



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ADRIANA ÁVILA DE ALMEIDA

**EXPRESSÃO DOS GENES CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6 E CYP2E1
EM FUMANTES COM CÂNCER BUCAL**

2018

ADRIANA ÁVILA DE ALMEIDA

**EXPRESSÃO DOS GENES CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6 E CYP2E1 EM
FUMANTES COM CÂNCER BUCAL**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Adj. Janete Dias Almeida
Coorientador: Profa. Dra. Celina Faig Lima Carta

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Almeida, Adriana Ávila

Expressão dos genes CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6 e CYP2E1 em fumantes com câncer bucal / Adriana Ávila Almeida. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
71 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientadora: Janete Dias Almeida

Coorientadora: Celina Faig Lima Carta

1. Tabagismo. 2. Mucosa bucal. 3. Carcinoma de células escamosas. 4. Carcinogênese. 5. Citocromo P450. I. Almeida, Janete Dias, orient. II. Carta, Celina Faig Lima, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Janete Dias Almeida (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Emília Ângela Lo Schiavo Arisawa

Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)

Campus de São José dos Campos

Profa. Adj. Ana Lia Anbinder

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Alberto José de Araújo

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Campus do Rio de Janeiro

Prof. Adj. José Benedito Oliveira Amorim

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 05 de fevereiro de 2018.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Celso, colega, amigo, companheiro de jornada nesta e em tantas outras vidas, obrigada por estar mais uma vez ao meu lado

Ao meu filho Caio, muito esperado e amado, inteligente e doce, obrigada por suas demonstrações de carinho, mesmo que sempre em poucas palavras.

À minha filha Taís, meiga, perspicaz, sensível e carinhosa, como é bom ser sua mãe! Obrigada por todo seu carinho e abraços tão gostosos!

À minha Aparecida Ávila “Mestre em artes” e “Doutora da vida”, obrigada por ser minha mãe, te amo.

Ao meu pai Nelson, obrigada por seu carinho e palavras de apoio, sempre presente ao meu lado, te amo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara e do vice-diretora Prof. Rebeca Di Nicoló.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa dos coordenadores Profa. Adj Luciane Dias de Oliveira e Prof. Dr. Mauro Pedrine Santamaria.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À Profa. Tit. Janete Dias Almeida, que me recebeu com carinho e confiança, no desafio de mesclar conhecimentos em saúde a favor do próximo, pela amizade e pela motivação sempre presente em todas as nossas conversas.

À Profa. Dra. Celina Faig Lima Carta, que esteve presente em todas as etapas do meu projeto, sempre ajudando com competência e carinho, tornando nosso convívio sempre prazeroso e enriquecedor. Obrigada por sua amizade e dedicação.

À Profa. Dra. Emília Ângela Lo Schiavo Arisawa, por seus comentários e considerações.

Ao Prof. Dr. Alberto José de Araújo grande amigo, colega e mestre na ciência de estudar o tabagismo e ajudar as pessoas a parar de fumar. Obrigada por todo seu apoio sempre presente desde o início de minha jornada no meio acadêmico.

À Profa. Adj. Ana Lia Anbinder, que sempre me recebeu com um sorriso e palavras sinceras. Obrigada por suas orientações, ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Adj. José Benedito Oliveira Amorim, pelo carinho fraterno e apoio.

À Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho, por partilhar comigo seu enorme conhecimento. Muito obrigada por sua paciência nos momentos difíceis das análises de lâminas, preparação de artigos e discussão de casos.

A todos os Membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UNESP.

Aos colegas da pós-graduação pela amizade e pelo apoio em momentos de dúvidas e incertezas.

À Profa. Dra. Patrícia Pimentel obrigada por todo o seu apoio com a parte de Biologia Molecular.

Aos colegas da Turma 16 que nos mostraram que nunca é tarde para voltar aos bancos da escola.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), na pessoa do diretor Prof. Dr. Ricardo Galvão e a todos os colegas de trabalho que me apoiaram durante este período.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho em maio de 2017 (processo: 2016/08633-0).

À equipe da Biblioteca pela ajuda na elaboração deste trabalho.

A todos os funcionários do ICT/UNESP.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE QUADROS	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Seleção da amostra	19
3.1.1 Grupo 1 – CCE	19
3.1.2 Grupo 2 – Controle	20
3.2 Avaliação do grau de dependência de nicotina e perfil tabágico	20
3.3 Avaliação do consumo de álcool	21
3.4 Coleta das amostras.....	22
3.5 Extração e quantificação do rna	23
3.6 Escolha dos genes estudados	24
3.7 Análise da expressão gênica.....	20
3.8 Análise estatística	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Caracterização da amostra	28
4.2 Expressão gênica	31
4.2.1 CYP1A1.....	31
4.2.2 CYP1B1.....	33
4.2.3 CYP2A6.....	36
4.2.4 CYP2E1	38
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICES	63
ANEXOS.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de ação de enzimas de Fase I e de Fase II	17
Figura 2 – Esquema das atividades desenvolvidas no laboratório.....	23
Figura 3 – Fluxograma esquemático com os componentes da amostra	28
Figura 4 – Gráfico da expressão gênica do gene CYP1A1 nos Grupos controle fumante e CCE fumante	32
Figura 5 – Expressão gênica individual de CYP1A1 em relação à carga tabágica (maços/ano) em pacientes com CCE bucal	32
Figura 6 – Gráfico da expressão gênica do gene CYP1B1 nos quatro grupos avaliados.....	34
Figura 7 – Expressão gênica individual de CYP1B1 em relação à carga tabágica (maços/ano) na amostra de pacientes com CCE bucal	35
Figura 8 – Expressão gênica individual de CYP2A6 em relação à carga tabágica (maços/ano) nos pacientes com CCE bucal.....	37
Figura 9 – Gráfico da expressão gênica do gene CYP2E1 nos quatro grupos avaliados.....	38
Figura 10 – Expressão gênica individual de CYP2E1 em relação à carga tabágica (maços/ano) na amostra de pacientes com CCE bucal	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação do nível de risco do uso do álcool segundo o AUDIT..... 22

Quadro 2 – Sequência de *primers* escolhidos para o estudo..... 27

Quadro 3 – Descrição dos valores do teste AUDIT para todos os participantes..... 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição das variáveis e perfil tabágico dos casos de CCE e controles fumantes	29
Tabela 2 – Descrição das variáveis da amostra dos casos de CCE não fumantes e controles não fumantes	31
Tabela 3 – Valores de correlação linear de Pearson (R) e respectivo p valor entre expressão gênica de CYP1A1 e as variáveis em análise: idade, número de cigarros fumados/dia, idade de início do tabagismo, tempo de uso, carga tabágica, Teste de Fagerström, AUDIT e estágio da doença (CCE)	33
Tabela 4 – Valores de correlação linear de Pearson (R) e respectivo p valor entre expressão gênica de CYP1B1 e as variáveis em análise: idade, número de cigarros fumados/dia, idade de início do tabagismo, tempo de uso, carga tabágica, Teste de Fagerström, AUDIT e estágio da doença (CCE)	36
Tabela 5 – Valores de correlação linear de Pearson (R) e respectivo p valor entre expressão gênica de CYP2A6 e as variáveis em análise: idade, número de cigarros fumados/dia, idade de início do tabagismo, tempo de uso, carga tabágica, Teste de Fagerström, AUDIT e estágio da doença (CCE)	37
Tabela 6 – Valores de correlação linear de Pearson (R) e respectivo p valor entre expressão gênica de CYP2E1 e as variáveis em análise: idade, número de cigarros fumados/dia, idade de início do tabagismo, tempo de uso, carga tabágica, Teste de Fagerström, AUDIT e estágio da doença (CCE)	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	Beta actina
AUDIT	<i>Alcohol Disorder Identification Test</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CID10	Classificação Internacional de Doenças 10 ^a Revisão
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DN	DN
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
E	Eficiência de Amplificação
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENE	Extensão extra nodal
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FTCD	<i>The Fagerström Test for Cigarette Dependence</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSTs	<i>Glutathione-S-Transferases</i>
HAP	Hidrocarbonatos Aromáticos Policíclicos
ICT	Instituto de Ciência e Tecnologia
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INHANCE	<i>International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium</i>
NAT	<i>N-acetyl-transferase</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P450	Citocromo P450
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Primers	Iniciador molecular
PUC	Pontifícia Universidade Católica
qPCR	<i>Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Reaction</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
SCC	<i>Squamous Cell Carcinoma</i>

SNC	Sistema Nervoso Central
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFDC	Teste de Fagerström para Dependência a Cigarros
TNM	<i>Tumor Node Metastasis</i>
TUBA1C	<i>Tubulin Alpha 1c</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista
WHO	<i>World Health Organization</i>
Wild gene	Gene selvagem – gene em sua forma natural, sem presença de mutações e que codifica proteína com função normal

Almeida AÁ. Expressão dos genes CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6 e CYP2E1 em fumantes com câncer bucal [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

Os carcinógenos do tabaco estão relacionados a diversos tipos de câncer incluindo o carcinoma de células escamosas (CCE) bucal. Aliado ao álcool, o tabaco contribui para o desfecho desfavorável destes casos. A susceptibilidade individual ao câncer pode estar relacionada a expressão das enzimas que metabolizam tais carcinógenos. O objetivo deste trabalho é avaliar a expressão dos genes CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6 e CYP2E1 no CCE bucal por meio de qPCR. Foram coletadas amostras de 32 indivíduos com CCE e de 15 controles submetidos a cirurgias bucais por lesões benignas. Foram constituídos quatro grupos: Grupo CCE fumante (n=26), Grupo CCE não fumante (n=6), Grupo controle fumante (n=9) e Grupo controle não fumante (n=6). O Teste de Fagerström para Dependência a Cigarros (TFDC) foi usado para avaliar a DN (DN) e AUDIT para avaliação do consumo de etílicos. Houve diminuição da expressão do gene CYP1B1 nos casos de CCE comparados aos controles. Foram encontradas diferenças estaticamente significativas de expressão gênica de CYP1B1 entre os Grupos CCE fumante e controle fumante ($p=0,0018$), Grupo CCE não fumante e controle não fumante ($p=0,0079$) e CCE fumante com CCE não fumante ($p=0,0385$) e entre os quatro grupos ($p<0,0001$). Houve diminuição da expressão do CYP2A6 no Grupo CCE fumante em relação ao Grupo controle, mas apenas um paciente do Grupo controle expressou este gene. Houve aumento da expressão de CYP2E1 entre os Grupos CCE fumante e controle fumante ($p=0,0424$). Concluindo, foi encontrada grande variabilidade interindividual no estudo da expressão dos genes estudados. Houve maior expressão de CYP1A1 e CYP2E1 em amostras de indivíduos fumantes com CCE. Os genes CYP1B1 e CYP2A6 estavam menos expressos no Grupo CCE fumante em relação ao Grupo controle. Para os genes CYP1B1 e CYP2E1 foram encontrados valores significativos na correlação entre a expressão gênica e parâmetros demográficos e de perfil tabágico no Grupo controle fumante, e do AUDIT no Grupo CCE não fumante. O gene CYP2E1, além de estar relacionado ao metabolismo do álcool, também deve ser considerado importante marcador do metabolismo dos carcinógenos derivados do tabaco.

Palavras-chave: Tabagismo. Mucosa bucal. Carcinoma de células escamosas. Carcinogênese. Citocromo P450.

Almeida AA. *Expression of CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6 and CYP2E1 in smokers with oral cancer [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.*

ABSTRACT

Tobacco carcinogens are related to various types of cancer, including oral squamous cell carcinoma (OSCC). Allied to alcohol, tobacco contributes to the unfavorable outcome of the cases. Individual cancer susceptibility may be related to an expression of the enzymes that metabolize such carcinogens. The aim of this work is to evaluate the expression of the genes CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6 and CYP2E1 on OSCC by qPCR. Samples were collected from 32 individuals with OSCC and 15 controls submitted to oral surgeries due to benign lesions. There were four groups: Smoker SCC group (n = 26), nonsmoker SCC group (n = 6), Smoker control group (n = 9) and nonsmoker control group (n = 6). The Fagerström Test for Cigarette Dependence (TFCD) was used to evaluate nicotinic dependence (ND) and AUDIT for the evaluation of alcohol consumption. There was a decrease in CYP1B1 gene expression in cases of SCC compared to controls. ($P = 0.0018$); smoker CCE and non-smoker control ($p = 0.0079$); smoker SCC with nonsmoker SCC ($p = 0.0385$) and between the four groups ($p < 0.0001$). There was a decreased expression in CYP2A6 in the smoker SCC Group compared to the control group, but only one control group patient expressed this gene. There was an increased expression of CYP2E1 between the smoking and nonsmoking SCC groups ($p = 0.0424$). In conclusion, large interindividual variability was found in the study of the expression of the genes studied. There was greater expression of CYP1A1 and CYP2E1 in samples from smokers with SCC. The CYP1B1 and CYP2A6 genes were less expressed in the smoker SCC Group. Significant values were found for the CYP1B1 and CYP2E1 genes in the correlation between a gene expression and a parameter and a non-smoker control group, non-smoker control group and AUDIT. The CYP2E1 gene, besides being related to alcohol metabolism, should also be considered an important marker of the metabolism of the carcinogens derived from tobacco.

Keywords: Tobacco use disorder. Mouth mucosa. Squamous cell carcinoma. Carcinogenesis. Cytochrome P450.

1 INTRODUÇÃO

Em 2015, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que dentre as 56 milhões de mortes ocorridas em todo o mundo, 40 milhões (70%) foram em decorrência de doenças não comunicáveis, onde o câncer ocupa o segundo lugar com 8,8 milhões de mortes (22%) (World Health Organization, 2017a). O número de casos novos aumentará em 70% nos próximos 20 anos chegando a mais de 20 milhões de mortes. O tabagismo é o fator de risco mais importante sendo o responsável por 70% das mortes por câncer de pulmão e 20% dos demais tipos de câncer (World Health Organization, 2011, 2015). Em relatório publicado pela OMS em 2017 o tabagismo foi considerado importante fator de risco não somente para alguns tipos de câncer, como também para as doenças respiratórias, as quais ocupam a terceira posição entre as doenças crônicas não transmissíveis sendo responsável por cerca de 3,9 milhões de mortes registradas no ano de 2015 (World Health Organization, 2017b).

Em todo o mundo, as neoplasias malignas da região de boca, faringe e laringe estão entre as mais frequentes, sendo o carcinoma de células escamosas (CCE) o tipo histológico encontrado em mais de 90% dos casos (World Health Organization, 2017b).

No Brasil, a questão do câncer está associada ao aumento da expectativa de vida da população passando para o centro das atenções como parte das doenças crônicas não transmissíveis. Para 2015 foram estimados 600 mil novos casos, incluindo os casos de pele não melanoma (Instituto Nacional do Câncer, 2018). Ainda neste cenário, e não menos preocupante, o tabagismo é a principal causa de morte evitável em todo o mundo, com consequências devastadoras sobre a saúde, o meio ambiente e a economia mundial, além de ser responsável por um crescente número de mortes prematuras, incapacidade e perda de anos de vida tanto para fumantes ativos, quanto para ex-fumantes (World Health Organization, 2011, 2012; Pinto et al., 2017).

Em nosso país, dados demonstram que o uso do tabaco é responsável por 428 mortes por dia ou 156 mil por ano, representando 12,6% de todas as mortes no país. O custo com despesas médicas e perda de produtividade devido ao tabagismo

é de cerca de 57 bilhões de reais ao ano (Pinto et al., 2017).

