidade oral	PCR multiplex	Tabaco e álcool	GSTM1	41,7	48,3		0.582
								GSTT1	33,3	23,3		0.311
Gattás, 2006	São Paulo, Brasil	103	102	Sangue periférico	Faringe	PCR multiplex	Tabaco e álcool	GSTM1	57,3	38,2	2,2	-
								GSTT1	24,3	17,6	1.5	-

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Primário

Avaliar as possíveis associações entre os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* e o aumento do risco para o câncer de cavidade oral.

3.2. Objetivos Secundários

Investigar a frequência dos polimorfismos genéticos de *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes com câncer de cavidade oral, tabagistas e não tabagistas e em controles saudáveis;

Avaliar as possíveis associações entre os polimorfismos de *GSTT1* e *GSTM1* e os fatores de risco para o câncer de cavidade oral, especialmente com relação ao tabagismo;

Investigar as possíveis associações entre os polimorfismos genéticos e o prognóstico dos tumores de cavidade oral.

4. METODOLOGIA

4.1. Seleção dos Sujeitos da Pesquisa

O presente estudo foi realizado utilizando amostras tumorais de pacientes do Hospital Araújo Jorge, Goiânia/GO. O grupo de casos foi constituído por 100 pacientes diagnosticados com câncer de cavidade oral entre os anos de 2005 e 2006. Tais pacientes foram selecionados a partir dos prontuários clínicos, de onde também foram retiradas as informações clinicopatológicas a eles associadas (Anexo I). O grupo controle consiste de 70 indivíduos saudáveis, maiores de 18 anos, sem história familiar de câncer de cavidade oral, selecionados dentre os pacientes do Laboratório Clínico da PUC Goiás após aplicação do questionário socioeconômico (Anexo II) e assinatura do termo de conhecimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo III).

4.2. Amostras Biológicas para Extração de DNA

O material biológico dos casos selecionados foi proveniente de amostras tumorais fixadas e incluídas em parafina, obtidas por meio do arquivo de blocos do setor de Anatomia Patologia do Hospital Araújo Jorge. Foram disponibilizados cortes de cerca de 25µm de espessura para retirada de tecido tumoral parafinado. Os cortes foram transferidos para microtubos devidamente identificados, tomando todas as providências para evitar contaminação com DNA de outros blocos.

O material biológico do grupo controle foi constituído por alíquotas de sangue coletado pela própria equipe do Laboratório Clínico da PUC Goiás durante exames de rotina neste laboratório. As alíquotas de sangue foram colocadas em tubos devidamente identificados contendo EDTA, refrigeradas e encaminhadas ao Laboratório de Diversidade Genética da PUC Goiás. Tanto das amostras tumorais

quanto das amostras sanguíneas foi extraído DNA seguindo protocolo de extração mais adequado para cada tipo de material.

4.3. Aspectos Éticos da Pesquisa

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 IV).

4.4. Variáveis Dependentes

Diagnóstico clínico e histológico comprovado de câncer de cavidade oral.

4.5. Variáveis Independentes

Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes, evolução clínica da doença, polimorfismos em *GSTT* e *GSTM*, tabagismo e aspectos sociais e demográficos dos pacientes.

4.6. Critérios de Inclusão

No grupo de casos foram incluídos pacientes com diagnóstico de câncer de cavidade oral, comprovado histopatologicamente, que apresentaram dados clinicopatológicos nos respectivos prontuários, blocos de parafina disponíveis no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge que fossem suficientes para análise molecular. Os pacientes que não atenderam esses critérios foram excluídos do estudo (Figura 11). Os indivíduos incluídos no grupo controle não apresentaram histórico de câncer de cavidade oral.

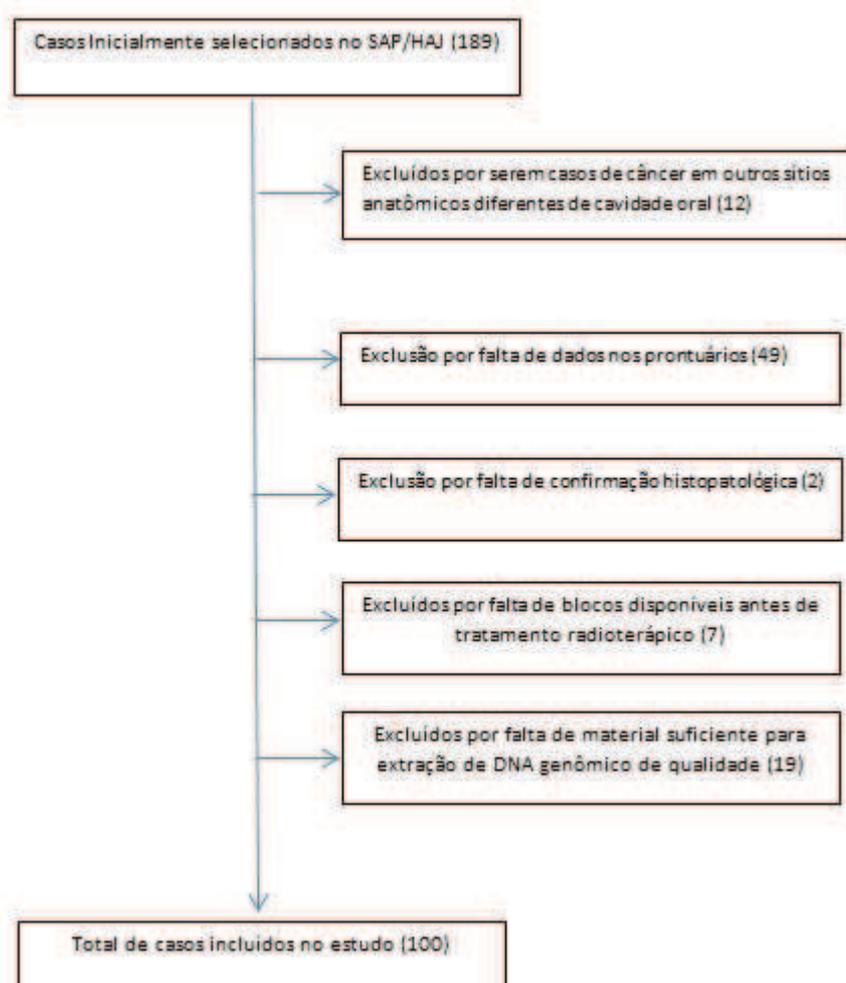


Figura 11. Fluxograma de exclusão de pacientes que não atenderam aos critérios estabelecidos para o grupo de casos do estudo.

4.7. Análise Molecular

4.7.1. Extração do DNA Genômico

Os indivíduos do grupo controle, que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o TCLE, tiveram suas amostras de sangue periférico coletadas durante realização de exames previstos no Laboratório Clínico da PUC Goiás. As amostras foram transferidas para o Laboratório de Diversidade Genética da PUC Goiás, onde foram realizadas as extrações de DNA. As extrações de DNA das amostras de sangue

periférico foram realizadas por meio do método *Salting Out* (Sambrooks, 1989) (Anexo V)

Para a extração de DNA das amostras tumorais foram utilizados cortes de blocos histológicos parafinados. Esses foram primeiramente desparafinizados e reidratados. Para a extração de DNA de qualidade do material parafinado, foi utilizado o kit WIZARD (Promega), seguindo orientações do fabricante.

4.7.2. Detecção e Genotipagem dos Polimorfismos

Após a extração do DNA das amostras, os polimorfismos genéticos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* foram determinados por amplificação do DNA genômico, por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando *primers* de sequência específica (PCR-SSP), conforme procedimento descrito por Haholu *et al.* (2013). O mix para as reações de PCR está especificado na Tabela 2.

Tabela 2. Mix para amplificação de fragmentos dos genes *GSTT1* e *GSTM1*.