O tabaco pode ser consumido em diversas formas, todavia, o cigarro industrializado é o mais consumido mundialmente. Entre as mais de cinco mil substâncias encontradas na fumaça do cigarro, a nicotina é a responsável pelo caráter aditivo atuando como substância psicoativa no Sistema Nervoso Central (Fiore, 2008; Benowitz, 2010).

O câncer é resultado de mutações que acontecem espontaneamente ou por ação de vários componentes mutagênicos, especialmente aqueles encontrados no tabaco e no álcool, sobre mecanismos de metabolização dos carcinógenos, reparo e lesão do ácido desoxirribonucleico (DNA) e controle do crescimento celular (Scully, 2011). Os carcinógenos do tabaco e do álcool, aos quais os seres humanos estão expostos, precisam ser ativados em uma fase oxidativa ou também chamada Fase I (Rendic, Guengerich, 2012).

A família de enzimas de Fase I pode participar da ativação ou detoxificação de diferentes substâncias em metabólitos intermediários ou carcinógenos (Figura 1). Estas enzimas são importantes na ativação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) e aminas aromáticas policíclicas, além da metabolização de produtos endógenos como colesterol e vitamina D (Kamataki et al., 2005).

Os principais grupos de carcinógenos derivados do tabaco são os HAP, as nitrosaminas e as aminas aromáticas. Todos estes componentes são metabolizados pelas enzimas da família do Citocromo P450 (P450) (Kamataki et al., 2005; Scully, 2011; Rendic, Guengerich, 2012). A família P450 é responsável por 66% do metabolismo e bioativação de carcinógenos, sendo que seis enzimas, CYP1A1 (20%), CYP1A2 (17%), CYP1B1 (11%), CYP2A6 (8%), CYP2E1 (11%) e CYP3A4 (10%) respondem por 77% de todo o metabolismo deste grupo, tornando-as alvo de interesse científico. Quando falamos sobre o processo de eliminação de substâncias tóxicas, estas enzimas são responsáveis por apenas 14% das detoxicações de carcinógenos, o que justifica a importância de seu estudo na ativação dos mesmos (Rendic, Guengerich, 2012).

O CYP1A1 e o CYP1B1 são enzimas responsáveis pela metabolização de HAP, das nitrosaminas, incluindo as específicas do tabaco, de estrógenos e de alguns quimioterápicos. Em pulmões de fumantes a expressão dos genes mencionados é aumentada pela fumaça do cigarro (Rendic, Guengerich, 2010).

O gene CYP2A6 codifica uma enzima responsável pelo metabolismo tanto das nitrosaminas do tabaco, quanto da quase totalidade da nicotina. Esta característica o torna um importante marcador para estudos de DN (Benowitz, 2010).

O etanol é metabolizado pelas enzimas codificadas pelo gene CYP2E1 (Di et al., 2009; Scully, 2011; Khlifi et al., 2013; Lin et al., 2013; Choudhury et al., 2015; Moorthy et al., 2015; Kaminagakura et al., 2016). O álcool facilita a penetração dos carcinógenos na mucosa bucal por comportar-se como um solvente e induz, por sua vez, a expressão da enzima CYP2E1 (Kaminagakura et al., 2016).

Os genes CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6 e CYP2E1 foram avaliados pela técnica de qPCR em inúmeros estudos de expressão gênica e câncer em diversos órgãos incluindo mama, esôfago, pulmão, nasofaringe, próstata, cérebro e câncer de colo retal, todavia, não foram encontrados, até o presente momento, estudos em câncer bucal com esta técnica (Rendic, Guengerich, 2010).

A intensidade e o tempo da exposição ao tabaco, aliado aos fatores genéticos individuais podem colaborar para o desenvolvimento, evolução ou influenciar o prognóstico de uma neoplasia maligna. A possibilidade de utilização de marcadores genéticos contribuiria para o diagnóstico precoce das neoplasias malignas principalmente em pacientes de risco (Li et al., 2011; Lin et al., 2013; Choudhury et al., 2015).

O estadiamento do câncer segue a classificação *Tumor Node Metastasis* (TNM). A oitava edição do estadiamento TNM para os tumores bucais foi modificada com a inclusão do parâmetro de profundidade da lesão à classificação do tamanho tumoral (T). Em relação a metástase regional (N) foi acrescentado o parâmetro de extensão extra nodal (ENE) para melhora do estadiamento da doença no pescoço (Huang, O'Sullivan, 2017; Lydiatt et al., 2017).

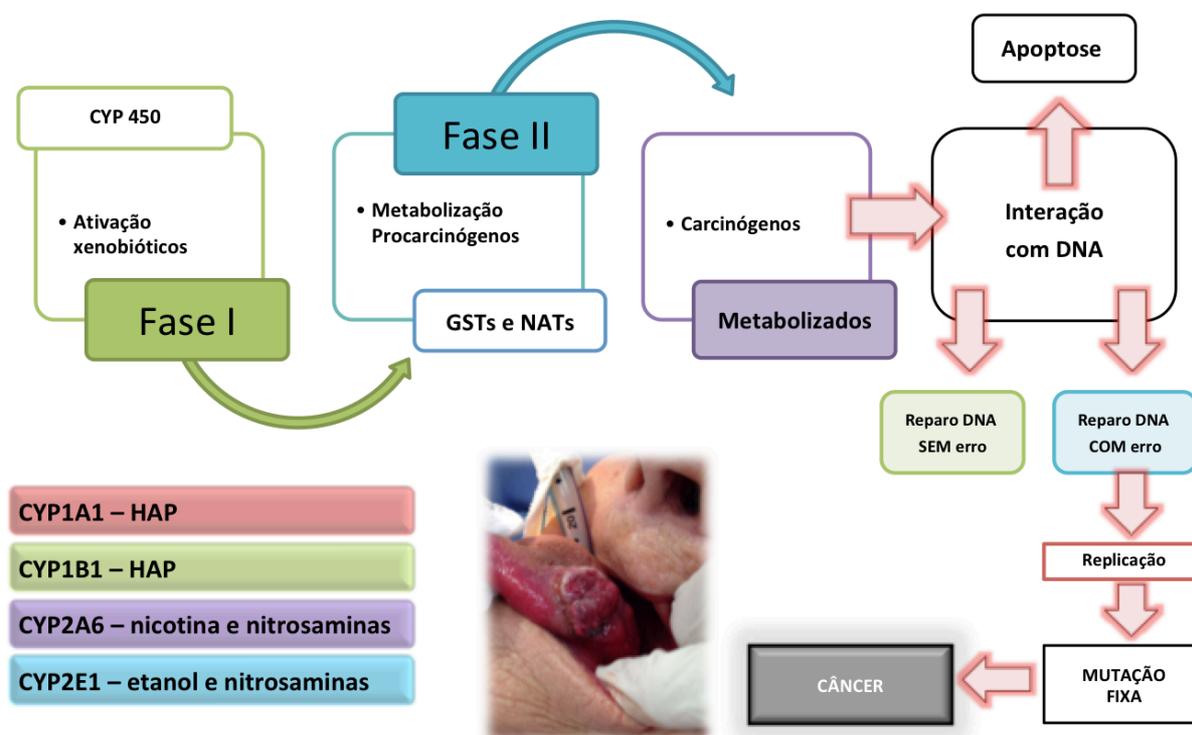
O Brasil tem se destacado no controle do tabagismo nas últimas décadas com significativa queda no número de fumantes (Brasil, 2017). Todavia, o tabagismo permanece como fator de risco de grande importância. O estudo da expressão dos genes metabolizadores dos carcinógenos do tabaco em amostras de carcinoma bucal pode confirmar a relação de causa-efeito entre tabaco e o câncer.

A ampla variabilidade de padrões genéticos de expressão dos genes metabolizadores de fase I pode trazer resultados surpreendentes, mesmo quando o fator de risco, quer seja tabaco e/ou álcool, e a consequência, câncer bucal seja

aparentemente óbvia.

Em virtude da escassa literatura em relação à expressão dos genes da família P450 nas neoplasias malignas bucais, o objetivo deste estudo é avaliar a expressão destes genes metabolizadores dos carcinógenos do álcool e do tabaco no CCE bucal. A hipótese deste estudo é a maior expressão dos referidos genes nas amostras de pacientes fumantes quando comparados a não fumantes com câncer bucal.

Figura 1 – Esquema de ação de enzimas de Fase I e de Fase II



Legenda: esquema das fases de metabolização de carcinógenos e xenobióticos por enzimas de Fase I, compostas pela Família Citocromo P450, e Fase II, compostas pelas *Glutathione-S-transferases* (GSTs) e *N-acetyl-transferases* (NATs) e os principais genes metabolizadores de carcinógenos do tabaco e álcool avaliados neste estudo.

Fonte: Adaptado do texto de Kamataki et al. (2005).

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho é avaliar a expressão gênica dos genes CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6 e CYP2E1 em amostras de carcinoma de células escamosas bucal de pacientes fumantes e não fumantes analisando a correlação clínica entre perfil tabágico, expressão gênica e o estadiamento da doença comparado à expressão em mucosa sem alteração.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos (CEPH) do Instituto de Ciências e Tecnologia (ICT-UNESP) (ANEXO A), sob CAAE de nº 42387315.0.0000.0077, como local proponente, tendo sido analisado em todos os centros participantes.

Este projeto recebeu auxílio pesquisa FAPESP: 2016/08633-0.

3.1 Seleção da amostra

Após serem esclarecidos sobre a proposição e condições deste trabalho, os pacientes que aceitaram participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico extra e intra-bucal e responderam a questionário sob forma de entrevista, com indagações sobre frequência e quantidade consumida de cigarros e bebidas alcoólicas. Nos casos de pacientes com CCE as informações sobre o estadiamento clínico (TNM) e tratamento oncológico foram coletados do prontuário médico. Os dados obtidos foram anotados em uma ficha de coleta (APÊNDICE B).

Foram considerados critérios de não inclusão: pacientes que já foram submetidos a qualquer tipo de tratamento oncológico, quer seja cirurgia, radio ou quimioterapia em qualquer órgão ou sistema, bem como casos de CCE de lábio.

3.1.1 Grupo 1 – CCE

Foi constituído por pacientes consecutivos que deram entrada para diagnóstico e tratamento no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Municipal José Carvalho de Florence na cidade de São José dos Campos/SP, do Hospital e Maternidade Celso Pierro da Pontifícia Universidade Católica de

Campinas/SP (PUC-Campinas) e do Hospital Municipal Mário Gatti de Campinas/SP, com diagnóstico de CCE bucal com idade acima de 18 anos.

Para as análises de perfil tabágico e expressão gênica os casos de CCE foram subdivididos quanto ao uso de cigarros em dois grupos: Grupo CCE fumante e Grupo CCE não fumante.

3.1.2 Grupo 2 – Controle

Foi constituído por pacientes consecutivos, pareados por semelhança de idade, sexo e exposição a tabaco e álcool aos pacientes com CCE, não tabagistas, tabagistas ou ex-tabagistas, que apresentaram algum tipo de lesão cirúrgica benigna bucal e que foram submetidas à biópsia, em atendimento no ambulatório da Disciplina de Propedêutica Estomatológica do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciências e Tecnologia (ICT-UNESP) ou Hospital Municipal José Carvalho de Florence, todos eles em São José dos Campos/SP, além do serviço de odontologia da Prefeitura Municipal de São Sebastião.

Para as análises de perfil tabágico e expressão gênica os controles foram subdivididos quanto ao uso de cigarros em dois grupos: Grupo controle fumante e Grupo controle não fumante.

3.2 Avaliação do grau de dependência de nicotina e perfil tabágico

A avaliação da DN foi realizada por meio do Teste de Fagerström para Dependência a Cigarros (TFDC), que é composto por seis questões que são pontuadas segundo as respostas. De acordo com a pontuação obtida, os pacientes foram alocados em cinco categorias em relação à DN: muito baixa (0 a 2 pontos), baixa (3 a 4 pontos), moderada (5 pontos), elevada (6 a 7 pontos) e muito elevada (8 a 10 pontos) (Heatherton et al., 1991; Fagerström, 2012) (APÊNDICE C).

Na análise do perfil tabágico foram incluídas perguntas referentes ao

consumo atual, idade de início, tipo de cigarro, quantidade e tempo de uso. A quantificação da carga tabágica foi feita com o cálculo de maços/ano (*Pack-years*) que é o número de cigarros fumados por dia, dividido por vinte e multiplicado pelo número de anos que o indivíduo fumou (Reichert et al., 2008).

Para o consumo de tabaco foram consideradas as seguintes definições de acordo com Reichert et al. (2008):

- Fumantes ou tabagistas ativos: os indivíduos que fumaram no mínimo 100 cigarros na vida e que, durante a entrevista, permaneciam fumando diariamente ou ocasionalmente;
- Não fumantes: os indivíduos que nunca fumaram ou fumaram menos que 100 cigarros na vida e que não estavam fumando no momento da entrevista;
- Ex-fumante, os indivíduo que fumaram no mínimo cem cigarros na vida e que não estavam fumando no momento da entrevista.

Para fins de análise dos níveis de expressão gênica e de exposição aos carcinógenos do tabaco durante a vida, os indivíduos ex-fumantes foram alocados no Grupo fumante. Esta ação se justifica pela definição de “leito cancerizável” que é aplicada a todos os indivíduos que mesmo após a cessação tabágica permanecem com risco do surgimento de um câncer em tecido previamente exposto a carcinógenos (Kelloff et al., 1993).

3.3 Avaliação do consumo de álcool

Foram feitas perguntas sobre uso regular de etílicos. Foi utilizado para avaliar o consumo de risco pelo uso do álcool o *Alcohol Use Disorder Identification Test* (AUDIT) (ANEXO B).

O AUDIT é composto por 10 questões pontuadas que identificam quatro padrões de consumo de álcool: uso de baixo risco (provável ausência de problemas

devido ao consumo), uso de risco (provável presença de problemas devido ao consumo), uso nocivo (provável existência de problemas devido ao consumo) e provável dependência (Quadro 1) (Moretti-Pires, Corradi-Webster, 2011).

Quadro 1 – Classificação do nível de risco do uso do álcool segundo o AUDIT

Pontuação do AUDIT	Nível de Risco
0 a 7	Consumo de Baixo Risco
8 a 15	Uso de Risco
16 a 19	Uso Nocivo
20 a 40	Provável Dependência

Fonte: Universidade Estadual Paulista, 2017.

3.4 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas de mucosa bucal da seguinte forma:

A. Lesão de CCE bucal:

I. Biópsia incisional diagnóstica:

- Retirado fragmento de 0,5 X 0,5 X 0,5 cm da lesão em transição da neoplasia com borda sadia após anestesia com lidocaína 2% com vasoconstritor do tipo loco regional.

II. Procedimento cirúrgico, sob anestesia geral:

- Após a retirada da peça cirúrgica foi coletada uma amostra da neoplasia em área central da lesão friável e sangrante, sem sinais macroscópicos de necrose, de aproximadamente 0,5 X 0,5 X 0,5 cm.