Reagente	[] inicial	[] final	Volume para uma reação
Tampão 10x	[10x]	[1x]	2,5 ul
MgCl ₂	50 mM	2 Mm	1,0 ul
dNTP	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	25ul		15,5 ul
Total	-----	-----	25, 0 ul

Os iniciadores para *GSTM1* amplificam um fragmento de 75 pb e os iniciadores para *GSTT1* amplificam um fragmento de 70 pb (Tabela 3). A ausência da amplificação desses fragmentos indicou os genótipos nulos de *GSTT1* e *GSTM1*. Os fragmentos foram amplificados em termociclador seguindo protocolo de ciclagem (Tabela 3).

Tabela 3. Iniciadores e condições de amplificação para análise dos polimorfismos nos genes *GSTT1* e *GSTM1*.

Gene e Tamanho do fragmento	Iniciadores	Condições da reação
GSTM1 (75pb)	5'ATGGTTTGCAGGAAACAAGG3' 5'CCTCCATAACACGTGAAGCA3'	95 °C - 15min; 40 ciclos (94 °C-30s; 57 °C-30s; 72 °C-30s)
GSTT1 (70pb)	5'TTCCTGGGTGAGCCAGTATC3' 5'ACTGCAGGGTCACATCCAA3'	95 °C - 15min; 40 ciclos (94 °C-30s; 57 °C-30s; 72 °C-30s)

Nas amostras negativas para ambos os genes (*GSTM1* e *GSTT1*), um fragmento do gene humano *GAPDH* (Gliceraldeído-3 P-desidrogenase) com cerca de 100 pares de bases foi amplificado a fim de certificar a qualidade do DNA extraído.

4.8. Eletroforese

Após amplificação, os fragmentos foram submetidos a eletroforese em cuba contendo tampão TBE 10x. Para a visualização foi utilizado gel de acrilamida a 8%. O gel foi fixado e posteriormente corado com solução de AgNO₃ para visualização dos

amplicons. A presença do gene *GSTM1* e *GSTT1* foi confirmada pela amplificação de fragmentos de 75 pb e 70 bp, respectivamente (Figura 12).

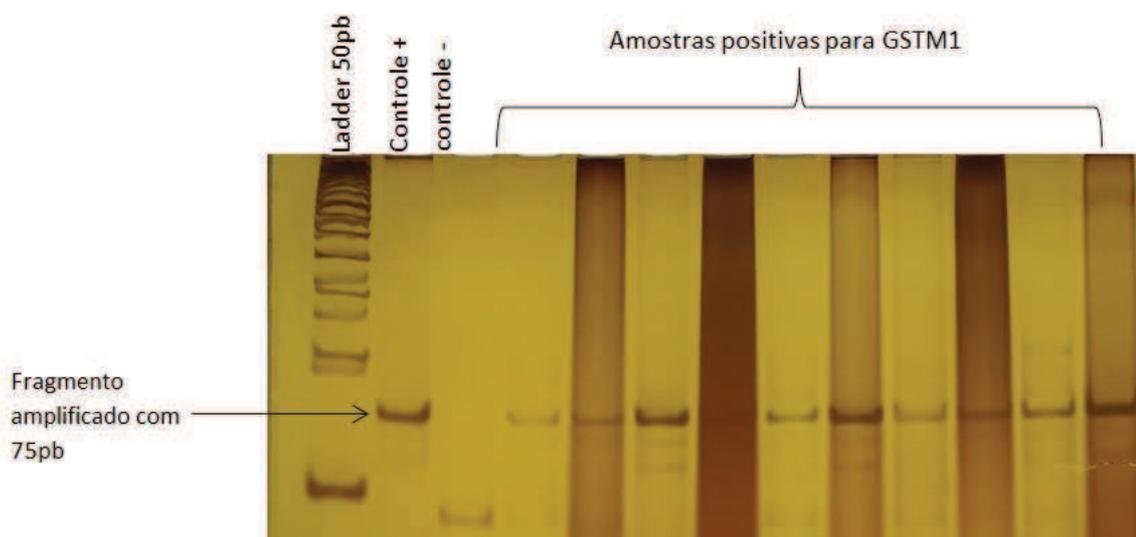


Figura 12. Visualização dos amplicons para o Gene *GSTM1*, em gel de Poliacrilamida 8%, corado com Nitrato de Prata. Ladder 50 para visualização dos fragmentos amplificados, controle positivo e controle negativo para confirmação da amplificação na PCR.

4.8.1. Análise dos Dados

Os dados obtidos dos prontuários dos pacientes com câncer de cavidade oral e dos controles foram tabulados em planilhas do Excel[®] e por meio de contagem direta e estatística descritiva foram obtidas as informações clinicopatológicas e sociodemográficas. Tais informações foram organizadas em tabelas de contingências.

Após configuração das tabelas de contingências, foram aplicados testes de estatística comparativa, como Chi-quadrado e teste exato de Fisher com nível de significância em 5% ($p < 0,05$), utilizando o software Graphpad. Para a análise de sobrevida utilizou-se o método de Kaplan Meier e a comparação entre as curvas, o método de Log-rank.

5. RESULTADOS

5.1. Variáveis Clinicopatológicas e Sociodemográficas

Dos 100 casos incluídos nesta pesquisa, 78 eram do sexo masculino e 22 do sexo feminino. A variação de idade foi representada por 18 pacientes com até 45 anos, 40 pacientes com idade entre 46 e 60 anos e 42 pacientes com idade acima de 60 anos.

Em relação aos fatores de risco, 82% dos casos eram tabagistas ou ex tabagistas e 10% não possuíam o hábito de fumar. Nesta amostragem, 47% dos casos eram consumidores de bebidas alcóolicas. As variáveis sociodemográficas estão relacionadas na Tabela 4.

Tabela 4. Variáveis sociodemográficas dos pacientes com câncer de cavidade oral incluídos no estudo.

Variável	n	f (%)
Sexo		
Masculino	78	78,0
Feminino	22	22,0
Idade ao diagnóstico		
Variação		23-100
≤45 anos	18	18,0
46-60 anos	40	40,0
>60 anos	42	42,0
Tabagismo		
Tabagista/Ex	82	82,0
Não tabagista	10	10,0
Não Informado	8	8,0
Etilismo		
Etilista	47	47,0
Não etilista	13	13,0
Não informado	40	40,0

Para as variações clinicopatológicas dos casos, não foram constatados pacientes com metástase à distância e 42% dos pacientes tiveram comprometimento linfonodal. Em relação ao grau tumoral, os mais prevalentes foram grau II e III com 63% e 21%, respectivamente. Quanto ao tamanho da lesão, T4 correspondeu a 43% dos casos (Tabela 5).

Tabela 5. Variáveis clinicopatológicas dos pacientes com câncer de cavidade oral incluídos no estudo.

Variável	n	f (%)
Metástase		
MX	10	10,0
M0	84	84,0
M1	0	0
Não informado	6	6,0
Linfonodos comprometidos		
NX	1	1,0
N0	51	51,0
N1	42	42,0
Não informado	6	6
Tamanho Tumor		
T1 (0-2cm)	8	8,0
T2 (>2<4cm)	16	16,0
T3 (>4cm)	25	25,0
T4 (>4cm Invasão áreas adjacentes)	43	43,0
Não Informado	7	7,0
Grau Tumoral		
GI	6	6,0
GII	63	63,0
GIII	21	21,0
GIV	1	1,0
Não Informado	9	9,0

Dos 70 indivíduos incluídos no grupo controle, 58,6% eram do sexo masculino e 41,4% eram do sexo feminino. Neste grupo, a variação de idade foi de 15,7% com menos de 45 anos, 34,3% com idade entre 46 e 60 anos e 50% acima de 60 anos. Dos 70 controles, 25,7% eram tabagistas ou ex-tabagistas e 74,3% não eram tabagistas. Quanto a ingestão de bebidas alcoólicas, 10% eram etilistas e 37,1% não etilistas (Tabela 6).

Tabela 6. Variáveis sociodemográficas dos indivíduos do grupo controle.