B. Para as amostras controle:

- Foi realizada durante procedimento cirúrgico de lesão benigna com anestesia com bloqueio loco regional em mucosa bucal com

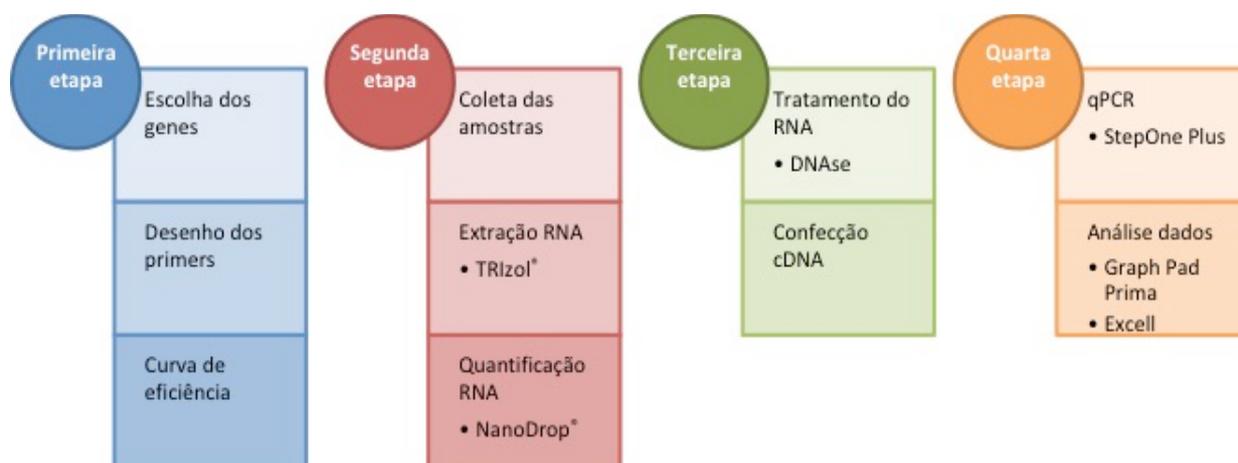
anestésico bupivacaína 0,5%.

- A seguir, realizado procedimento cirúrgico de lesão, sendo colhido material de igual dimensão em borda ao redor da lesão, considerado tecido sadio.

Todas as amostras foram lavadas em solução fisiológica 0,9% e armazenadas em frasco *Eppendorff* com 0,5 ml da solução *Allprotect tissue reagent* (Qiagen, CA. USA) *overnight* à temperatura de 4° C, e após este período, a -80° C no laboratório de Microbiologia do ICT-UNESP.

O esquema das atividades laboratoriais está representado na figura 2.

Figura 2 – Esquema das atividades desenvolvidas no laboratório



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5 Extração e quantificação do RNA

Foi realizada a extração de RNA de uma amostra de tecido (fígado) (técnica descrita no tópico 3.7) que usualmente expressa os genes alvos, para utilização na avaliação das curvas de eficiência dos *primers*. Todas as amostras foram avaliadas

quanto à pureza e qualidade do RNA por meio da adição de 1 microlitro (μL) de RNA para medir a absorvância a 260 (A260) e 280 (A280) nm no NanoDrop[®] 2000 *spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA). A proporção A260/A280 estava entre 1,8 e 2,0 e para A260/A230 apresentava valores próximos de 1,2.

3.6 Escolha dos genes estudados

As enzimas da família CYP P450 são altamente polimórficas, variando sua prevalência entre as diversas populações. Devido aos diversos cruzamentos entre os três principais grupos étnicos responsáveis pela colonização brasileira (europeus, índios e africanos) a prevalência destes polimorfismos é muito baixa em nosso país (Vasconcelos et al., 2005). Por este motivo optamos pela escolha de os quais se apresentam mais prevalentes (Vasconcelos et al., 2005; Rossini et al., 2006; Marques et al., 2006).

3.7 Análise da expressão gênica

Para avaliação da expressão gênica foi realizada extração de RNA total dos fragmentos teciduais coletados e que estavam conservados em freezer -80°C em solução conservante *Allprotect Tissue Reagent*. Após serem retiradas do freezer e lavadas com água DNA free water o material foi colocado em um cadinho de porcelana e adicionado nitrogênio líquido onde se processou a trituração da amostra de tecido com o auxílio de um pistilo.

A seguir, após a liofilização do tecido, as amostras foram então centrifugadas a 12.000 rpm, durante 15 min e a 4°C . Após a remoção do sobrenadante, o *pellet* celular foi processado, incubando-se por 10 min com 1 ml de TRIzol kit (Ambion, Inc., Carlsbad, CA, USA), posteriormente à homogeneização. Foi

adicionado 200 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), agitando-se vigorosamente com a mão por 15 s e incubando-se por 15 min. O conteúdo foi centrifugado a 12.000 rpm, por 15 min e a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, evitando tocar na interface. Foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico 100% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) agitando-se, gentilmente, por inversão, incubando-se por 10 min e centrifugando-se a 12.000 rpm, por 15 min e a 4°C. O sobrenadante foi desprezado. Foi adicionado 1 ml de álcool etílico 75% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), agitando-se no vórtex e centrifugando-se a 12.000 rpm, por 10 min e a 4°C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* secado a temperatura ambiente por 10 min. Após esse procedimento, foi adicionado 20 µL de RNA Storage buffer (Ambion Inc., Carlsbad, CA, USA) e incubado a 55°C por 10 min. Um microlitro de RNA foi usado para medir a absorbância a 260 (A260) e 280 (A280) nm no NanoDrop 2000 *spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA) para cada amostra.

O RNA total extraído foi tratado com DNase I (*Turbo DNase Treatment and Removal Reagents* - Ambion Inc., Carlsbad, CA, USA) utilizando 2 µg do RNA obtido pela extração. Depois foi adicionado 1 µL de *Reaction Buffer*, 2 µL de DNase I e água livre de nuclease até o volume de 10 µL; homogeneizado no vórtex e centrifugado brevemente. Foi incubado em termociclador a 25°C por 15 min. Em seguida, foi adicionado 1 µL de EDTA e homogeneizado com a pipeta. Finalmente, incubado a 65°C por 10 min.

Após o tratamento com DNase I, 1µg de RNA foi transcrito a cDNA utilizando-se o *Kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT* (Invitrogen, Carlsbad, USA). Foi adicionado Enzima mix (contendo *Rnase Out* e *Superscript III*), *Reaction mix* (2,5 µM), *random hexamers* (2,5 ng/µL), solução de RNA e água livre de nuclease para um volume final de 20 µL. O produto da reação foi incubado no termociclador a temperatura de 50°C por 5 min, 50°C por 50 min e 85°C por 5 min. O cDNA resultante foi armazenado a -20°C até sua utilização.

Inicialmente foram testados três genes de referência, ACTB (beta actina), GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), e TUBA1C (*tubulin, alpha 1c*), porém ao final foi selecionado o TUB1AC com maior compatibilidade pela amostra, pois a eficiência de amplificação (E) dos genes alvo e do de referência

escolhido deveriam ser aproximadamente iguais. A E pode variar idealmente entre 90% e 100% ($-3.6 > slope > -3.1$). Esta foi determinada por meio da equação:

$$E = (10 - 1/slope - 1) \times 100$$

Para cada iniciador foi realizada uma curva padrão absoluta com a finalidade de calcular o E. As médias dos valores de *Cycle Threshold* (Ct) foram utilizadas para calcular a expressão dos genes alvo com normalização dos genes de referência. O Ct é o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do gene alvo avaliado. Os resultados foram obtidos como valores relativos da expressão gênica, com base na fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001) em comparação ao gene de referência, previamente selecionado, e que resulta em valor 1.

As sequências dos iniciadores foram confirmadas no site do NCBI/*Gene Bank*, as quais foram específicas para a espécie *homo sapiens* e homologia. O método qPCR avaliou a quantidade do produto cDNA na fase exponencial da reação de amplificação. Para o sistema de detecção, foi utilizado o fluoróforo SYBR[®] Green (Kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG Invitrogen, Carlsbad, USA).

A qPCR foi realizada adicionando-se 10 μ L de *Kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG*, 1 μ L de ROX (corante de referência), 0,5 μ L de *primer forward*, 0,5 μ L de *primer reverse*, 4 μ L de cDNA diluído (1:5) e água DEPEC livre de *RNAase/DNAase* para atingir o volume final de 25 μ L; com posterior incubação no aparelho *StepOnePlus[™] System* (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). As condições de amplificação foram: 50°C por 2 min, seguido de 95°C por 2 min e mais 40 ciclos de 95°C por 15 s, seguidos por 30 s a 60°C.

A detecção da fluorescência no fim da etapa de cada ciclo da qPCR permitiu a monitoração da quantidade crescente de cDNA amplificado, sendo os dados obtidos analisados no *software* do equipamento de qPCR. A sequência dos *primers* dos genes avaliados, bem como dos genes de referência pode ser observada no quadro 2.

Foram realizados testes de eficiência dos *primers* (Bustin et al., 2009) e padronização da quantidade de cDNA, concentração e temperatura de anelamento dos *primers*. Todos os iniciadores designados para o experimento apresentaram

uma eficiência entre 95 e 154%. O padrão teórico de eficiência é de até 100% que indica que o material analisado duplicou a cada ciclo.

Quadro 2 – Sequência de *primers* escolhidos para o estudo

Genes	Nome do oligonucleotídeo	Sequência dos primers	
		<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
Genes estudados	CYP1A1	CTCCGACACTCTTCCTTCG	GGTTGATCTGCCACTGGTTT
	CYP1B1	CAGGCAGAATTGGATCAGGT	CATAAAGGAAGGCCAGGACA
	CYP2A6	GAGACGTGATCCCCATGAGT	GGTACACTTCGGTGCCCTTA
	CYP2E1	CGTGGAATGGAGAAGGAAA	TTGTGCTGGTGGTCTCTGTC
Genes de referência	ACTB	CCAACCGCGAGAAGATGAC	GCCGATCCACACGGAGTACT
	GAPDH	CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC	TTGACTCCGACCTTCACCTT
	TUBA1c	CCGGGCAGTGTTTGTAGACT	TTGCCTGTGATGAGTTGCTC

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.8 Análise estatística

Todos os resultados foram correlacionados com os dados clínicos e com os dados de consumo de tabaco.

Para a análise dos dados não paramétricos como a comparação da expressão gênica entre os grupos foram utilizados os testes de Mann-Whitney (dois grupos) e Kruskal-Wallis (3 ou mais grupos).

Para correlação da expressão gênica com dados gerais da amostra foi utilizada correlação de Pearson.

A comparação entre porcentagens e a associação entre álcool e tabaco foi feita por meio do teste Exato de Fisher.

Em todos os testes foi adotado nível de significância de 5%.

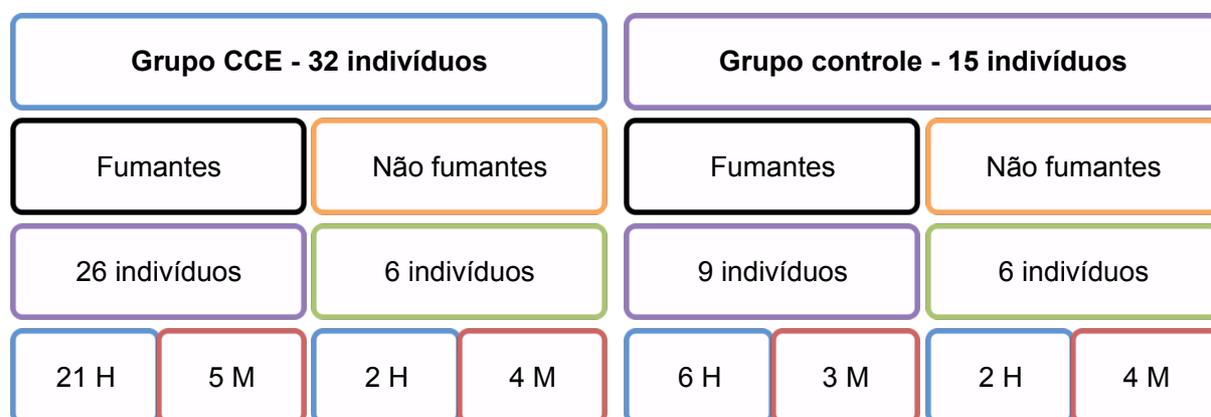
4 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados abaixo segundo os itens 4.1: Caracterização da amostra, 4.2: Expressão Gênica, 4.2.1: CYP1A1, 4.2.2: CYP1B1, 4.2.3: CYP2A6 e 4.2.4: CYP2E1.

4.1 Caracterização da Amostra

Ao todo foram coletadas 60 amostras (37 de CCE e 23 de controles). A amostra final foi composta por 47 indivíduos, sendo 31 homens e 16 mulheres, divididos em quatro grupos (Figura 2).

Figura 3 – Fluxograma esquemático com os componentes da amostra



Fonte: Elaborada pelo autor.

As variáveis demográficas e de perfil tabágico dos 35 indivíduos fumantes dos dois grupos avaliados encontra-se descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Descrição das variáveis e perfil tabágico dos casos de CCE e controles fumantes

Variáveis	Grupo CCE fumante	Grupo controle fumante
n	26	9
Sexo		
- Homens	21	6
- Mulheres	5	3
Idade, anos	58,6 ± 12,7	54,6 ± 11,2
- Homens	57,9 ± 10,0 (39 – 80)	55,8 ± 9,8 (37 – 65)
- Mulheres	61,4 ± 22,1 (28 – 88)	52,0 ± 15,7 (34 – 63)
Início uso do tabaco, anos	17,5 ± 7,0	15,9 ± 5,4
- Homens	16,9 ± 6,6 (5 – 31)	14,5 ± 2,8 (9 – 6)
- Mulheres	20 ± 8,8 (9 – 30)	18,7 ± 9,0 (13 – 29)
Tempo de uso, anos	37,2 ± 15,7	34,2 ± 9,7
- Homens	39,2 ± 14,4 (16 – 63)	37,5 ± 9,7 (21 – 48)
- Mulheres	28,8 ± 19,6 (7 – 57)	27,7 ± 6,8 (20 – 33)
Quantidade de cigarros fumados/dia	23,9 ± 9,5	31,1 ± 20,1
- Homens	26,1 ± 8,6 (10 – 40)	38,3 ± 17,2 (20 – 60)
- Mulheres	14,6 ± 7,8 (3 – 20)	16,7 ± 20,2 (4 – 40)
Carga tabágica, maços/ano	44,5 ± 27,6	57,7 ± 41,9
- Homens	50,7 ± 26,5 (10,5 – 126)	73,5 ± 37,8 (21 – 110)
- Mulheres	18,4 ± 13,9 (3,5 – 39)	26,2 ± 34,5 (7,5 – 66)
Fumantes ativos	18 indivíduos	7 indivíduos
- Homens	16	5
- Mulheres	2	2
Teste de Fagerström, pontos	5,3 ± 2,2	5,5 ± 2,3
- Homens	5,7 ± 1,8	5,5 ± 2,4
Baixa a moderada (0 – 5)	9	3
Elevada a muito elevada (6 – 10)	12	3
- Mulheres	3,6 ± 3,0	3,0 ± 2,0
Baixa a moderada (0 – 5)	3	3
Elevada a muito elevada (6 – 10)	2	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Entre os 8 participantes que cessaram o uso do tabaco no Grupo CCE fumante 3 eram mulheres e 5 (62,5%) encontravam-se em estágios avançados da

doença. A média do score de DN foi menor entre aqueles que cessaram o uso do tabaco em relação aos que continuavam fumando ($4,6 \pm 2,8$ e $5,6 \pm 1,9$ respectivamente).

Houve uma significativa porcentagem de homens em estágios avançados da doença quando comparado às mulheres e esta comparação se mostrou estatisticamente significativa por meio do teste Exato de Fisher ($p < 0,05$). No Grupo CCE fumante, 19 indivíduos (73%) encontravam-se em estágios avançados da doença (III e IV), enquanto no Grupo CCE não fumante 5 indivíduos (83,3%) encontravam-se em estágios iniciais (I e II).

A classificação de uso do álcool segundo o AUDIT pode ser observada no quadro 3. A análise do consumo de risco de álcool no Grupo CCE fumante se mostrou maior entre os homens em relação às mulheres e esta associação se mostrou significativa ($p = 0,0335$) por meio do teste Exato de Fisher.

Quadro 3 – Descrição dos valores do teste AUDIT para todos os participantes

AUDIT	Grupos			
	CCE fumante	Controle fumante	CCE não fumante	Controle não fumante
Classificação do nível de risco				
n	26	9	6	6
Homens	21	6	2	2
Não faz uso	-	3	-	1
Baixo risco	2	1	2	1
Consumo de risco	13	1	-	-
Alto risco	4	1	-	-
Provável dependência	2	-	-	-
Mulheres	5	3	4	4
Não faz uso	-	1	2	3
Baixo risco	3	1	2	1
Consumo de risco	1	1	-	-
Alto risco	1	-	-	-
Provável dependência	-	-	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados gerais dos participantes não fumantes estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Descrição das variáveis da amostra dos casos de CCE não fumantes e controles não fumantes

Variáveis	Grupo CCE não fumante	Grupo controle não fumante
n	6	6
Sexo		
Homens	2	2
Mulheres	4	4
Idade, anos	52,5 ± 17,2 (35 – 81)	46 ± 9,8 (32 – 57)
Homens	72 ± 12,7	55,5 ± 2,1
Mulheres	42,8 ± 7,8	41,3 ± 8,3

Fonte: Elaborada pelo autor.

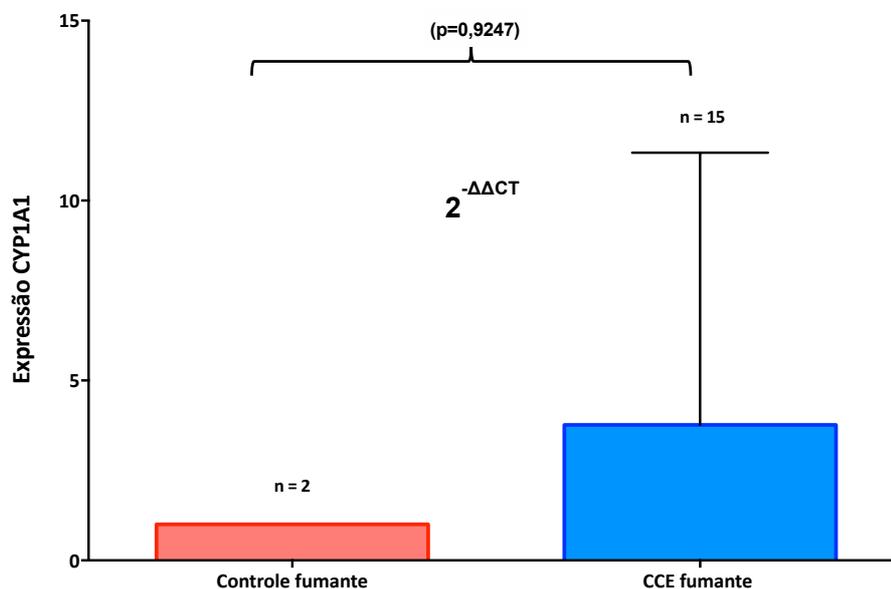
4.2 Expressão gênica

A avaliação da expressão gênica foi realizada para os genes: CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6 e CYP2E1.

4.2.1 CYP1A1

Embora tenha sido observado aumento da expressão do gene CYP1A1 do Grupo CCE fumante em relação ao Grupo controle fumante, esta diferença não foi estatisticamente significativa de acordo com teste de Mann-Whitney ($p=0,9247$) (Figura 4). Não houve expressão nos grupos não fumantes.

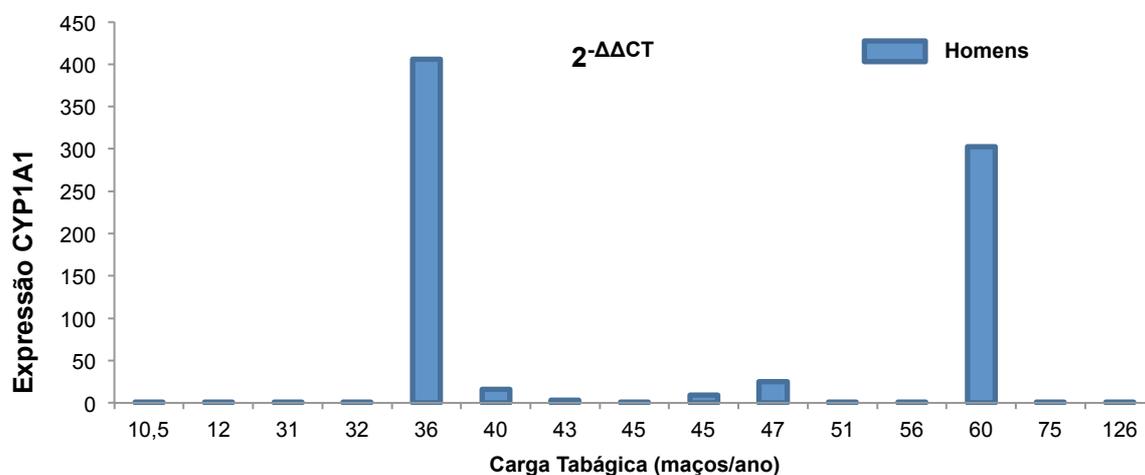
Figura 4 – Gráfico da expressão gênica do gene CYP1A1 nos Grupos controle fumante e CCE fumante



Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi realizada avaliação da expressão gênica individual de CYP1A1 em relação à carga tabágica para os grupos CCE, que está ilustrada na figura 5.

Figura 5 – Expressão gênica individual de CYP1A1 em relação à carga tabágica (maços/ano) em pacientes com CCE bucal



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na avaliação individual da expressão deste gene observamos uma expressão presente somente no sexo masculino, sem qualquer relação com carga tabágica, como os parâmetros avaliados de consumo de carcinógeno (tempo e quantidade) e TNM. Indivíduos com carga tabágica 36 e 60 apresentaram maior expressão do CYP1A1.

A correlação de Pearson foi realizada entre a expressão gênica de CYP1A1 nos grupos avaliados quando comparada com idade, número de cigarros fumados/dia, tempo de uso de cigarros, DN pelo Teste de Fagerström, estágio da doença e AUDIT, sem resultados significantes entre as variáveis avaliadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores de correlação linear de Pearson (R) e respectivo p valor entre expressão gênica de CYP1A1 e as variáveis em análise: idade, número de cigarros fumados/dia, idade de início do tabagismo, tempo de uso, carga tabágica, Teste de Fagerström, AUDIT e estágio da doença (CCE)

CYP1A1 Nível de Expressão	Idade	Número de cigarros/ dia	Início tabagismo	Tempo de uso	Carga tabágica	Fagerström	AUDIT	Estágio
CCE Fumante n= 15	0,0711 (0,8013)	-0,3964 (0,1435)	0,1773 (0,5273)	-0,0931 (0,7415)	-0,4326 (0,1072)	-0,5687 (0,0269)	0,0659 (0,8155)	-0,2396 (0,3897)

Nota: ausência de grupos justificadas pela não expressão ou impossibilidade de análise por número reduzido de amostra.

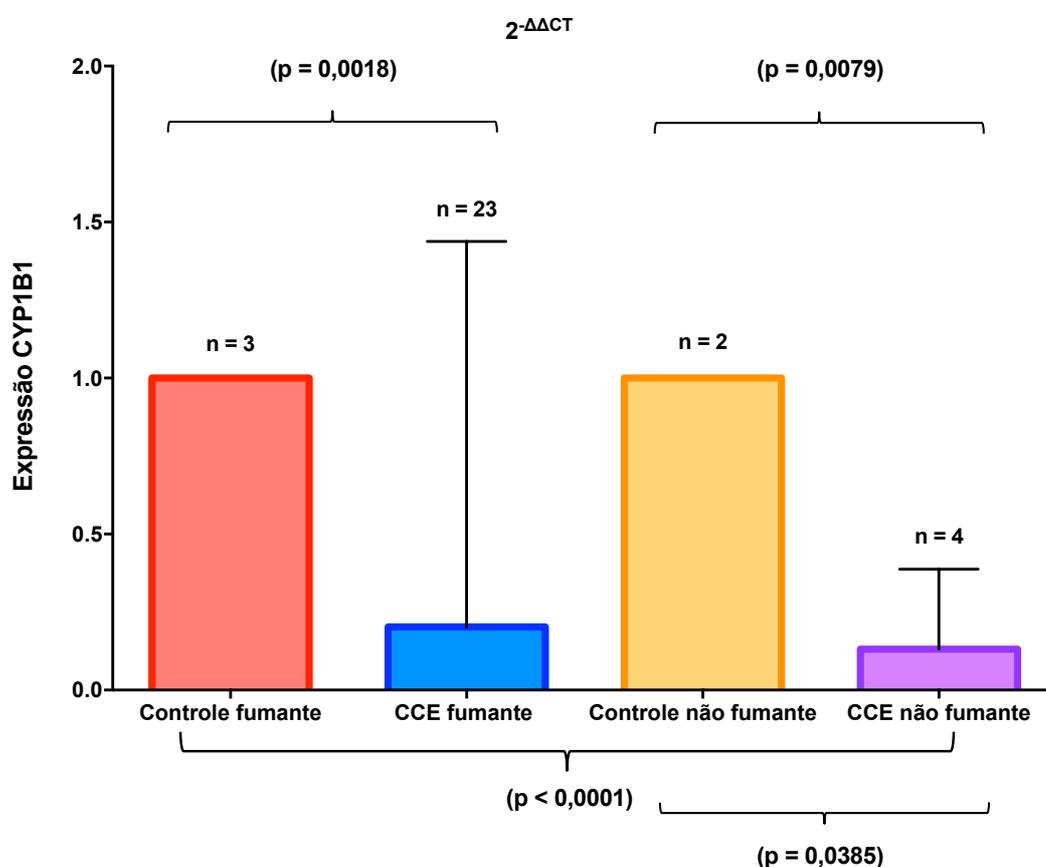
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2 CYP1B1

Houve diminuição da expressão do gene CYP1B1 nos casos de CCE comparados aos controles, como pode ser observado na figura 6. A comparação entre os quatro grupos, por meio do Teste de Kruskal-Wallis, foi estaticamente significativa ($p < 0,0001$).

A diferença de expressão gênica de CYP1B1 entre os Grupos CCE fumante e controle fumante mostrou-se estatisticamente significativa pelo Teste de Mann-Whitney ($p=0,0018$). Da mesma forma, encontramos resultados significativos quando comparamos a expressão dos Grupos CCE não fumante com controle não fumante ($p=0,0079$) e CCE fumante com CCE não fumante ($p=0,0385$).

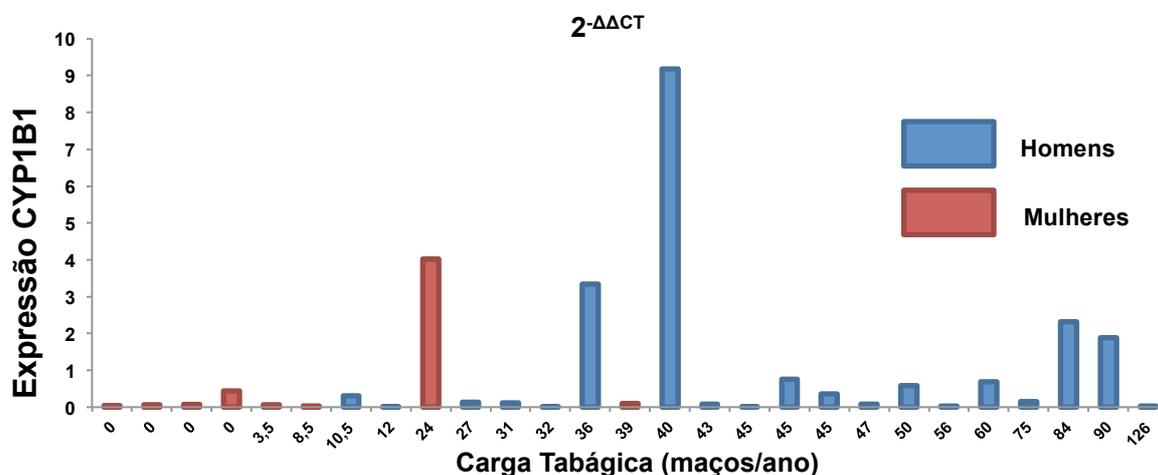
Figura 6 – Gráfico da expressão gênica do gene CYP1B1 nos quatro grupos avaliados



Fonte: Elaborada pelo autor.

A expressão gênica individual de CYP1B1 em relação à carga tabágica está ilustrada na figura 7.

Figura 7 – Expressão gênica individual de CYP1B1 em relação à carga tabágica (maços/ano) na amostra de pacientes com CCE bucal



Fonte: Elaborada pelo autor.

Alguns indivíduos apresentaram elevada expressão deste gene principalmente entre os homens. Apenas uma mulher apresentou expressão elevada, com algumas peculiaridades em relação ao seu perfil tabágico e oncológico. Esta mulher relatou ter começado a fumar aos 28 anos e apresentou carga tabágica de 24 maços/anos. A paciente foi diagnosticada com CCE em região retromolar bastante agressivo, com evolução rápida e insatisfatória, e sobrevida de apenas nove meses, mesmo com tratamento oncológico invasivo (cirurgia, radioterapia e quimioterapia).

No Grupo CCE fumante a correlação entre expressão gênica não foi significativa quando comparada com idade, número de cigarros fumados ao dia, tempo de uso de cigarros, DN pelo Teste de Fagerström, AUDIT e estágio da doença, segundo a correlação de Pearson (Tabela 4).

No Grupo CCE não fumante foi observada correlação significativa entre expressão de CYP1B1 e o potencial comportamento de risco do consumo de álcool avaliado pelo teste AUDIT ($p=0,0067$), no entanto o mesmo não foi observado em relação à idade e estágio da doença (Tabela 4).

A tabela 4 exhibe os resultados de correlação do nível de expressão de CYP1B1 no Grupo controle fumante, com diferença significativa para idade, número

de cigarros fumados ao dia e carga tabágica. No entanto, a diferença não ocorreu para expressão de CYP1B1 e início do tabagismo, tempo de uso de cigarros e carga tabágica, segundo a correlação de Pearson.