Variável	n	f (%)
Sexo		
Masculino	41	58,6
Feminino	29	41,4
Idade		
Variação	23-100	
≤45 anos	11	15,7
46-60 anos	24	34,3
>60 anos	35	50,0
Tabagismo		
Tabagista/Ex	18	25,7
Não tabagista	52	74,3
Etilismo		
Etilista	7	10,0
Não etilista	26	37,1
Não informado	37	52,9

5.2. Distribuição dos Polimorfismos

Dos 100 pacientes do grupo de casos genotipados para *GSTM1*, 28,0% apresentaram o genótipo nulo e 72,0% apresentaram genótipo positivo (+/+ ou +/-). Para *GSTT1*, 49,0% foram nulos e 51,0% foram positivos (+/+ ou +/-). No grupo controle, a frequência para *GSTM1* positivo foi de 68,5% e de *GSTM1* nulo foi de 31,5%. Para *GSTT1*, a frequência foi de 55,7% de positivos e 44,3% nulos (Tabela 7).

Tabela 7. Frequência genotípica de *GSTM1* e *GSTT1* no grupo de casos de pacientes com câncer de cavidade oral e no grupo controle.

	<i>GSTM1</i>		<i>GSTT1</i>	
	Positivo (+/+ ou +/-)	Nulo (-/-)	Positivo (+/+ ou +/-)	Nulo (-/-)
Frequência Genotípica do grupo de casos (n= 100)	72 (72,0%)	28 (28,0%)	51 (51,0%)	49 (49,0%)
Frequência Genotípica em controles (n= 70)	48 (68,5%)	22 (31,5%)	39 (55,7%)	31 (44,3%)
<i>p</i> -valor	0,755		0,652	

5.2.1. Distribuição Genotípica em Indivíduos Tabagistas e Não Tabagistas

A frequência do genótipo nulo para os indivíduos tabagistas e não tabagistas com câncer de cavidade oral está apresentada na Tabela 8. Para *GSTM1*, em tabagistas, a frequência do genótipo nulo foi de 30,5% e do genótipo positivo foi de 69,5%. Nos indivíduos não tabagistas, a frequência foi de 30% de genótipos nulos e 70,0% de genótipos positivos. Para *GSTT1*, a frequência foi de 48,8% de genótipos

nulos e 51,2% de genótipos positivos em tabagistas, e 50,0% de genótipos nulos e 50,0% de genótipos positivos nos não tabagistas.

Tabela 8. Frequência dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* distribuídos entre indivíduos tabagistas e não tabagistas.

	<i>GSTM1</i>		<i>GSTT1</i>	
	Nulo (n, %)	Positivo (n, %)	Nulo (n,%)	Positivo (n,%)
Tabagistas (n=82)	25 (30,5)	57 (69,5)	40 (48,8)	42 (51,2)
Não tabagistas (n=10)	3 (30,0)	7 (70,0)	5 (50,0)	5 (50,0)
p-valor	0,974		0,699	

A relação entre o hábito tabagista e o câncer de cavidade oral foi extremamente significativa ($p < 0,0001$), mostrando um aumento do risco de 23,6 para tabagistas desenvolverem o câncer de cavidade oral (Tabela 9).

Tabela 9. Frequência do hábito tabagista entre os grupos de casos e controles

Variável	Casos N (%)	Controles N (%)	p	OR
Tabagistas	82 (82,0)	18 (25,7)	<0,0001	23,6
Não tabagistas	10 (10,0)	52 (74,3)		

5.2.2. Genótipos Combinados de *GSTM1* e *GSTT1*

Os genótipos combinados de *GSTM1* e *GSTT1* estão apresentados na Tabela 10. Para os indivíduos com câncer de cavidade oral, a frequência de nulidade para ambos os genes (*GSTM1*- e *GSTT1*-) foi de 19%.

Tabela 10. Genótipos combinados de *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes com câncer de cavidade oral e indivíduos do grupo controle.

Grupo	N	Genótipos não duplo nulos n (%)	Genótipos duplo nulos n (%)	p	OR
Cancer de cavidade oral	100	81 (81,0)	19 (19,0) = 4,3	0,058	2,50
Controle	70	64 (91,4)	6 (8,6) = 10,7		

5.2.3. Associações dos Genótipos de *GSTT1* e *GSTM1* aos Fatores Prognósticos do Câncer de Cavidade Oral

Os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* não foram significativamente associados ao comprometimento metastático de linfonodos regionais (Tabela 11).

Tabela 11. Frequência dos genótipos *GSTT1* e *GSTM1* nos pacientes com comprometimento linfonodal e sem comprometimento linfonodal.

Genótipos	N0* (n=51) n (%)	N1**(n=42) n (%)	p-valor
<i>GSTM1</i> +	35 (68,6)	32 (76,2)	0,418
<i>GSTM1</i> -	16 (31,4)	10 (23,8)	
<i>GSTT1</i> +	26 (51)	23 (54,7)	0,714
<i>GSTT1</i> -	25 (49)	19 (45,3)	
Genótipo não duplo negativo***	41 (80,4)	34 (81)	0,945
Genótipo duplo nulo (<i>GSTM1</i> -/ <i>GSTT1</i> -)	10 (19,6)	8 (19)	

*Paciente sem comprometimento linfonodal

**Paciente apresentando comprometimento linfonodal

***Genótipo positivo independente da combinação (*GSTT1*+/*GSTM1*-; *GSTT1*-/*GSTM1*+ ou *GSTT1*+/*GSTM1*+)

A associação entre o grau histológico dos tumores avaliados e o polimorfismo de *GSTM1* e *GSTT1* não foi estatisticamente significativa (Tabela 12).

Tabela 12. Frequência dos polimorfismos associados ao grau tumoral dos carcinomas de cavidade oral.

Genótipos	I e II*	III e IV**	p-valor
	n (%)	n (%)	
<i>GSTM1</i> +	48 (69,5)	19 (86,4)	0,119
<i>GSTM1</i> -	21 (30,5)	3 (13,6)	
<i>GSTT1</i> +	35 (50,7)	11 (50,0)	0,954
<i>GSTT1</i> -	34 (49,3)	11 (50,0)	
Genótipo não duplo negativo ***	54 (78,3)	20 (91,0)	0,185
Genótipo duplo nulo (<i>GSTM1</i> -/ <i>GSTT1</i> -)	15 (21,7)	2 (9,0)	

*Pacientes com grau tumoral I ou II

**Pacientes com grau tumoral III ou IV

*** Genótipo positivo independente da combinação (*GSTT1*+/*GSTM1*-*GSTT1*-/*GSTM1*+ ou *GSTT1*+/*GSTM1*+))

A associação do tamanho dos tumores avaliados e o genótipo nulo de *GSTT1* e *GSTM1* não foi estatisticamente significativa (Tabela 13)

Tabela 13. Frequência dos polimorfismos associados ao tamanho do tumor nos carcinomas de cavidade oral.

Genótipos	T1 e T2*(n=24)	T3 e T4** (n=68)	p-valor
	n (%)	n (%)	
<i>GSTM1</i> +	18 (75,0)	49 (72,0)	0,119
<i>GSTM1</i> -	6 (25,0)	19 (28,0)	
<i>GSTT1</i> +	12 (50,0)	36 (53,0)	0,954
<i>GSTT1</i> -	12 (50,0)	32 (47,0)	
Genótipo não duplo negativo ***	21 (87,5)	53 (78)	0,185
Genótipo duplo nulo (<i>GSTM1</i> -/ <i>GSTT1</i> -)	3 (12,5)	15 (22)	

*Pacientes com tumor T1 ou T2

**Pacientes com tumor T3 ou T4

*** Genótipo positivo independente da combinação (*GSTT1*+/*GSTM1*-; *GSTT1*-/*GSTM1*+ ou *GSTT1*+/*GSTM1*+)

A frequência dos genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* foi investigada também quanto ao número de óbitos dos casos. O número de óbitos registrados, independentemente da causa, foi de 51%. Dos 51 óbitos, 13 apresentavam genótipos nulos para *GSTM1*, 23 nulos para *GSTT1* e apenas 7 tiveram dupla nulidade (Tabela 14).

Tabela 14. Relação dos polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1* com óbitos registrados no grupo de casos.