Tabela 4 – Valores de correlação linear de Pearson (R) e respectivo p valor entre expressão gênica de CYP1B1 e as variáveis em análise: idade, número de cigarros fumados/dia, idade de início do tabagismo, tempo de uso, carga tabágica, Teste de Fagerström, AUDIT e estágio da doença (CCE)

CYP1B1 Nível de Expressão	Idade	Número de cigarros/ dia	Início tabagismo	Tempo de uso	Carga tabágica	Fagerström	AUDIT	Estágio
CCE fumante n= 23	0,1489 (0,4978)	-0,1977 (0,3659)	-0,0028 (0,9898)	-0,1386 (0,5281)	-0,2215 (0,3098)	0,1265 (0,5651)	-0,3992 (0,0592)	-0,2773 (0,2001)
CCE não fumante n= 5	-0,6639 (0,2217)	-	-	-	-	-	-0,9684 (0,0067)*	-0,1003 (0,8725)
Controle fumante n= 3	0,4801 (0,0204)*	0,5629 (0,0052)*	-0,4062 (0,0545)	-0,2380 (0,2741)	0,787 (0,0001)*	-	-	-
Controle não fumante n= 2	1,0000 (0,0000)	-	-	-	-	-	-	-

*p < 0,05

Nota: ausência de grupos justificadas pela não expressão ou impossibilidade de análise por numero reduzido de amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.3 CYP2A6

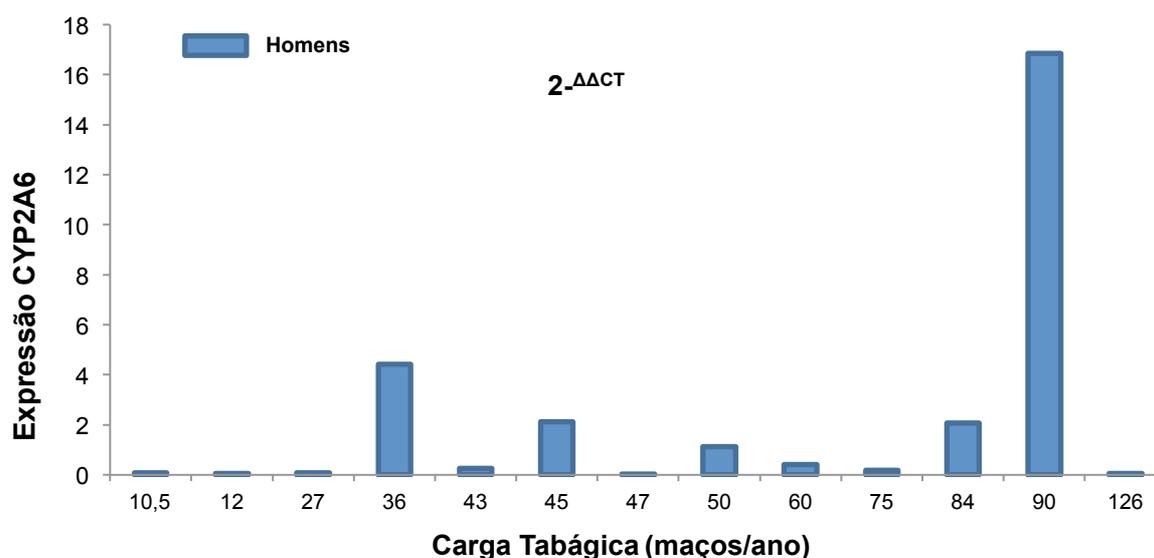
Foi observada diminuição da expressão do CYP2A6 no Grupo CCE fumante em relação ao Grupo controle fumante. No entanto a avaliação estatística não pôde ser realizada devido ao fato de apenas um paciente do Grupo controle ter expressado este gene. O mesmo aconteceu para os grupos CCE não fumante e

Controle não fumantes, que não apresentaram expressão deste gene.

O único participante que expressou este gene no Grupo controle fumante era o mais velho entre os homens, apresentava a maior carga tabágica e uma baixa DN pelo TFDC, embora fosse considerado como consumidor de risco pelo AUDIT.

A expressão individual de CYP2A6 no Grupo CCE fumante está descrita na figura 8. Não foi observada correlação significativa da expressão do CYP2A6 no Grupo CCE fumante com idade, número de cigarros fumado ao dia, tempo de uso de cigarros, DN pelo Teste de Fagerström, AUDIT e estágio da doença, segundo a correlação de Pearson (Tabela 5).

Figura 8 – Expressão gênica individual de CYP2A6 em relação à carga tabágica (maços/ano) nos pacientes com CCE bucal



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na avaliação individual da expressão de CYP2A6 nos pacientes com CCE bucal encontramos um indivíduo com carga tabágica extremamente elevada (126), mas que apresentou expressão bem menor em relação ao indivíduo que mais expressou este gene e que possuía carga tabágica de 90.

Tabela 5 – Valores de correlação linear de Pearson (R) e respectivo p valor entre expressão gênica de CYP2A6 e as variáveis em análise: idade, número de cigarros fumados/dia, idade de início do tabagismo, tempo de uso, carga tabágica, Teste de Fagerström, AUDIT e estágio da doença (CCE)

CYP2A6 Nível de Expressão	Idade	Número de cigarros/ dia	Início tabagismo	Tempo de uso	Carga tabágica	Fagerström	AUDIT	Estágio
CCE Fumante n= 13	-0,2271 (0,4557)	-0,2435 (0,4228)	0,2806 (0,3530)	-0,2768 (0,3599)	-0,2250 (0,4599)	-0,4705 (0,1047)	-0,2469 (0,4160)	-0,3475 (0,2447)

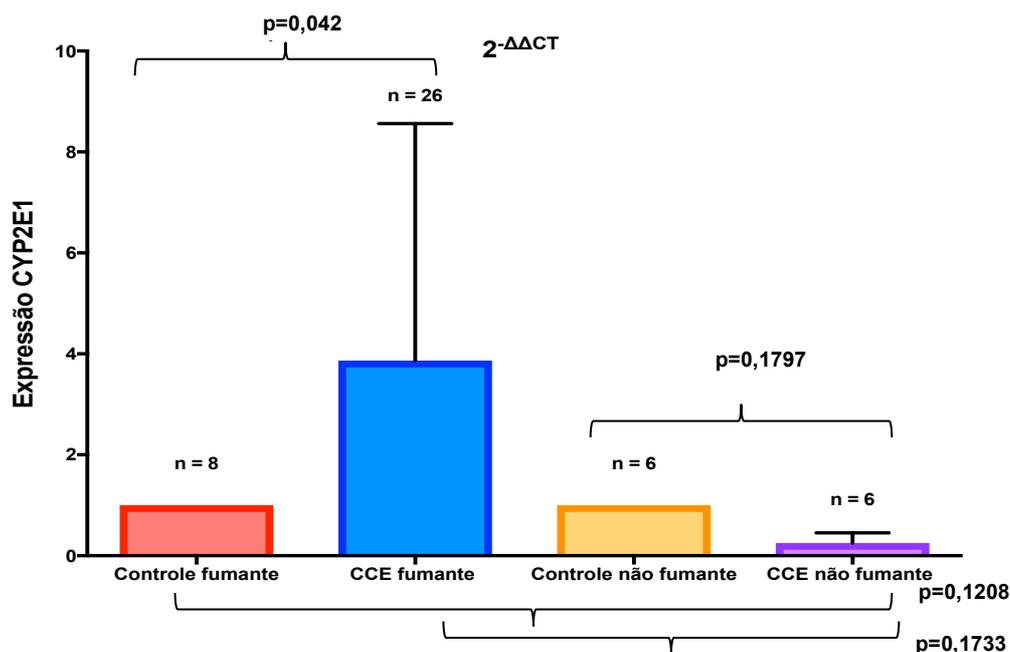
Nota: ausência de grupos justificadas pela não expressão ou impossibilidade de análise por numero reduzido de amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.4 CYP2E1

Foi observado aumento da expressão do gene CYP2E1 nos casos de CCE comparados aos controles, como pode ser observado na figura 9.

Figura 9 – Gráfico da expressão gênica do gene CYP2E1 nos quatro grupos avaliados

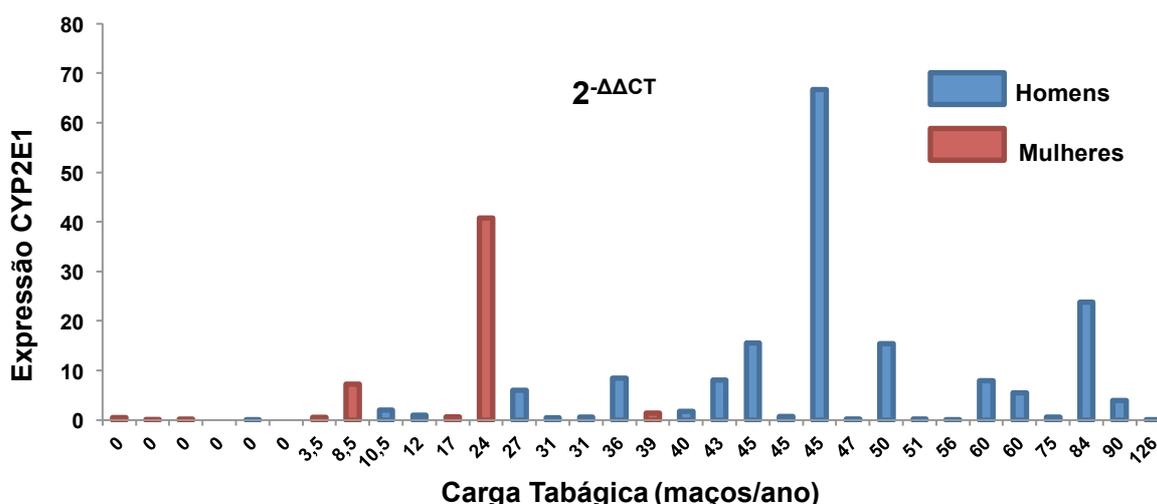


Fonte: Elaborada pelo autor.

A diferença de expressão gênica de CYP2E1 entre os Grupos CCE fumante e controle fumante, por meio do Teste de Mann-Whitney, mostrou-se estaticamente significativa ($p=0,0424$). Não foram encontrados resultados significativos quando comparamos a expressão os Grupos CCE não fumante com controle não fumante ($p=0,1797$) e CCE fumante com CCE não fumante ($p=0,1733$). A comparação entre os quatro grupos, por meio do Teste de Kruskal-Wallis, não foi estaticamente significativa ($p=0,1208$).

A expressão individual de CYP2E1 em relação à carga tabágica está descrita na figura 10.

Figura 10 – Expressão gênica individual de CYP2E1 em relação à carga tabágica (maços/ano) na amostra de pacientes com CCE bucal



Fonte: Elaborada pelo autor.

A correlação de Pearson foi realizada entre a expressão gênica do CYP2E1 no Grupo CCE fumante e não mostrou resultados significativos quando comparada com idade, número de cigarros fumado ao dia, tempo de uso de cigarros, DN pelo Teste de Fagerström, AUDIT e estágio da doença (Tabela 6).

A avaliação por meio do teste AUDIT evidenciou, no Grupo CCE não fumante, correlação negativa entre o nível de expressão e o potencial comportamento de risco do consumo de álcool ($p=0,0177$), no entanto o mesmo não

ocorreu em relação à idade e estágio da doença (Tabela 6). A correlação entre expressão do CYP2E1, no Grupo controle fumante, se mostrou significativa com a idade e tempo de uso do cigarro. Nas comparações com o número de cigarros fumados ao dia e o Teste de Fagerström esta correlação foi negativa. Houve correlação entre o início do tabagismo, carga tabágica e AUDIT, mas sem significância estatística (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores de correlação linear de Pearson (R) e respectivo p valor entre expressão gênica de CYP2E1 e as variáveis em análise: idade, número de cigarros fumados/dia, idade de início do tabagismo, tempo de uso, carga tabágica, Teste de Fagerström, AUDIT e estágio da doença (CCE)

CYP2E1 Nível de Expressão	Idade	Número de cigarros/ dia	Início tabagismo	Tempo de uso	Carga tabágica	Fagerström	AUDIT	Estágio
CCE fumante n= 26	-0,2957 (0,1425)	0,0236 (0,9089)	0,0256 (0,9011)	-0,1700 (0,4064)	-	0,1018 (0,6209)	-0,1702 (0,4058)	-0,0660 (0,7488)
CCE não fumante n= 6	-0,2219 (0,6725)	-	-	-	-	-	-0,8893 (0,0177)*	0,2057 (0,6959)
Controle Fumante n= 8	0,4327 (0,0272)*	-0,4793 (0,0132)*	0,1668 (0,4155)	0,4865 (0,0117)*	-0,3166 (0,1151)	-0,6940 (0,0001)	-0,0209 (0,9345)	-
Controle não fumante n= 6	-0,1226 (0,8171)	-	-	-	-	-	-	-

*p < 0,05

Nota: ausência de grupos justificadas pela não expressão ou impossibilidade de análise por numero reduzido de amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

As neoplasias malignas bucais estão entre as cinco mais incidentes em todo o mundo com grandes variações regionais (World Health Organization, 2015). No Brasil, as neoplasias malignas de cabeça e pescoço relacionam-se com fatores bem documentados como uso do tabaco e álcool, sendo mais prevalentes entre homens acima de 40 anos, 11,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres (World Health Organization, 2014; Instituto Nacional do câncer, 2018). O diagnóstico precoce permite abordagem terapêutica menos agressiva, procedimentos cirúrgicos menos invasivos e maiores probabilidades de cura (Malik et al., 2015; Bandeira et al., 2017).

As substâncias potencialmente carcinógenas provenientes do tabaco e álcool são metabolizados por enzimas de Fase I em componentes intermediários mais reativos e solúveis, detoxificadas e eliminadas por meio das enzimas de Fase II. A variabilidade interindividual no metabolismo destes carcinógenos, relacionada às formas polimórficas destes genes, define o maior ou menor risco de desenvolvimento do câncer e relaciona-se a maior ou menor expressão dos genes que metabolizam estes produtos.

Os potenciais efeitos carcinogênicos dos derivados do tabaco também ocorrem com o uso de apresentações sem fumaça, como fumo mascado ou inalado. Mallery et al. (2014) demonstrou que as enzimas de Fase I e II estão presentes na mucosa bucal sadia podendo induzir o surgimento do CCE bucal por meio da ativação dos componentes potencialmente carcinogênicos encontrados no tabaco não fumado. Alguns genes como CYP1A1 e CYP1B1 são possíveis marcadores de neoplasias malignas relacionadas ao tabaco por sua presença em várias redes de transformação e bioativação de carcinógenos (Cao et al., 2015).

O mais importante é a demonstração clara que não fumar reduz o risco de câncer e que mesmo após o diagnóstico, a cessação do tabagismo tem reflexo direto na prevenção de recidiva, surgimento de segundo tumor primário, melhor desfecho terapêutico e da qualidade de vida (Sham et al., 2003; Warnakulasuriya et al., 2010; Balogh et al., 2014; Karam-Hage et al., 2014). Todos os participantes fumantes foram orientados sobre os riscos do uso do tabaco para a saúde bucal e

encaminhados para centros de referência públicos de tratamento do tabagismo.

O tratamento do tabagismo é eficaz e pode diminuir o risco de desenvolvimento do câncer ou impactar de forma positiva o desfecho do tratamento oncológico. Com o intuito de promover ações preventivas em saúde bucal há 4 anos o ICT/UNESP de São José dos Campos oferece o tratamento do tabagismo aos pacientes fumantes atendidos na instituição que incluem também pacientes oncológicos.

Os indivíduos do Grupo controle fumante consumiam grande quantidade de tabaco, quando comparados ao Grupo CCE fumante, apresentando, portanto, alto risco para o desenvolvimento de neoplasias malignas relacionadas ao uso do tabaco.

O grupo CCE fumante apresentou aumento da expressão dos genes CYP1A1 e CYP2E1. Todavia houve diminuição da expressão de CYP1B1 e CYP2A6. Os resultados foram significantes para os genes CYP1B1 e CYP2E1.

Nos dois grupos de fumantes estudados, houve prevalência de homens. No Grupo CCE, tal relação foi mais que o triplo concordante com dados epidemiológicos mundiais (Gupta et al., 2016; Zhang et al., 2016). Em ambos os grupos fumantes observam-se que os homens iniciaram o uso do tabaco antes dos 18 anos de idade, enquanto as mulheres começaram mais tardiamente. Em nossa casuística encontramos uma proporção maior de homens fumantes em relação às mulheres. Estes achados estão em concordância com uma pesquisa brasileira de 2016 que avaliou o percentual de fumantes acima de 18 anos por meio de inquérito telefônico nas capitais brasileiras e no Distrito Federal e que encontrou maior prevalência de homens fumantes (12,7%) em relação às mulheres (8%) (Brasil, 2017).

Observou-se semelhanças entre os grupos quanto às médias gerais de idade, início do uso e tempo de uso do tabaco. Contudo, o padrão de consumo de tabaco era mais intenso no Grupo controle tanto para homens quanto para mulheres com maior consumo de cigarros/dia e conseqüentemente, carga tabágica superior aos pacientes com câncer. Estes indivíduos portanto, apresentam alto risco para o desenvolvimento de neoplasias malignas relacionadas ao uso do tabaco. Em relação ao consumo do álcool observamos os maiores padrões de consumo de risco no Grupo CCE fumante. (Hashibe et al., 2009; Warnakulasuriya et al., 2010; Winn et al., 2015).

Evidenciando o fato de que não existe nível seguro de exposição ao tabaco e ao álcool, na amostra de pacientes com CCE, duas mulheres e um homem fumavam 10 ou menos cigarros/dia e apresentavam baixo risco de consumo de etílicos pelo AUDIT. Revisão sistemática publicada pelo *International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium* (INHANCE) em 2016 demonstrou que indivíduos que fumam até 10 cigarros/dia, mesmo que não façam uso de álcool, tiveram um maior risco de desenvolvimento de câncer bucal quando comparados a pessoas que nunca fumaram (Berthiller et al., 2016).

O diagnóstico precoce dos tumores de região de cabeça e pescoço permanece um desafio em todo o mundo. Embora haja um consenso a este respeito a realidade ainda é a de diagnósticos em fases avançadas que respondem pouco ao tratamento curativo e que afetam de maneira importante a qualidade de vida dos pacientes. Quando a doença é diagnosticada em seus estágios iniciais a abordagem cirúrgica é menos invasiva e, conseqüentemente, menos mutilante, permitindo uma readaptação de fala, deglutição mais rápida, sem sequelas estéticas significativas. Neste contexto as campanhas educativas poderiam desempenhar um papel relevante alertando a população sobre o reconhecimento e necessidade de avaliação, por parte de um especialista, das lesões bucais crônicas que não desaparecem com tratamentos habituais, principalmente se ocorrerem entre indivíduos que fazem uso regular de tabaco e álcool.

A incidência de câncer de cabeça e pescoço em adultos jovens abaixo de 45 anos tem aumentado nos últimos anos sendo mais frequente em mulheres com câncer de língua que nunca fumaram ou beberam. Neste cenário, a etiologia ainda permanece obscura uma vez que a baixa associação ao uso do tabagismo e do álcool se justifica devido ao menor tempo de exposição, estando os fatores de herança familiar, com histórico de qualquer outro tipo de neoplasias malignas, entre as hipóteses mais prováveis (Toporcov et al., 2015). Na casuística do presente estudo, 6 indivíduos apresentaram CCE bucal, sem histórico de consumo de tabaco, sendo 4 mulheres com câncer de língua e abaixo de 50 anos.

O TFDC é o instrumento mais usado em todo o mundo para avaliar o grau de DN presente nos cigarros, sendo mais adequado para avaliar níveis que variem de baixa até alta dependência (Svicher et al., 2018). Quando avaliamos o grau de DN observa-se que no grupo de homens fumantes com CCE, 12 (46,2%)

apresentaram DN elevada ou muito elevada, enquanto a maioria das mulheres apresentou pontuação até cinco pontos, o que caracteriza uma DN baixa a moderada. Tanto a dependência moderada, quanto a elevada podem ser responsáveis pela manutenção do uso do tabaco mesmo após o diagnóstico de câncer como observamos em 70% dos indivíduos no Grupo CCE fumante. Em 2014, Almeida et al. encontraram dados semelhantes em relação à DN em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, todavia no presente estudo não foi encontrada relação significativa entre a DN e o estágio da doença, ou entre o estágio da doença e carga tabágica.

Quanto ao perfil tabágico deste grupo, treze (50%) iniciaram o uso do tabaco antes dos 20 anos, 9 (34,7%) fumavam 30 ou mais cigarros/dia e 11 (42,3%) fumavam há mais de 30 anos. Em nossa casuística observamos um perfil 14 indivíduos (54%) apresentando escores classificados como elevada dependência. Em 2014, Almeida et al., encontrou maior porcentagem (66,2%) de indivíduos com DN elevada ou muito elevada. Neste mesmo estudo a grande maioria dos participantes (88,7%) havia parado de fumar, contudo, em nosso estudo 18 (70%) permaneciam fumando, mesmo após o diagnóstico de câncer.

Considerando que muitos pacientes, como em nossa amostra, persistem com o hábito de fumar mesmo após o diagnóstico de câncer, o apoio para cessação do tabagismo deve estar vinculado ao tratamento oncológico proposto. Os indivíduos com CCE bucal consumiam grande quantidade de tabaco, por longo período e DN elevada.

O teste AUDIT foi criado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um instrumento para rastreamento de comportamento de risco pelo uso do álcool e validado para a população brasileira por Mendez em 1999. Por ser um mecanismo de triagem do uso de etílicos, o AUDIT pode não demonstrar a real situação do consumo de álcool entre os indivíduos que o respondem. Entretanto, por ser de fácil aplicação pode ser utilizado em diversos níveis da atenção à saúde e avalia o comportamento devido ao uso do álcool principalmente no último ano.

O uso do álcool é considerado um fator potencializador dos efeitos do cigarro nas neoplasias malignas de cabeça e pescoço (Hashibe et al., 2009; Warnakulasuriya et al., 2010; Winn et al., 2015). Além disso, o álcool funciona como gatilho para o uso do tabaco e vice-versa. Entre os 13 indivíduos classificados com

consumo de risco, 8 fumavam 30 ou mais cigarros/dia, e destes 6 apresentavam DN elevada ou muito elevada, o que demonstra a realidade do consumo de tabaco e álcool, e o possível caráter de múltiplas dependências químicas entre pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Um único indivíduo que foi classificado como provável dependência ao álcool, fumava 30 cigarros/dia. Entre as mulheres com câncer e fumantes, um apresentava consumo de risco e outra consumo de alto risco.

Entre os indivíduos do Grupo CCE fumante, todos relataram fazer uso de álcool regularmente e 77% apresentavam consumo de risco relacionado. O perfil encontrado é muito discrepante dos resultados encontrados por Graner et al. (2016), com pacientes com diagnóstico de câncer bucal, onde 32,6% de indivíduos apresentavam consumo de risco relacionado ao uso álcool. Em nossa casuística, o número de pessoas que referiram não fazer uso de álcool ou abstêmios, foi bastante variável entre os grupos sendo maior no Grupo controle não fumante (4 entre 6), seguido pelo Grupo controle fumante (4 entre 9) e CCE não fumante (2 entre 6).

O Grupo CCE fumante foi composto por 21 homens e 5 mulheres, dos quais 73% encontravam-se em estágios avançados da doença (III e IV), fatos estes que estão bem próximos da realidade brasileira quanto a prevalência entre sexos e diagnóstico tardio da doença (Instituto Nacional do Câncer, 2018).

Dentre os pacientes com CCE que nunca fumaram o perfil foi composto na sua maioria por mulheres jovens e em estágios iniciais da doença. Estas características podem ser justificadas pelo desconforto do achado de uma lesão bucal em pessoas que nunca fumaram e a procura por atendimento mais rápido, principalmente por parte das mulheres (Toporcov et al., 2015; Baumann et al., 2016).

Ainda neste grupo, um homem encontrava-se em estágio bem inicial e outro no estágio IV. A importância do diagnóstico precoce de câncer de boca é um desafio não somente no Brasil, mas em todo mundo (Bandeira et al., 2017). O tratamento correto pode ser influenciado pelo atraso no diagnóstico que está relacionado ao desconhecimento, medo ou não preocupação pelo surgimento de alterações bucais, mesmo que sintomáticas e, conseqüentemente, retardo na avaliação clínica por um profissional de saúde ou especialista (Stefanuto et al., 2014; Baumann et al., 2016; Bandeira et al., 2017). Campanhas de esclarecimento sobre os riscos de doenças bucais pelo uso de tabaco e álcool podem mudar este panorama e ampliar o diagnóstico precoce e tratamento adequado do câncer bucal (Baumann et al., 2016).

As neoplasias malignas de boca, faringe e laringe apresentam como principais fatores de risco o tabaco e álcool (Hashibe et al., 2009; Winn et al., 2015). Dentre os componentes químicos encontrados na fumaça do tabaco, e que são classificados como potenciais agentes cancerígenos, encontramos as nitrosaminas, específicas como as NNK2 – 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona, NNN – N'-nitrosonornicotina, NAB – N'-nitrosoanabasina e NAT – N'-nitrosoanabatina, e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, sendo os mais conhecidos os benzopirenos (Rosemberg, 2003).

Estes componentes são transformados em carcinógenos ativos por meio das enzimas da família P450, das quais seis respondem por 77% de todo o metabolismo deste grupo. Os genes avaliados neste estudo respondem por 50% deste metabolismo (Rendic, Guengerich, 2012; He, Feng 2015).

A possibilidade de estudo dos genes acima citados em uma população específica relacionada ao consumo de risco do tabaco e do álcool mostrou-se ideal. O método escolhido para o presente estudo foi o qPCR que quantifica o total de RNAm identificando a atividade do gene, no entanto outras metodologias também podem ser utilizadas para avaliar a atividade destes genes como a quantificação total de proteínas e sua identificação tecidual pelos respectivos métodos de Western-Blot e imunohistoquímica.

Os genes CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6 e CYP2E1 codificam proteínas específicas que também estão envolvidas no metabolismo de substratos endógenos como a síntese de colesterol, esteroides, e exógenos como drogas, etanol e quimioterápicos. Todas estas proteínas estão localizadas no retículo endoplasmático e sua expressão principal é no fígado. Contudo, sua expressão pode ser induzida em sítios extra-hepáticos de acordo com a necessidade de bioativação de xenobióticos (Go et al., 2015; Kumar et al., 2017).

A identificação da metabolização de carcinógenos do tabaco da família CYP em indivíduos não tabagistas foi um desafio, uma vez que sua expressão está teoricamente diminuída devido à baixa demanda de utilização destas enzimas. Por este motivo alguns genes (CYP1A1 e CYP2A6) não foram expressos nestes casos o que dificultou o pareamento com o Grupo CCE levando à redução do número de amostras e, conseqüentemente, impossibilitando a comparação estatística entre estes grupos.

O gene CYP1A1 é responsável pela bioativação de carcinógenos encontrados no tabaco em especial dos HAP. Por esse motivo era esperado que houvesse expressão deste gene entre os pacientes fumantes com CCE. Encontramos aumento da expressão deste gene em aproximadamente 47% dos casos de CCE fumantes, mas apenas entre os homens. De maneira semelhante, somente dois homens do Grupo controle fumante expressaram este gene. Como os Grupos CCE não fumante e controle não fumante não expressaram este gene as análises estatísticas ficaram prejudicadas.

A importância de CYP1A1 na ativação de procarcinógenos e xenobióticos presentes na fumaça do cigarro também foi avaliada em estudos *in vitro* com cultura de células de CCE expostas a condensados de fumaça do tabaco. Tais estudos têm demonstrado a expressão de enzimas da família CYP em queratinócitos normais e linhagens de leucoplasias (Nagaraj et al., 2006). O CYP1A1 esteve altamente expresso em todas as linhagens estudadas, principalmente nos queratinócitos e no CCE.

A avaliação da expressão de CYP1A1 em células de lavado broncoalveolar e biópsias de pulmão realizada por Thum et al. (2006) também encontraram elevada expressão tanto de CYP1A1, quanto de CYP1B1 em fumantes quando comparados a não fumantes.

Em 2016, Kaminagakura et al. não encontraram aumento da expressão do CYP1A1 e nem influência desse gene no prognóstico em pacientes com CCE bucal por meio de avaliação proteica por imunohistoquímica comparando um grupo de adultos jovens menores de 40 anos com um grupo de pacientes acima de 50 anos.

A expressão de diversos genes metabolizadores do tabaco foi avaliada por Spivack et al. (2003) por meio de PCR, em amostras de tumores de pulmão, incluindo CCE, e em tecidos pulmonares saudáveis dos mesmo indivíduos. De modo geral, foi encontrada reduzida expressão de CYP1A1, entre todos os tipos histológicos estudados. Em 2002, um estudo brasileiro conduzido por Godoy et al., o gene CYP1A1 não foi expresso nas amostras de CCE de esôfago estudadas.

Assim como outros genes da família P450, o CYP1A1 também é considerado polimórfico o que poderia justificar a variação de expressão interpessoal. Esta variabilidade na prevalência de formas polimórficas é encontrada em diferentes populações como as asiáticas comparadas com afro-americanas ou

caucasianas. Alguns polimorfismos de CYP1A1 foram ligados a maior ou menor risco de desenvolvimento de CCE bucal (Singh et al., 2009; Rotunno et al., 2009; Shukla et al., 2012; Khlifi et al., 2013).

O gene CYP1B1, assim com o CYP1A1 está relacionado ao metabolismo dos HAP, em particular do benzopirenos. O estudo deste gene em pacientes fumantes, portanto, é importante por estar relacionado ao consumo do tabaco e à ativação de seus carcinógenos (Thum et al., 2006). Devido à sua função de metabolização de hormônios como estrogênio, estes genes são relacionados a neoplasias malignas de mama e endométrio (Go et al., 2015).

Encontramos uma expressão diminuída de CYP1B1 nos dois grupos de CCE quando comparados aos controles, embora todas as comparações entre os grupos mostraram-se significativas. Resultados semelhantes foram encontrados por Pradhan et al. um estudo com 36 amostras de CCE bucal comparadas a amostras de tecido normal do mesmo indivíduo e a uma amostra de displasia epitelial, onde CYP1B1 estava pouco expresso em 28 das 36 amostras e também na displasia (Pradhan et al., 2011).

Por meio de qPCR, Kolokythas et al. em 2011 também encontraram baixa expressão de CYP1B1 em citologia de mucosa bucal de indivíduos que foram submetidos a biópsias por suspeita de CCE bucal e comparados com controles que foram submetidos ao mesmo procedimento para diagnóstico de lesões benignas.

Todavia alguns estudos encontraram alta expressão de CYP1B1 em CCE de outros órgãos como o pulmão e esôfago (Murray et al., 1997; Spivack et al., 2001; Su et al., 2009).

Contrário ao CCE fumante, o Grupo controle fumante mostrou diferença estaticamente significativa na correlação entre a expressão de CYP1B1 com a idade ($p=0,0204$), número de cigarros fumados ao dia ($p=0,0052$) e carga tabágica ($p=0,0001$) (Tabela 4). Tanto a média dos cigarros fumados ao dia, quanto a carga tabágica foram maiores neste grupo em relação ao Grupo CCE fumante, ou seja, confirmando achados de literatura que demonstram o aumento na expressão deste gene decorrente da maior exposição ao tabaco (Spivack et al., 2003; Thum et al., 2006).

Assim como citado anteriormente em relação a CYP1A1, diversos polimorfismos de CYP1B1 também estão relacionados a risco aumentado ou

diminuído de CCE bucal (Khlifi et al., 2013).

A avaliação *in vitro* da expressão de CYP1B1 por cultura celular mostrou aumento da expressão deste gene induzido pela exposição a produtos do cigarro, tanto para células provenientes de tecido normal e displásicos, quanto para carcinoma de mucosa bucal (Nagaraj et al., 2006; Chi et al., 2009). O estudo de CYP1B1 por imunohistoquímica também demonstrou aumento da expressão desta enzima em adultos com CCE bucal acima de 50 anos, quando comparado com casos em adultos jovens menores que 45 anos (Kaminagakura et al., 2016).

Entre as mulheres fumantes com CCE, uma participante apresentou elevada expressão para os genes CYP1B1 e CYP2E1. Em 2017, Hashim et al. demonstraram, em revisão sistemática, que mulheres após a menopausa têm risco muito aumentado de desenvolver câncer de cabeça e pescoço em relação às mulheres em pré ou peri-menopausa.