Genótipos	Óbitos (n=51)	Vivos (n=49)	p-valor
<i>GSTM1</i> +	38	34	0,567
<i>GSTM1</i> -	13	15	
<i>GSTT1</i> +	28	23	0,425
<i>GSTT1</i> -	23	26	
Genótipo não duplo negativo	44	37	0,170
Genótipo duplo nulo (<i>GSTM1</i> -/ <i>GSTT1</i> -)	7	12	

5.2.4. Sobrevida Global e Sobrevida Associada aos Genótipos *GSTM1* e *GSTT1*

A sobrevida global em cinco anos para os pacientes com carcinoma de cavidade oral incluídos neste estudo foi de 51,71% (Figura 13). Quando relacionada aos genótipos a sobrevida foi de 49,9% para o genótipo *GSTM1* positivo, 58,4% para *GSTM1* nulo (Figura 14). Para o genótipo *GSTT1* positivo a sobrevida foi de 48% e de 57,1% para *GSTT1* nulos (Figura 15).

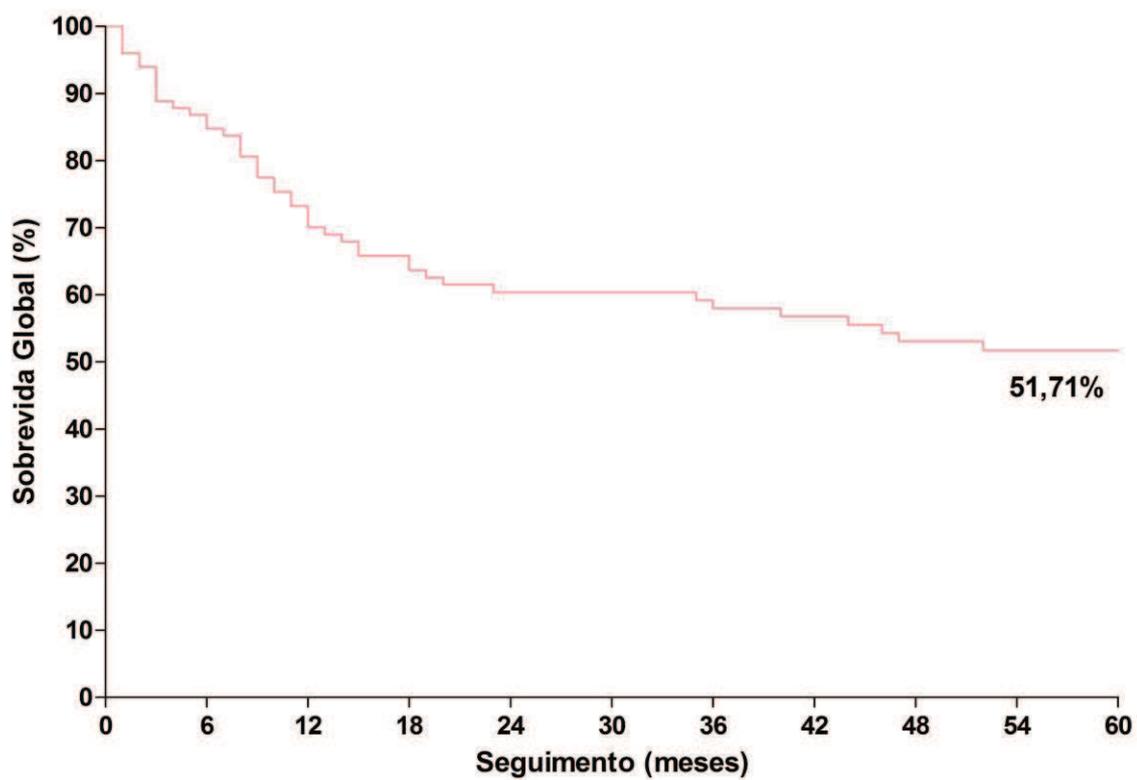


Figura 13. Sobrevivida global dos pacientes com carcinoma de cavidade oral incluídos no estudo.

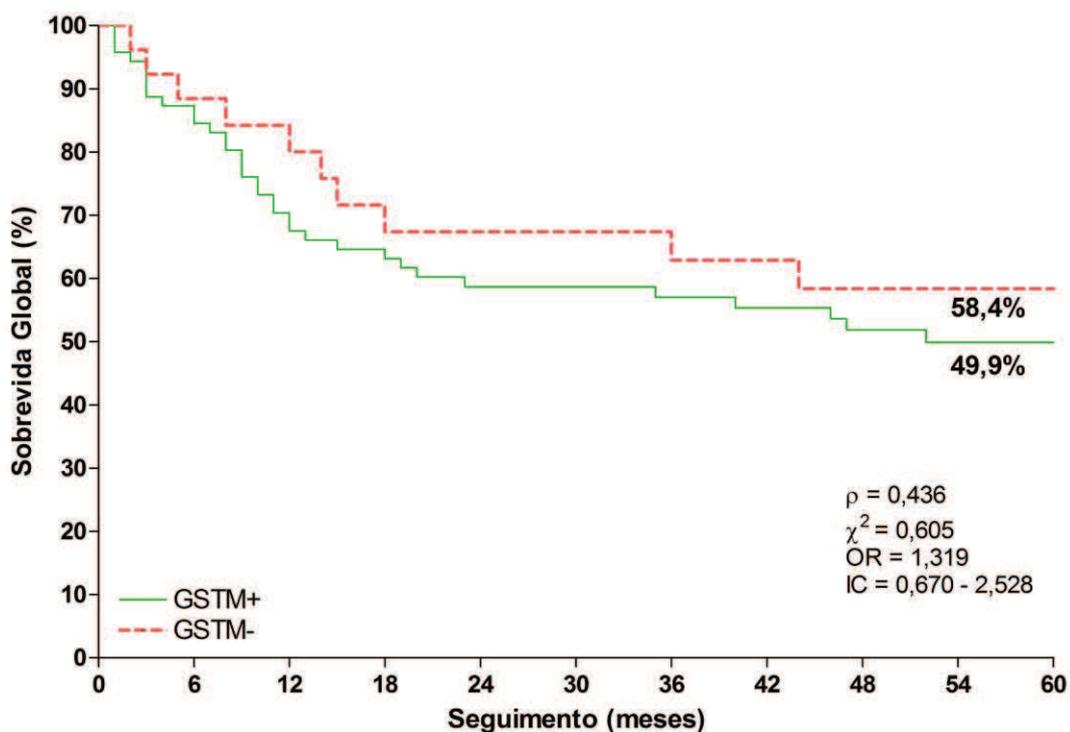


Figura 14. Sobrevida global dos pacientes com carcinoma de cavidade Oral incluídos no estudo e associação aos genótipos nulo e resente de *GSTM1*.