O gene CYP2A6 é responsável pela metabolização de 80% da nicotina em cotinina, que pode ser dosada na urina, sangue, cabelo, saliva e unhas, e é utilizada como marcador de exposição ao tabaco (Di et al., 2009; Benowitz et al., 2009; Benowitz, 2010). Seu caráter polimórfico é responsável pelo alto ou baixo padrão de consumo de tabaco (Rosemberg, 2003; Blackford et al., 2006; Malaiyandi et al., 2006; Bergen et al., 2014; Piliguian et al., 2014).

A escolha do gene CYP2A6 em nosso estudo foi justificada pelo fato dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço apresentarem um perfil de fumantes pesados e com alta DN (Almeida et al., 2014). A hipótese seria a de que esta grande exposição ao tabaco estivesse relacionada a uma alta expressão desse gene, principalmente no Grupo CCE fumante.

A utilização da forma selvagem deste gene ocorreu em decorrência da maior prevalência desta forma na população brasileira, mas esta variação da expressão pode estar relacionada ao padrão polimórfico de CYP2A6 (Vasconcelos et al., 2005). Entretanto, a expressão de CYP2A6 foi observada somente em 13 amostras de indivíduos neste grupo e em uma amostra do Grupo controle, o que nos faz acreditar na presença de formas polimórficas nos demais indivíduos.

Em contrapartida, estudos têm demonstrado que o gene CYP2A6 está expresso no epitélio do trato respiratório desde a traqueia indicando um importante achado considerando a possibilidade de efeitos carcinogênicos e desenvolvimento

de câncer de pulmão em fumantes (Chiang et al., 2012; Kumar et al., 2017). Um estudo brasileiro com amostras de CCE de esôfago também demonstrou uma elevada expressão de CYP2A6 (Godoy et al., 2002).

Embora CYP2A6 esteja relacionado ao metabolismo da nicotina, a variação individual de expressão não foi correlacionada com a quantidade de cigarros fumados ao dia ou carga tabágica. A correlação entre os níveis de expressão e as diversas variáveis estudadas não mostrou diferença estaticamente significativa da expressão gênica de CYP2A6 no Grupo CCE fumante.

O gene CYP2E1 é responsável pela codificação de uma enzima homóloga responsável, principalmente, pelo metabolismo do álcool e alguns derivados do tabaco, como as nitrosaminas de baixo peso molecular e benzeno (Rendic, Guengerich, 2012; Khlifi et al., 2013; He, Feng, 2015). Esta enzima também esta expressa em epitélio bucal (Vondracek et al., 2001).

A inclusão do estudo da expressão deste gene deve-se ao fato do álcool ser um dos principais fatores de risco para o CCE bucal juntamente com o tabaco. A avaliação da expressão entre os quatro grupos não se mostrou estatisticamente significante. Porém, a expressão de CYP2E1 entre casos de CCE quando comparados com os controles fumantes foi significante ($p=0,0424$). Este achado pode ser justificado pelo consumo de risco de álcool encontrado em 77% de nossa amostra.

Como nos genes anteriormente mencionados, a expressão do gene CYP2E1 no Grupo CCE fumante mostrou grande variabilidade interindividual. Esta variação não se relacionou com a quantidade de cigarros fumados ao dia ou por toda a vida (maços/ano). Devido ao seu caráter subjetivo, a análise do consumo de álcool por meio do AUDIT não é capaz de quantificar de maneira precisa a realidade do consumo de etílicos, uma vez que a quantificação por doses ingeridas e teor de álcool em cada tipo de bebida também é bastante variado. Portanto, não foi possível comprovar de maneira exata a quantidade de álcool ingerido pelos participantes e sua relação com a expressão de CYP2E1.

Quando observamos a análise individual da expressão de CYP2E1, encontramos alguns aspectos interessantes em relação a expressão por sexo. A paciente mencionada anteriormente, a qual apresentou uma grande expressão de CYP2E1, assim como CYP1B1, apresentou pontuação muito baixa no AUDIT.

Diferente de um homem que também apresentou grande expressão de CYP2E1 e apresentava um AUDIT alto, compatível com provável dependência ao álcool. Ambos começaram a fumar por volta dos 30 anos de idade, consumiam 20 e 30 cigarros/dia, respectivamente e ambos apresentavam baixa DN. Mesmo tendo começado a fumar relativamente tarde, ambos foram diagnosticados em estágios avançados da doença. No caso da paciente, o aspecto hormonal pode ter influenciado tal evolução para estágio avançado, uma vez que a mesma não fazia uso regular de etílicos (Hashim et al., 2017).

Diferente de nossos achados em CCE bucal, Bergheim et al. (2007) demonstraram, por análise de qPCR, alta expressão de CYP2E1 em controles sadios, quando comparados com amostras de CCE de esôfago. Em contrapartida, em 2002, Godoy et al., encontraram expressão de CYP2E1 no mesmo tipo de neoplasia.

O gene CYP2E1 é conhecido como um dos principais metabolizadores de álcool, todavia, em nosso estudo, observamos grande expressão deste gene entre pacientes com câncer bucal que fumavam e bebiam. Sendo assim, o estudo deste gene entre outros tipos de neoplasias malignas relacionadas ao uso do tabaco pode ser de interesse científico em novas pesquisas, até mesmo como possível marcador de exposição ao tabaco entre pessoas que fumam, mas não fazem uso de álcool.

Este estudo apresenta algumas limitações. Embora tenha sido utilizado o questionário AUDIT para a avaliação do perfil etílico, foi possível observar grande subjetividade nas respostas e dificuldade em quantificar a ingesta real de etílicos pelos participantes. Outro aspecto que trouxe dificuldade foi o pareamento das amostras do Grupo CCE não fumante, uma vez que foram na sua maioria de mulheres, fato também relatado por Soares et al. (2017). Durante a etapa laboratorial foram excluídas das análises 5 amostras de CCE e 8 de controle, que após a extração de RNA não apresentaram quantidade suficiente para realização do qPCR durante os testes laboratoriais. Isto demonstra a importância de realização de estudos multicêntricos, como no presente trabalho.

6 CONCLUSÃO

A hipótese deste estudo de maior expressão dos genes metabolizadores de fase I nas amostras de pacientes fumantes quando comparados a não fumantes com câncer bucal foi comprovada para os genes CYP1A1 e CYP2E1, com menor expressão de CYP1B1 e CYP2A6 no mesmo grupo.

A característica polimórfica destes genes aliada ao tamanho da amostra podem ter influenciado a grande variabilidade interindividual no estudo da expressão dos genes estudados.

O gene CYP2E1, além de estar relacionado ao metabolismo do álcool, também deve ser considerado importante marcador do metabolismo dos carcinógenos derivados do tabaco.

REFERÊNCIAS*

- Almeida AÁ, Bandeira CM, Gonçalves AJ, Araújo AJ, Goncalves AJ, Araujo AJ. Nicotine dependence and smoking habits in patients with head and neck cancer. *J Bras Pneumol*. 2014;40(3):286–93.
- Balogh EP, Dresler C, Fleury ME, Gritz ER, Kean TJ, Myers ML, et al. Reducing tobacco-related cancer incidence and mortality: summary of an institute of medicine workshop. *Oncologist*. 2014;19(1):21–31.
- Bandeira CM, Almeida AÁ, Carta CFL, Almeida JD, Kaminagakura E. How to improve the early diagnosis of oral cancer? *Braz Dent Sci*. 2017;20(4):25-31.
- Baumann E, Koller M, Wiltfang J, Wenz HJ, Moller B, Hertrampf K. Challenges of early detection of oral cancer: raising awareness as a first step to successful campaigning. *Health Educ Res*. 2016;31(2):136-45.
- Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol*. 2009(192):29-60.
- Benowitz NL. Nicotine addiction. *N Engl J Med*. 2010 Jun 17;362(24):2295-303. doi: 10.1056/NEJMra0809890.
- Bergen AW, Javitz HS, Krasnow R, Michel M, Nishita D, Conti D V, et al. Organic cation transporter variation and response to smoking cessation therapies. *Nicotine Tob Res*. England. 2014 Dec;16(12):1638–46. doi: 10.093/ntr/ntu161
- Bergheim I, Wolfgarten E, Bollschweiler E, Holscher AH, Bode C, Parlesak A. Cytochrome P450 levels are altered in patients with esophageal squamous-cell carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2007;13(7):997-1002.
- Berthiller J, Straif K, Agudo A, Ahrens W, Bezerra Dos Santos A, Boccia S, et al. Low frequency of cigarette smoking and the risk of head and neck cancer in the INHANCE consortium pooled analysis. *Int J Epidemiol*. 2016;45(3):835-45.
- Blackford AL, Yang G, Hernandez-Avila M, Przewozniak K, Zatonski W, Figueiredo V, et al. Cotinine concentration in smokers from different countries: relationship with amount smoked and cigarette type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(10):1799–804.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. *Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016*. Brasília: ANVISA; 2017. [acesso em 2017 Jun 11]. Disponível em: http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/07/vigitel_2016_jun17.pdf

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr;55(4):611-22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.

Cao C, Chen J, Lyu C, Yu J, Zhao W, Wang Y, et al. Bioinformatics analysis of the effects of tobacco smoke on gene expression. *PLoS One*. 2015;10(12): e0143377

Chi AC, Appleton K, Henriod JB, Krayner JW, Marlow NM, Bandyopadhyay D, et al. Differential induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo[a]pyrene in oral squamous cell carcinoma cell lines and by tobacco smoking in oral mucosa. *Oral Oncol*. 2009;45(11):980-5.

Chiang HC, Wang CK, Tsou TC. Differential distribution of CYP2A6 and CYP2A13 in the human respiratory tract. *Respiration*. 2012;84(4):319-26.

Choudhury JH, Singh SA, Kundu S, Choudhury B, Talukdar FR, Srivasta S, et al. Tobacco carcinogen-metabolizing genes CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and their interaction with tobacco exposure influence the risk of head and neck cancer in Northeast Indian population. *Tumour Biol*. 2015 Aug;36(8):5773-83. doi: 10.1007/s13277-015-3246-0.

Di YM, Chow VD, Yang LP, Zhou SF. Structure, function, regulation and polymorphism of human cytochrome P450 2A6. *Curr Drug Metab*. 2009 Sep;10(7):754-80.

Fagerström K. Determinants of tobacco use and renaming the FTND to the Fagerström Test for Cigarette Dependence. *Nicotine Tob Res*. 2012;14(1):75-8.

Fiore MC. Treating tobacco use and dependence: 2008 update U.S. Public Health Service Clinical Practice Guideline executive summary. *Respiratory care*. 2008;53(9):1217-22.

Go RE, Hwang KA, Choi KC. Cytochrome P450 1 family and cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;147:24-30.

Godoy W, Albano RM, Moraes EG, Pinho PR, Nunes RA, Saito EH, et al. CYP2A6/2A7 and CYP2E1 expression in human oesophageal mucosa: regional and inter-individual variation in expression and relevance to nitrosamine metabolism. *Carcinogenesis*. 2002;23(4):611-6.

Graner KM, Rolim GS, Moraes ABA, Padovani CR, Lopes MA, Santos-Silva AR, et al. Feelings, perceptions, and expectations of patients during the process of oral cancer diagnosis. *Support Care Cancer*. 2016;24(5):2323-32.

Gupta N, Gupta R, Acharya AK, Patthi B, Goud V, Reddy S, et al. Changing Trends in oral cancer - a global scenario. *Nepal J Epidemiol*. 2016;6(4):613-9.

Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(2):541-50.

Hashim D, Sartori S, La Vecchia C, Serraino D, Maso LD, Negri E, et al. Hormone factors play a favorable role in female head and neck cancer risk. *Cancer Med*. 2017;6(8):1998-2007.

He X, Feng S. Role of metabolic enzymes P450 (CYP) on activating procarcinogen and their polymorphisms on the risk of cancers. *Curr Drug Metab*. 2015;450:850–63.

Heatherton TF, Kozlowski LT, Frecker RC, Fagerström KO. The Fagerström Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerström Tolerance Questionnaire. *Br J Addict*. 1991;86(9):1119-27.

Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2017 Jul;18(7):40. doi: 10.1007/s11864-017-0484-y.

Instituto Nacional do Câncer - INCA. Estimativa 2018/2019 Incidência de Cancer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA Instituto Nacional do Câncer; 2018 [acesso em 2017 Jun 10] Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>

Kamataki T, Fujieda M, Kiyotani K, Iwano S, Kunitoh H. Genetic polymorphism of CYP2A6 as one of the potential determinants of tobacco-related cancer risk. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338(1):306-10. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.268.

Kaminagakura E, Caris A, Coutinho-Camillo C, Soares FA, Takahama-Junior A, Kowalski LP. Protein expression of CYP1A1, CYP1B1, ALDH1A1, and ALDH2 in young patients with oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2016 Jun;45(6):706-12. doi: 10.1016/j.ijom.2016.02.004.

Karam-Hage M, Cinciripini PM, Gritz ER. Tobacco use and cessation for cancer survivors: an overview for clinicians. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(4):272–90.

Kelloff GJ, Boone CW, Steele VK, Perloff M, Crowell J, Doody LA. Development of chemopreventive agents for lung and upper aerodigestive tract cancers. *J Cell Biochem*. 1993;17F(Suppl):2-17. doi: 10.1002/jcb.240531003.

Khelifi R, Messaoud O, Rebai A, Hamza-Chaffai A. Polymorphisms in the human cytochrome P450 and arylamine N-acetyltransferase: susceptibility to head and neck cancers. *Biomed Res Int*. 2013;582768. doi: 10.1155/2013/582768.

Kolokythas A, Schwartz JL, Pytynia KB, Panda S, Yao M, Homann B, et al. Analysis of RNA from brush cytology detects changes in B2M, CYP1B1 and KRT17 levels with OSCC in tobacco users. *Oral Oncol*. 2011;47(6):532-6.

Kumar S, Sinha N, Gerth KA, Rahman MA, Yallapu MM, Midde NM. Specific packaging and circulation of cytochromes P450, especially 2E1 isozyme, in human plasma exosomes and their implications in cellular communications. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;491(3):675-80.

Li N, Hu Q, Jiang C, Hu Y, Yuan Y, Jian X, et al. Novel genetic biomarkers for susceptibility to oral submucous fibrosis: cytochrome P450 3A. *Med Hypotheses*. 2011 Nov;77(5):834-6. doi: 10.1016/j.mehy.2011.07.049.

Lin CY, Pan TS, Ting CC, Liang SS, Huang SH, Liu HY, et al. Cytochrome p450 metabolism of betel quid-derived compounds: implications for the development of prevention strategies for oral and pharyngeal cancers. *ScientificWorldJournal*. 2013;618032. doi: 10.1155/2013/618032.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar;67(2):122-37. doi: 10.3322/caac.21389.

Malaiyandi V, Goodz SD, Sellers EM, Tyndale RF. CYP2A6 genotype , phenotype , and the use of nicotine metabolites as biomarkers during ad libitum smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(10):1812-9.

Malik UU, Zarina S, Pennington SR. Oral squamous cell carcinoma: key clinical questions, biomarker discovery, and the role of proteomics. *Arch Oral Biol*. 2015;63:53-65.

Mallery SR, Tong M, Michaels GC, Kiyani AR, Hecht SS. Clinical and biochemical studies support smokeless tobacco's carcinogenic potential in the human oral cavity. *Cancer Prev Res*. 2014;7(1):23-32.

Marques CF, Koifman S, Koifman RJ, Boffetta P, Brennan P, Hatagima A. Influence of CYP1A1, CYP2E1, GSTM3 and NAT2 genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: results from a case-control study in Rio de Janeiro. *Oral Oncol*. 2006 Jul;42(6):632-7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.11.003.