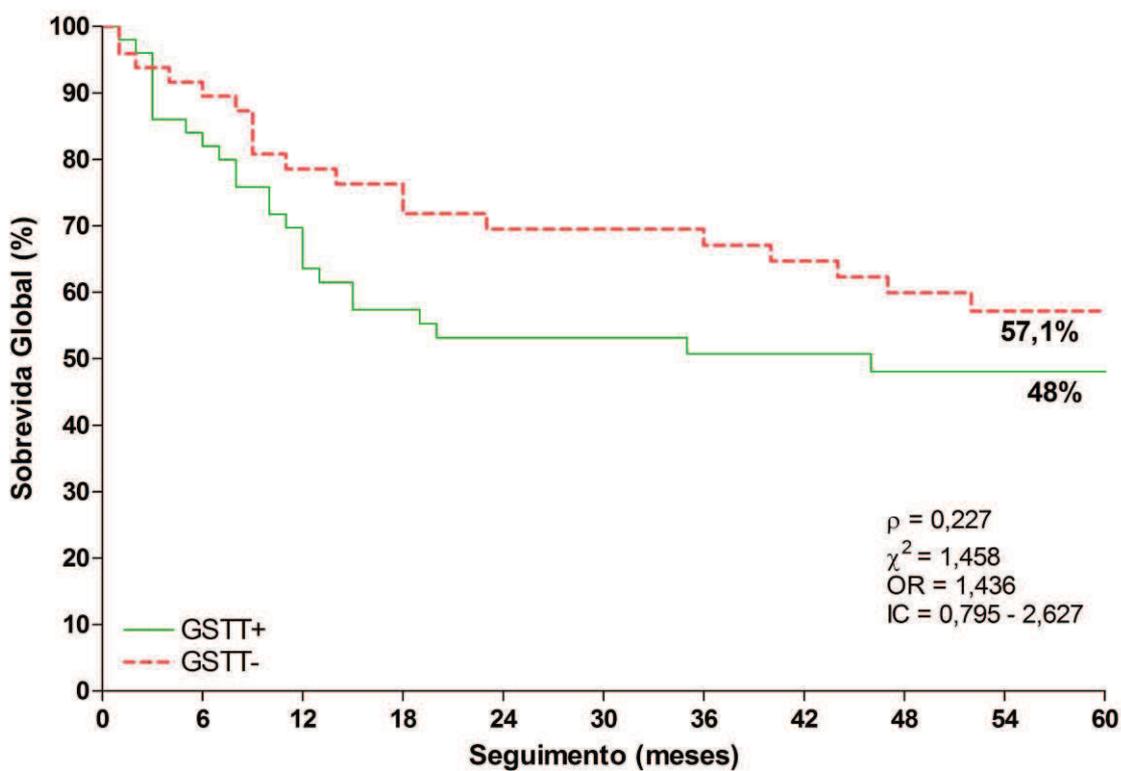


Figura 15. Sobrevida global dos pacientes com carcinoma de cavidade oral incluídos no estudo e associação aos genótipos nulo e presente de *GSTT1*.

6. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm sido realizados em diferentes populações a fim de elucidar a importância de genes metabolizadores de xenobióticos e a influência que as frequências de seus polimorfismos exercem sobre alguns tipos de câncer (Sugimura *et al.*, 2006, Sharma *et al.*, 2006; Biseli *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2010; Anantharaman, 2011; Singh, 2014). Dois desses genes são *GSTM1* e *GSTT1*. Este estudo avaliou a associação entre os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* e o risco para o câncer de cavidade oral e ainda as associações ao tabagismo.

Dentro do grupo de casos, 78% eram homens e a idade mais prevalente foi acima dos 45 anos em mais de 80% dos casos. Esses dados se comparam com as estimativas (Ferlay 2012; INCA 2016), que apontam a população masculina e a faixa etária acima dos 45 anos como as mais prevalentes em casos de carcinoma de cavidade oral. Mudanças no hábito de vida das mulheres, bem como em populações mais jovens, como maior exposição aos fatores de risco, ainda são relativamente recentes, porém, o aumento do tempo de exposição aos fatores de risco provavelmente levarão a um aumento significativo de casos na população feminina, tornando o grupo de risco mais homogêneo. Almeida (2011) e Toporcov (2015) descreveram que o câncer de cavidade oral, em população mais jovem, está mais associado a história familiar da doença do que aos fatores de risco. Essa informação respalda o fato de 82% do grupo estudado apresentar idade superior a 45 anos e 82% ser tabagista.

Os fatores de risco associados ao câncer de cavidade oral estão bem estabelecidos. Estimativas globais (Ferlay 2012) e nacionais (INCA 2016), além de muitos autores importantes, como GALBIATTI (2013), apontam o tabaco e o álcool como os fatores de risco mais frequentemente associados aos tipos de câncer de

cabeça e pescoço, especialmente ao de cavidade oral e orofaringe. Esse dado, mais uma vez reforça o fato de a grande maioria dos casos do grupo estudado ser composta por tabagistas.

A frequência do genótipo *GSTM1* e *GSTT1* é bem heterogênea nas diferentes populações. A maioria dos estudos envolvendo os genótipos das Glutathionas S-transferases, o hábito de fumar e o risco para o câncer, apesar de seguir metodologias semelhantes, apresenta divergência em seus resultados (Tabela 1). Alguns autores (Anantharaman 2011; Singh 2014) estabeleceram relação significativa com os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* e o aumento do risco para o câncer de cavidade oral, diferentemente do presente estudo que não demonstrou esta associação. A frequência genotípica nula de *GSTM1* e *GSTT1* no grupo de casos incluído nesse estudo foi de 28% e 49%, respectivamente, divergindo de outros trabalhos (Sugimura *et al.*, 2006, Sharma *et al.*, 2006; Biseli *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2010) que, mesmo não encontrando associação significativa, obtiveram uma frequência maior de *GSTM1* nulos em relação aos *GSTT1* nulos.

As variáveis relacionadas ao prognóstico da doença também foram avaliadas, a fim de investigar alguma associação com os polimorfismos nulos de *GSTM1* e *GSTT1*. Comprometimento linfonodal, tamanho do tumor e grau histológico tumoral não foram significativamente associados aos polimorfismos nulos. Contudo, é conhecido que os fatores prognósticos para o câncer de cavidade oral dependem do sítio anatômico acometido pelo tumor (INCA, 2012). Sendo assim, é necessário que um estudo complementar a este, avalie separadamente o estadiamento clínico em função do sítio anatômico. Com base neste grupo de casos, avaliando os fatores prognósticos de forma geral e levando em consideração a falta de associação significativa com os polimorfismos genéticos, pode-se afirmar que o câncer de cavidade oral está mais

fortemente associado aos fatores de risco, como a idade e o tabagismo do que com fatores prognósticos.

O câncer de cavidade oral apresenta um protocolo de tratamento bastante agressivo, pois essa região anatômica é extremamente vascularizada, sendo assim as cirurgias são mais invasivas com o intuito de evitar metástase (Almeida *et al.*, 2011). Esse dado explica o fato de que apesar da maior parte dos casos se concentrarem em estágios mais precoces da doença (N0 e M0), a mortalidade registrada para o grupo foi bastante elevada (Figura 13). A sobrevida global em cinco anos do grupo estudado foi de 51,71% e quando avaliada em relação aos fatores de risco também não apresentou associações estatisticamente significativas.

As maiores limitações encontradas neste estudo foram a falta de informações nos prontuários clínicos e a dificuldade de pareamento dos indivíduos do grupo controle com o grupo de casos, uma vez que o nosso grupo de casos é bastante específico com características muito particulares. A técnica empregada também limita, em partes, a qualidade dos resultados, uma vez que não nos permite a diferenciação entre expressão homozigótica e heterozigótica do polimorfismo nulo. Essa diferenciação seria interessante para uma avaliação da atividade enzimática nos indivíduos.

Neste estudo, não foi possível estabelecer uma associação significativa entre os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e o aumento do risco para o câncer de cavidade oral, bem como não foi estabelecida nenhuma associação dos polimorfismos com o hábito tabagista.

Outras variáveis clinicopatológicas foram avaliadas e a associação significativa com os polimorfismos também não foi encontrada. Desta forma, fica evidenciado que o câncer de cavidade oral está amplamente associado a fatores de risco, caracterizando-se como uma doença de consequência da exposição ambiental.

Entretanto, como a via de biotransformação de xenobióticos está associada com uma ampla variedade de genes, é necessário que mais estudos sejam realizados a fim de investigar a influência de polimorfismos genéticos no aumento do risco para o câncer de cavidade oral.

Estes estudos constituem novas perspectivas de prevenção e controle para o carcinoma de cavidade oral e outros tipos de carcinogênese possivelmente ativadas por agentes carcinógenos tóxicos.

7. CONCLUSÃO

Diferenças significativas entre as frequências dos polimorfismos de *GSTT1* e *GSTM1* não foram observadas entre o grupo de pacientes com câncer de cavidade oral e controles.

Os polimorfismos de *GSTT1* e *GSTM1* não foram significativamente associados aos fatores de risco do câncer de cavidade oral, especialmente ao tabagismo.

Os polimorfismos de *GSTT1* e *GSTM1* não foram significativamente associados aos prognósticos dos carcinomas de cavidade oral.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA FCS. *et al.* Fatores prognósticos no câncer de boca. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. 15(4): 471 - 478. 2011.

AMTHA R, CHING CS, ZAIN R, RAZAK IA, BASUKI B, ROESLAN BO, GAUTAMA W, PURWANTO D. GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 Polymorphisms and Risk of Oral Cancer: a Case-control Study in Jakarta, Indonesia. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. vol 10: 21 – 26. 2009.

ANANTHARAMAN D, CHAUBAL PM, KANNAN S, BHISEY RA, MAHIMKAR MB. Susceptibility to oral cancer by genetic polymorphisms at CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 loci among Indians: tobacco exposure as a risk modulator. **Carcinogenesis**. 28: 1455 – 1462. 2007.

ANANTHARAMAN D, SAMANT TA, SEN S, MAHIMKAR MB. Polymorphisms in tobacco metabolism and DNA repair genes modulate oral precancer and cancer risk. **Oral Oncol**. 47: 866 – 872. 2011.

ASAKAGE T *et al.* Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases, and drinking, smoking and diet in Japanese men with oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. **Carcinogenesis**. vol. 28, nº4: 865 – 874. 2007.

BANDEIRA CM, ALMEIDA AA, GONÇALVES AJ. Polimorfismos genéticos da família Citocromo P450 e carcinoma de células escamosas de cavidade oral, faringe e laringe. **Rev. Col. Bras. Cir.** 41(5): 366 - 373. 2014.

BARNES L, EVESON JW, REICHAERT P, SIDRANSKY D. Pathology & Genetics. Head and Neck Tumors. **Lyon: IARC Press**. 430p. 2005.

BHISEY RA. Chemistry and toxicology of smokeless tobacco. **Indian Journal of Cancer**. 49: 364 - 372. 2012.

BISELLI JM *et al.* Polimorfismos GSTT1 e GSTM1 em indivíduos tabagistas com carcinoma espiocelular de cabeça e pescoço. **Braz J. Otorrinolaryngol**. 72(5): 654 – 8. 2006.

BOING AF, ANTUNES & FERREIRA JL *et al.* How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk?. **Journal Epidemiology Community Health**. 65: 709 - 714. 2011.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília: Diário Oficial da União, 2013. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 466/2012.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília: Diário Oficial da União, 2013. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 466/2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer.- INCA. **Falando Sobre Câncer da Boca**. – Rio de Janeiro: INCA. 2002.

BUCH SC, NAZAR-STEWART V, WEISSFELD JLMD, ROMKES M. Case–Control Study of Oral and Oropharyngeal Cancer in Whites and Genetic Variation in Eight Metabolic Enzymes. **Head & Neck**. Published online 18 July 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/hed.20867.

CANEPA P *et al*. HPV related diseases in males: a heavy vaccine-preventable burden. **J. Prev. Med. Hyg.** vol. 54, p. 61 - 70. 2013.

CARLI LM, ANTOS SL, PEREIRA A A C, HANEMANN JAC. Características Clínicas, Epidemiológicas e Microscópicas do Câncer Bucal Diagnosticado na Universidade Federal de Alfenas. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 55(3): 205 - 211. 2009.

CARRARD VC, PIRES AS, PAIVA RL, CHAVES AC, FILHO MS. Álcool e Câncer Bucal: Considerações sobre os Mecanismos Relacionados. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 54(1): 49 - 56. 2008.

CHARRIER J, MAUGARD C M, LE M B *et al*. Allelotype influence at glutathione S-transferase M1 locus on breast cancer susceptibility. **British Journal of Cancer**. 79(2): 346 – 353. 1999.

ESQUENAZI D *et al*. A frequência do HPV na mucosa oral normal de indivíduos sadios por meio da PCR. **Braz J. Otorrinolaryngol**. 76(1): 78 – 84. 2010.

FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R *et al*. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**. 359 - 386. 2015.

FERREIRA VF, NEDEL F, ETGES A, GOMES APN, FURUSE C, TARQUINIO SBC. Etiologic Factors Associated with Oral Squamous Cell Carcinoma in Non-Smokers and Non-Alcoholic Drinkers: Brief Approach. **Brazilian Dentist Journal**. 23(5): 586 - 590. 2012.

GALBIATTI AS *et al*. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. **Braz J. Otorrinolaryngol**. 79(2): 239 – 47. 2013.

GATTÁS GJ, de CARVALHO MB, SIRAQUE MS *et al*. Genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. **Head Neck**. 28: 819 – 826. 2006.

HAHOLU A, BERBER U, KARAGOZ B, TUNCEL T, BILGI O, DEMIREL D. Is there any association of Glutathione S-transferase T1 (GSTT1) and Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) gene polymorphism with gastric cancers? **Pol J Pathol**. 64: 247 – 52. 2013.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 89. Smokeless tobacco and some tobacco-specific N-nitrosamines. **Lyon, France: IARC.** 2007. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/recentpub/mono89.pdf>. [Last accessed on 2012 Dec 20]

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. p. 1 – 124. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. p. 1 – 124. 2014.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). IARC Monogr. Eval. 69 Carcinog. Risk to Human – Human Papillomaviruses. **Lyon.** p. 90. 2007.

LEME CDD, RAPOSO LS, RUIZ MT, BISELLI JM, GALBIATTI ALS, MANIGLIA JV, BERTELLI ECP, BERTOLO EMG. Análise dos genes GSTT e GSTM em pacientes com cancer de cabeça e pescoço. **Rev Assoc Med Bras.** 56(3): 299 - 303. 2010.

LIN C *et al.* Cytocrome P450 Metabolism of Betel Quid-Derived Compounds: Implications for the Development of Prevention Strategies for Oral and Pharyngeal Cancers. **The Scientific World Journal.** 2013.

LUBIN JH, MUSCAT J *et al.* An examination of male and female odds ratios by BMI, cigarette smoking, and alcohol consumption for cancers of the oral cavity, pharynx, and larynx in pooled data from 15 case-control studies. **Cancer Causes Control.** 22: 1217 - 1231. 2011.

NEMOTO RP, VICTORINO AA *et al.* Oral cancer preventive campaigns: we are reaching the real target?. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology.** 81(1). 2015.

OLIVEIRA JMB, PINTO LO, LIMA NGM, ALMEIDA GCM. Câncer de Boca: Avaliação do Conhecimento de Acadêmicos de Odontologia e Enfermagem quanto aos Fatores de Risco e Procedimentos de Diagnóstico. **Revista Brasileira de Cancerologia.** 59(2): 211 - 218. 2013.

PETERS ES, McCLEAN MD, MARSIT CJ, LUCKETT B, KELSEY KT. Glutathione S-transferase polymorphisms and the synergy of alcohol and tobacco in oral, pharyngeal, and laryngeal carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 15: 2196 – 2202. 2006.

QUEIROZ ABP *et al.* Estudo de p27, p21, p16 em epitélio escamoso normal, papiloma escamoso e carcinoma de células escamosas da cavidade oral. **J Bras Patol Med Lab.** 45(6): 481 - 488. 2009.

QUINTERO K *et al.* Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. **Braz J. Otorrinolaryngol.** 79(3): 375 – 81. 2013.

RODRIGUEZ MH *et al.* Role of Cytochrome P-450 Genetic polymorphisms in oral carcinogenesis. **Journal of Pathology and Medicine.** 41: 1 – 8. 2012.

RUWALI M, SINGH M, PANT MC, PARMAR D. Polymorphism in glutathione S-transferases: susceptibility and treatment outcome for head and neck cancer. **Xenobiotica**. 41(12): 1122 – 1130. 2011.

SÁ, RA *et al.* Human glutathione S-transferase polymorphisms associated with prostate cancer in the Brazilian population. **Int Braz J Urol**. 40: 463 – 73. 2014.

SHARMA A, MISHRA A, DAS BC, *et al.* Genetic polymorphism at GSTM1 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer. **Neoplasma**. 53: 309 - 315. 2006.

SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2015. **Cancer J Clin**. 65: 5 – 29. 2015.

SINGH RD, HARIDAS N, SHAH FD, PATEL JB, SHUKLA SN, PATEL PS. Gene polymorphisms, tobacco exposure and oral cancer susceptibility: a study from Gujarat, West India. **Oral Diseases**. 20: 84 – 93. 2014.

STEPANOV I, YERSHOVA K, CARMELLA S, UPADHYAYA P, HECHT SS. Levels of (S) - N'-Nitrosonornicotine in U.S. Tobacco Products. **Nicotine & Tobacco Research**. 15: 1305 - 1310. 2013.

SCHEMIT, E.C. Ação da glutamina sobre o estresse oxidativo e processo inflamatório na insuficiência hepática aguda grave. Faculdade de Medicina UFRGS – Monografia de Mestrado. 2014.

SUGIMURA T, KUMIMOTO H, TOHNAI I, *et al.* Gene-environment interaction involved in oral carcinogenesis: molecular epidemiological study for metabolic and DNA repair gene polymorphisms. **J Oral Pathol Med**. 35: 11 – 8. 2006.

SZYFTER K *et al.* Carcinogen: DNA adducts in tobacco smoke-associated cancer of the upper respiratory tract. **Acta Biochimica Polonica**. 46(2): 275 - 287. 1999.

SZYMANSKA K, HUNG RJ, WUNSCH-FILHO V *et al.* Alcohol and tobacco, and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Latin America: a case-control study. **Cancer causes Control**. 22: 1037 – 1046. 2011.

TOPOCOV TN, ZNAOR A *et al.* Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium. **International Journal of Epidemiology**. 169 - 185. 2015.

VENTURI BRM, PAMPLONA ACF, CARDOSO AS. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in young patients and its increasing incidence: literature review. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**. 70(5): 679 - 686. 2004.

WÜNSCH FILHO V; GATTÁS, GJF; Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cad. De Saúde Pública**. 17(3): 467 - 480. 2001.

YADAV DS, DEVI TR, IHSAN R, MISHRA AK, KAUSHAL M, CHAUHAN PS, BAGADI SAR, SHARMA J, ZAMOAWIA E, VERMA Y, NANDKUMAR A, SAXENA S, KAPUR S. Polymorphisms of Glutathione-S-Transferase Genes and the Risk of Aerodigestive Tract Cancers in the Northeast Indian Population. **Genetic Testing And Molecular Biomarkers**. Volume 14, Number 5. 2010.

YAN H, SUN X, DEN W *et al.* GSTP1, GSTM1, and GSTT1 Polymorphisms in tib mountaineers. **Biology of Sport**. vol. 23 n°3. 2006.

ANEXOS

ANEXO I

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

PROJETO: ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO TABAGISMO E ETILISMO EM CARCINOMAS DE CAVIDADE ORAL

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____

Telefone: _____

Naturalidade: _____ Procedência: _____

Profissão: _____

Sexo:

(1) Masculino (2) Feminino

Estado civil:

(1) Solteiro (2) Casado (3) viúvo (4) outro

Escolaridade:

(1) Fundamental (2) Ens. Médio (3) superior (4) Outro _____

Etnia/cor:

(1) branco (2) Pardo (3) Negro (4) Outro _____

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) Ex etilista (4) Não informado

Frequência:

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

Tipo de bebida:

(1) Destilados (2) Fermentado (3) Não informado

Infeção por HPV

(1) Sim (2) Não (3) Não informado

Histórico de lesão oral:

(1) Sim (2) Não (3) Não informado

Antecedente câncer:

(1) Sim (2) Não (3) Não informado

Histórico familiar de câncer:

(1) Sim (2) Não (3) Não informado

Doença crônico-degenerativas: (Diabetes, cardiovasculares)

(1) sim (2) Não (3) Não informado

Quais? _____

Higiene oral:

(1) Boa (2) Regular (3) Ruim (4) não Informado

Visita regular ao dentista:

(1) Sim (2) Não (3) Não informado

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

ANEXO II

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

PROJETO: POLIMORFISMOS EM TUMORES DE CAVIDADE ORAL E OROFARINGE

Prontuário: _____ Data do diagnóstico: ___/___/___
Nome: _____ Data de nascimento: ___/___/___
Endereço: _____ Telefone: _____
Naturalidade: _____ Profedência: _____
Profissão: _____

Sexo: (1) Masculino (2) Feminino
Estado civil: (1) Solteiro (2) Casado (3) Outro (4) Não informado
Escolaridade: (1) Fundamental (2) Ens. Médio (3) superior (4) Não informado
Raça/cor: (1) branco (2) Pardo (3) Negro (4) Outro _____

Tabagismo: (1) Sim (2) Não (3) Não informado (4) Ex tabagista _____
Frequência: (1) Às vezes (2) Diariamente (3) Não informado
Quantidade: (1) < 1 maço (2) de 1 a 3 maços (3) > 3 maços
Tempo de uso: _____
Etilismo: (1) Sim (2) Não (3) Não informado (4) Ex etilista _____
Tempo de uso: _____
Frequência: (1) Às vezes (2) Diariamente (3) Não informado
Tipo de bebida: (1) Destilados (2) Fermentado (3) Não informado
Uso de drogas ilícitas (1) Sim (2) Não (3) Não informado

Opção sexual: (1) Homossexual (2) Heterossexual (3) Não informado
Nº de parceiros (1) 1 a 4 (2) mais de 4 (3) Não informado
Prática de sexo oral: (1) Sim (2) Não (3) Não informado
Histórico Infecção por HPV (1) Sim (2) Não (3) Não informado
Histórico de lesão oral (1) Sim (2) Não (3) Não informado
Queixas () tosse () disfagia () dor de garganta () outros _____

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

Higiene oral diário () boa () regular () ruim
Visita dentista regular (1) Sim (2) Não (3) Não informado

DIAGNÓSTICO

Exame: ___/___/___ Resultado: _____
Diagnóstico por biópsia: ___/___/___ Tipo de biópsia: _____
Nº biópsia: _____
Resultado: _____

TRATAMENTO CIRÚRGICO: (1) Sim (2) Não
Cirurgia realizada: _____ Data: ___/___/___

TRATAMENTO RADIOTERAPICO: (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: _____

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 ____/____/____.

DADOS ANTAMO PATOLOGICO

Grau tumoral _____

Índice mitótico _____

Tipos de lesão, após exames histopatológicos (aspectos histológicos)

Outras biópsias

Nº _____ Data ____/____/____

Resultado _____ Nº _____

_____ Data ____/____/____

Resultado _____

ANEXO III

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 – CAVIDADE ORAL

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 de boca (câncer de cavidade oral) é considerado um problema de saúde pública e os dois principais fatores associados ao aparecimento da doença são o tabagismo (hábito de fumar) e o etilismo (hábito de ingerir bebidas alcoólicas). Apesar das campanhas de prevenção e da possibilidade de descoberta da doença bem no início, o câncer de boca ainda mata muitos homens e mulheres no mundo todo.

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 de boca, essas diferenças individuais estão associadas principalmente com a capacidade do organismo humano transformar e eliminar as substâncias químicas presentes no cigarro e no álcool. Sendo assim, diferenças genéticas podem determinar se o indivíduo tem maior ou menor chance de desenvolver doenças associadas ao cigarro e ao álcool, como o câncer de boca (câncer de cavidade oral).

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

O material genético (genes ADH, 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 álcool e do cigarro. Essas variações genéticas podem tornar o indivíduo mais ou menos sensível às substâncias tóxicas do álcool e do cigarro e dessa forma desenvolver ou não um câncer de boca.

Como você é uma pessoa saudável, fará parte do grupo controle, sem história pessoal ou familiar de câncer de cavidade oral (câncer de boca), e os dados a serem estudados em uma amostra do seu sangue serão comparados com aqueles estudados em indivíduos com câncer de cavidade oral.

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 (ADH, 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 e do álcool.

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 de boca (cavidade oral), além de explicar melhor os efeitos do cigarro e do álcool no organismo humano. 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.

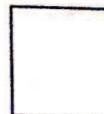
- Eu desejo ser informado (a) sobre o resultado do teste genético realizado em minha amostra de sangue, quanto à minha maior ou menor suscetibilidade às substâncias tóxicas do álcool e do cigarro.

Local e data: _____

Nome e assinatura do participante da pesquisa ou do responsável legal

Assinatura Dactiloscópica:

Nome e assinatura do pesquisador responsável



ANEXO IV

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: 1

CAAE: 45582615.5.0000.0031

Instituição Proponente: ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CANCER EM GOIAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.110.215

Data da Relatoria: 11/06/2015

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO: O etilismo e o tabagismo são importantes fatores de risco para vários tipos de câncer em seres humanos. A carcinogênese é um processo multifatorial, resultante de interações entre características genéticas e fatores ambientais (GALBIATTI et al, 2013; INCA, 2014). Gradativamente, os mecanismos envolvidos na carcinogênese promovida pelo álcool e o tabaco vem sendo elucidados, bem como a relação entre esses fatores e os diferentes tipos de câncer (SANKPAL et al., 2012). O tabaco apresenta inúmeras substâncias carcinogênicas, como as nitrosaminas e as aminas 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 várias enzimas, com destaque para as Glutathione-S-transferases (GST e GSTM) (LEME et al., 2010). Glutathione-S-Transferases (GST) constituem uma família de enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos encontrados no cigarro, e atuam protegendo as células de efeitos oxidativos deletérios. A deleção homozigótica ou genótipo nulo de GSTM1 e GSTT1 resulta em diferenças fisiológicas e até na ausência da atividade dessa enzima,

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: 1.110.215

podendo favorecer a suscetibilidade ao câncer).

Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar as possíveis associações entre os polimorfismos dos genes ADH, GSTT1 e GSTM1 e o risco de câncer de cavidade oral e câncer do colo uterino

1) Comparar a frequência dos polimorfismos genéticos de ADH, GSTT1 e GSTM1 em pacientes com câncer de cavidade oral e em indivíduos saudáveis; 2) Comparar a frequência dos polimorfismos genéticos de GSTT1 e GSTM1 em pacientes com câncer de colo uterino e em indivíduos saudáveis; 3) Avaliar as possíveis associações entre os polimorfismos genéticos avaliados e os fatores de risco para o câncer de colo uterino e cavidade oral, especialmente com relação ao etilismo e tabagismo; 4) Investigar as possíveis associações entre os polimorfismos genéticos e os aspectos clinicopatológicos dos tumores avaliados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

previstos ou transtornos evidentes aos participantes do grupo controle incluem aqueles relacionados à coleta de sangue periférico, obtida por punção venosa, incluindo possível desconforto, hematomas ou extravasamento do vaso.

Os princípios enunciados na Resolução no 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde serão obedecidos durante a realização do estudo, mantendo-se em sigilo a identidade dos pacientes, cujos dados serão identificados apenas pelo número de registro no projeto.

com os tumores analisados neste projeto permitirão a melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na carcinogênese promovida pelo tabaco e o álcool. Tais resultados possibilitam o planejamento de programas e campanhas de prevenção mais efetivos, reforçando e explicando os mecanismos de carcinogênese associados ao tabaco e ao álcool.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

trata-se Estudo epidemiológico transversal e analítico, tipo caso-controle, com a utilização dos dados clínico e epidemiológicos colhidos a partir dos prontuários dos pacientes e análise de polimorfismos nos genes ADH, GSTT1 e GSTM1 em pacientes com câncer de cavidade oral ou câncer de colo uterino e em controles saudáveis. 2 - Seleção de sujeitos e coleta de dados clínico-epidemiológicos: O grupo de casos será constituído por 100 participantes com câncer de cavidade oral e 200 participantes com câncer de colo uterino, com diagnóstico clínico e histopatológico confirmados e assistidos no Hospital Araújo Jorge. O número de indivíduos selecionados para este estudo, em ambos os grupos, foi determinado por cálculo estatístico, baseado no número de novos casos de câncer de cavidade oral e câncer de colo uterino esperados em Goiás, determinado por

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: 1.110.215

cálculo estatístico, baseado no número de novos casos de câncer de cavidade oral e câncer de colo uterino esperados em Goiás, sexo, sem história pessoal ou familiar de câncer de cavidade oral. O grupo controle, a ser comparado às pacientes com câncer de colo uterino, consistirá de 200 mulheres saudáveis, maiores de 18 anos, pareadas por idade, sem história pessoal ou familiar de câncer de colo uterino.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

foi apresentado folha de rosto, TCLE colo utero e cavidade oral, declaração do pesquisador, carta autorização do serviço cabeça e pescoço e ginecologia e mama, declaração de responsabilidade do pesquisador, carta autorização da patologia, carta de autorização da diretoria e arquivo medico tem orçamento e cronograma mas depende de financiamento do FAPEG goias

Recomendações:

A pesquisadora deverá apresentar justificativa para a inclusão de participantes saudáveis;

No TCLE:

Deverá ser oferecida aos participantes da pesquisa a opção de escolher entre serem informados ou não sobre os resultados de seus exames (Resolução 340/2004 III.4);

Esclarecer se já é o momento (se é o caso) de proposta de aconselhamento genético (Resolução 340/2004 III.5).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador tem 30 dias para apresentar a resposta às pendências acima listadas

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

pendente

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: 1.110.215

GOIANIA, 16 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 V

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, microcentrífugas 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.



ANEXO VI



MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Programa de Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde
Laboratório de Genética e Biodiversidade

EXTRAÇÃO DE DNA Solução Salina

1. Adicione 400µL de sangue total + 1200µL de Solução de Lise RBC 1x;
2. Homogeneizar no vórtex e incubar em T.A por 5’;
3. Centrifugar a 14.000 RPM por 10’ para formar pellet de células nucleadas;
4. Descartar o sobrenadante com pipeta sem tocar no pellet;
5. Adicione 300µL de REAGENTE 1 e 20µL de Proteinase K (10mg/mL);
6. Homogeneizar no vórtex e incubar a 55 °C por 30’;
7. Adicione 200µL de NaCl 6M saturado e homogeneizar bastante no vórtex;
8. Adicione 800µL de clorofórmio e homogeneizar bastante no vórtex;
9. Centrifugar a 14.000 RPM por 10’;
10. Transferir o sobrenadante – fase aquosa – para um novo microtubo identificado;
11. Adicione 1000µL de etanol absoluto gelado para precipitar o DNA;
12. Homogeneizar por inversão 10 vezes lentamente;
13. Centrifugar a 14.000 RPM por 5’;
14. Desprezar 1000µL do sobrenadante;
15. Adicione 1000µL de etanol 70% gelado;
16. Homogeneizar por inversão 1 vez lentamente;
17. Centrifugar a 14.000 RPM por 5’;
18. Desprezar todo o sobrenadante e repetir a centrifugação a 14.000 RPM por 5’;
19. Secar o tubo aberto em T.A ou a 40°C por 15’ na estufa;
20. Adicione 100µL de REAGENTE 2 1x para hidratar o DNA *overnight* ou 1h a 60 °C.

Soluções estoque:

1) Lise RBC: Solução de lise (1x)

1,5 M NH ₄ Cl	40,12 g NH ₄ Cl (Cloreto e Amônio)
20 mM Na ₂ EDTA	3,72 g Na ₂ EDTA
pH 6,5 com NaHCO ₃	aprox. 3,1 g NaHCO ₃ (Bicarbonato de Sódio)
Completar com dH ₂ O p/	500 ml

2) REAGENTE 1: Tampão de lise de células (10x)

100 mM Tris	1,21 g Tris base
200 mM Na ₂ EDTA	7,44 g Na ₂ EDTA
6 % SDS	6 g Dodecil Sulfato de Sódio (detergente)
pH 8,0 com 10 N NaOH (Hidróxido de Sódio)	
Completar com dH ₂ O p/	100 ml

3) REAGENTE 2 – Tampão TE (10x)

100 mM Tris	1,21 g Tris base
20 mM Na ₂ EDTA	0,744 g Na ₂ EDTA
pH 7,0 com 10 N NaOH (Hidróxido de Sódio)	
Completar com dH ₂ O p/	100 ml

4) Solução de Salina Saturada

NaCl 6M

174 g NaCl

Completar com dH₂O p/

500 ml

OBS: Todos os reagentes devem ser guardados em Temperatura Ambiente;
A Proteinase K, o etanol 100% e 70% devem ser guardados no freezer a -20 °C.