Moretti-Pires RO, Corradi-Webster CM. Adaptation and validation of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) for a river population in the Brazilian Amazon. *Cad Saude Publica*. 2011;27(3):497-509.

Moorthy B, Chu C, Carlin DJ. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicol Sci*. 2015 May;145(1):5-15. doi: 10.1093/toxsci/kfv040.

Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, et al. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res*. 1997;57(14):3026-31.

Nagaraj NS, Beckers S, Mensah JK, Waigel S, Vigneswaran N, Zacharias W. Cigarette smoke condensate induces cytochromes P450 and aldo-keto reductases in oral cancer cells. *Toxicol Lett*. 2006 Aug 20;165(2):182-94.

Piliguian M, Zhu AZ, Zhou Q, Benowitz NL, Ahluwalia JS, Sanderson Cox L, et al. Novel CYP2A6 variants identified in African Americans are associated with slow nicotine metabolism in vitro and in vivo. *Pharmacogenet Genomics*. 2014;24(2):118-28. doi.org/10.1097/fpc.0000000000000026

Pinto M, Bardach A, Palacios A, Biz AN, Alcaraz A, Rodríguez B, et al. Carga de doença atribuível ao uso do tabaco no Brasil e potencial impacto do aumento de preços por meio de impostos [Internet] [Documento técnico IECS N° 21]. Buenos Aires, Argentina: Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria [acesso em 2017 Mai 15]. Disponível em: <http://natsinc.org/wpress/euroqol/wp-content/uploads/2017/06/tabagismo-no-Brasil.pdf>

Pradhan S, Nagashri MN, Gopinath KS, Kumar A. Expression profiling of CYP1B1 in oral squamous cell carcinoma: counterintuitive downregulation in tumors. *PLoS One*. 2011;6(11):e27914. doi.org/10.1371/journal.pone.0027914

Reichert J, Araujo AJ, Goncalves CM, Godoy I, Chatkin JM, Sales MP, et al. Diretrizes para cessação do Tabagismo - 2008. *J Bras Pneumol*. 2008;34(10):845-80. doi.org/10.1590/S1806-37132008001000014.

Rendic S, Guengerich FP. Update information on drug metabolism systems--2009, part II: summary of information on the effects of diseases and environmental factors on human cytochrome P450 (CYP) enzymes and transporters. *Curr Drug Metab*. 2010 Jan;11(1):4-84.

Rendic S, Guengerich FP. Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chem Res Toxicol*. 2012 Jul 16;25(7):1316-83. doi: 10.1021/tx300132k.

Rosemberg J. Nicotina: droga universal. São Paulo: SES/CVE; 2003.

Rossini A, Lima SS, Rapozo DC, Faria M, Albano RM, Pinto LF. CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. *Braz J Med Biol Res*. 2006 Feb;39(2):195-201. doi: /S0100-879X2006000200005

Rotunno M, Yu K, Lubin JH, Consonni D, Pesatori AC, Goldstein AM, et al. Phase I metabolic genes and risk of lung cancer: multiple polymorphisms and mRNA expression. *PLoS One*. 2009;4(5):e5652. doi.org/10.1371/journal.pone.0005652

Scully C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(3):e306-11.

Sham AS, Cheung LK, Jin LJ, Corbet EF. The effects of tobacco use on oral health. *Hong Kong Med J*. 2003;9(4):271-7.

Shukla D, Dinesh Kale A, Hallikerimath S, Vivekanandhan S, Venkatakanthaiah Y. Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes (GSTM1 and CYP1A1) as risk factors for oral premalignant lesions and oral cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2012;156(3):253-9.

Singh AP, Shah PP, Ruwali M, Mathur N, Pant MC, Parmar D. Polymorphism in cytochrome P4501A1 is significantly associated with head and neck cancer risk. *Cancer Invest*. 2009;27(8):869-76.

Svicher A, Cosci F, Giannini M, Pistelli F, Fagerström K. Item Response Theory analysis of Fagerström Test for Cigarette Dependence. *Addict Behav*. 2018;77:38-46.

Soares PO, Maluf Cury P, Mendoza Lopez RV, Cernea CR, Fukuyama EE, Figueiredo DLA, et al. GTSP1 expression in non-smoker and non-drinker patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182600.

Spivack SD, Hurteau GJ, Fasco MJ, Kaminsky LS. Phase I and II carcinogen metabolism gene expression in human lung tissue and tumors. *Clin Cancer Res*. 2003;9(16 Pt 1):6002-11.

Spivack SD, Hurteau GJ, Reilly AA, Aldous KM, Ding X, Kaminsky LS. CYP1B1 expression in human lung. *Drug Metab Dispos*. 2001;29(6):916-22.

Stefanuto P, Doucet J-C, Robertson C. Delays in treatment of oral cancer: a review of the current literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014;117(4):424-9.

Su JM, Lin P, Wang CK, Chang H. Overexpression of cytochrome P450 1B1 in advanced non-small cell lung cancer: a potential therapeutic target. *Anticancer Res*. 2009;29(2):509-15.

Thum T, Erpenbeck VJ, Moeller J, Hohlfeld JM, Krug N, Borlak J. Expression of xenobiotic metabolizing enzymes in different lung compartments of smokers and nonsmokers. *Environ Health Perspect*. 2006;114(11):1655-61.

Toporcov TN, Znaor A, Zhang ZF, Yu GP, Winn DM, Wei Q, et al. Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Int J Epidemiol*. 2015;44(1):169-85.

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Audit: teste de identificação de desordens dividido ao uso de álcool [Internet]. [acesso em 2017 mai 05]. Disponível em: http://www.fct.unesp.br/Home/Administracao/TecSaude-UNAMOS/audit_com_escore_para_entrevistador-1.pdf

Vasconcelos GM, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. CYP2A6 genetic polymorphisms and correlation with smoking status in Brazilians. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(1):42-8. doi: 10.1038/sj.tpj.6500290.

Vondracek M, Xi Z, Larsson P, Baker V, Mace K, Pfeifer A, et al. Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa. *Carcinogenesis*. 2001;22(3):481-8.

Warnakulasuriya S, Dietrich T, Bornstein MM, Casals Peidro E, Preshaw PM, Walter C, et al. Oral health risks of tobacco use and effects of cessation. *Int Dent J*. 2010;60(1):7-30.

Winn DM, Lee YC, Hashibe M, Boffetta P. The INHANCE consortium: toward a better understanding of the causes and mechanisms of head and neck cancer. *Oral Dis*. 2015;21(6):685-93.

World Health Organization. Cancer Fact Sheets [Internet]. Genebra: World Health Organization; 2015 [acesso em 2017 Jun 17]; [aproximadamente 7 p]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

World Health Organization. Cancer prevention [Internet]. Genebra: World Health Organization; 2017b [acesso em 2017 Jun 17]; [aproximadamente 4 p.]. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/prevention/en/>.

World Health Organization. No communicable diseases 2017. Genebra: World Health Organization; 2017a. [acesso em 2017 Jun 12]; [aproximadamente 104 p]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/>

World Health Organization. Tobacco Free Initiative (TFI): Canada Oral Cancer [Internet]. Genebra: World Health Organization; 2012 [acesso em 2017 Jun 15]; [aproximadamente 1 p]. Disponível em: http://www.who.int/tobacco/healthwarningsdatabase/tobacco_large_canada_mouth_01_en/en/

World Health Organization. Warning about the dangers of tobacco [Internet] Genebra: World Health Organization; 2011. [acesso em 2017 Jun 15]; [aproximadamente 152 p]. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240687813_eng.pdf

World Health Organization. World Cancer Report 2014. Lyon: IARC; 2014.

Zhang J, Gao F, Yang AK, Chen WK, Chen SW, Li H, et al. Epidemiologic characteristics of oral cancer: single-center analysis of 4097 patients from the Sun Yat-sen University Cancer Center. *Chin J Cancer*. 2016;35:24.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado(a) Senhor(a)

Eu, JANETE DIAS ALMEIDA, Professora Adjunta da Disciplina de Propedêutica Estomatológica do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciências e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP, portador do registro no Conselho Regional de Odontologia CROSP 40530, telefone para contato 12-39479079, irei coordenar um projeto de pesquisa cujo título é “ESTUDO GENÉTICO DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE BUCAL”.

O projeto foi desenvolvido pelos pesquisadores: Dr. Celso Muller Bandeira – CRM 77096, médico, Cirurgião de Cabeça e Pescoço, e Dra. Adriana Ávila de Almeida – CRM 76850, médica, Pneumologista, e pela Dra. Celina Faig Lima Carta CROSP: 81757, cirurgiã-dentista.

O objetivo é realizar uma pesquisa sobre câncer de cabeça e pescoço, em particular a boca, e sua relação com o hábito de fumar e beber ou outros hábitos sociais. Estudos no mundo todo, inclusive no Brasil, estão sendo realizados com o objetivo de se estudar uma parte de nossas células que quando alteradas podem levar ao aparecimento do câncer ou outras doenças e saber se esta parte estudada poderia causar um maior ou menor risco ao câncer. Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa que tem a finalidade de estudar as características genéticas e biológicas do câncer bucal e compará-las com pessoas sem este tipo de câncer. Pode ser que você não seja diretamente beneficiado, mas futuros pacientes poderão ter algum tipo de benefício com o estudo.

Sua participação neste projeto é totalmente voluntária, não existindo nenhum tipo de compensação, privilégio ou benefício. Caso você não aceite participar também não existe nenhum tipo de sanção ou prejuízo à sua avaliação e tratamento, sendo que você foi acompanhado da mesma forma. Não existe nenhum tipo de remuneração, exceto, alguma cobertura de custo com alimentação ou transporte caso você seja procurado durante a pesquisa para algum tipo de esclarecimento e precise vir até

nós. Você poderá contatar os pesquisadores por meio de telefone de nossa faculdade para esclarecimento de quaisquer dúvidas acerca da pesquisa.

Caso você aceite participar da pesquisa, você responderá a um questionário, com algumas perguntas sobre o uso de cigarro e de bebidas alcoólicas, alimentação, atividade profissional, hábitos sociais que podem ter relação com o problema em questão. Tais informações são CONFIDENCIAIS, e o sigilo absoluto está garantido.

Para o estudo, será necessário coletar cerca de 2.0 ml de saliva que você irá cuspir em um pote de plástico além de um raspado de células do interior da sua boca, que será feita com uma escova e um fragmento de 0.5 cm do tumor que será retirado durante o procedimento cirúrgico para diagnóstico e/ou tratamento. Alguns pacientes serão convidados a participar mas que não possuem nenhum tumor e suas amostras servirão de comparação com pacientes com câncer de boca. O material será adequadamente armazenado para ser utilizado posteriormente.

Não existe risco de contaminação. O material utilizado para coleta de saliva é descartável e o material utilizado nos procedimentos cirúrgicos é esterilizado. Em decorrência do procedimento cirúrgico, que poderá ser uma biópsia ou mesmo o tratamento você poderá sentir um pouco de dor, ter ferimento na boca semelhante a uma afta, irritação no local, infecção, ou ainda sangramento. Tais sintomas são os próprios sintomas decorrentes do procedimento, não havendo um agravamento por participar do estudo. Você sairá do procedimento com receita e orientação para dor ou sangramento. Caso haja algum problema maior, você poderá entrar em contato com os pesquisadores, e os mesmos o atenderão rapidamente para a resolução do problema. Na grande maioria das vezes isto não lhe trará nenhum prejuízo, pois não são complicações graves e nem vão alterar o seu tratamento.

O material coletado será analisado no laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia ICT-UNESP ou em outro laboratório de anatomia patológica. O material armazenado em blocos de parafina ficará guardado por muitos anos, e poderá ser utilizado em outras pesquisas do mesmo tipo. Em nenhum momento da pesquisa será realizado algum tipo de manipulação genética ou modificação do DNA.

Sua participação é voluntária e poderá trazer benefícios diretos para os estudos do impacto do tratamento do câncer, do tabagismo, etilismo ou outro fator relacionado a doença. As informações obtidas serão analisadas sem que seu nome apareça. O Sr (a) tem o direito de ser informado sobre os resultados finais ou parciais. Se tiver

APÊNDICE B – Ficha de coleta de dados sobre o estudo**Parte I – Dados gerais e consumo de carcinógenos**

Nome:	
Sexo:	Cor:
Idade:	Data Nasc:
Residência:	
Bairro:	Cidade:
Estado:	Fone:
Profissão:	
Você fuma?	
Se fuma, qual o tipo?	
Há quanto tempo?	
Qual a frequência do seu consumo de cigarros?	
Quantos cigarros/dia?	
Caso ex-fumante, parou há quanto tempo?	
Você faz uso de bebidas alcoólicas mesmo que seja com pouca frequência?	
Sim	Não
Qual a frequência do seu consumo de bebidas alcoólicas?	
Diário (>1x/dia)	Diário (1 x ao dia)
1 a 3 vezes por semana	Mensal
Que tipo de bebida você consome quando bebe?	
Cerveja	Uísque
Batida	Vinho
Caipirinha	Outras
Quantas doses (copos) você consome num dia típico em que está bebendo?	
1 a 2	10 ou mais
3 a 4	Cerveja 350 ml
5 a 6	Vinho 120 ml
7 a 9	Destilado (whisky, vodca, pinga) 36 ml

Você faz uso de cigarro e álcool simultaneamente?	
Sim	Não
Quando você bebe, consome mais cigarro?	
Sim	Não
Quanto a mais você consome?	
Você faz, ou já fez, uso de outras substâncias químicas?	
Sim	Não
Quais?	
Com que frequência você consome, ou consumia, estas substâncias?	
Diário (>1x/dia)	1 a 3 vezes por semana
Diário (1 x ao dia)	Mensal
Faz uso de algum medicamento?	
Sim	Não
Qual(is)?	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Exame clínico:

1) Extra-bucal

2) Intra-bucal

3) Teste de Fagerström para dependência a cigarros (TFDC)

Parte II - Estadiamento (TNM) e tratamento oncológico

Neoplasia de cavidade bucal		
Sítio primário (epicentro da lesão)	Palato duro	
	Soalho	
	Soalho Língua	Direito
		Esquerdo
		Anterior
	Língua	Ventre
		Dorso
		Bordo D
		Bordo E
	Gengiva	Superior
		Inferior
		Direita
		Esquerda
	Área retromolar D	
Jugal D		
Jugal E		
Retromolar E		
Tratamento	Cirúrgico Exclusivo	
	Radioterápico Exclusivo	
	Quimioterápico Exclusivo	
	Cirurgia + Radioterapia Complementar	
	Cirurgia + Radioterapia E Quimioterapia Complementar	
	<ul style="list-style-type: none"> - Radioterapia + quimioterapia - Dose Radioterapia - Quimioterápicos utilizados - Protocolo Utilizado 	
Estadiamento	TNM pré-operatório	
	TNM pós-operatório - Achados patológicos:	
	Margem livre X comprometida	
	Linfonodos livres X comprometidos	
	Extravasamento extra capsular	
	Estágio Clínico	

Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE C – Teste de Fagerström para Dependência a Cigarros

Teste de Fagerström para Dependência a Cigarros			
1) Quanto tempo, logo após acordar, você fuma o 1º cigarro?			
Dentro de 5 minutos (3)	Entre 6-30 min (2)	Entre 31-60 min (1)	Após 60 min (0)
2) Para você é difícil não fumar em lugares proibidos?			
Sim (1)		Não (0)	
3) Qual dos cigarros que fuma durante o dia lhe dá mais satisfação?			
O primeiro da manhã (1)		Os outros (0)	
4) Quantos cigarros você fuma por dia?			
Menos de 10 (0)	Entre 10-20 (1)	Entre 21-30 (2)	Acima 31 (3)
5) Você fuma frequentemente pela manhã?			
Sim (1)		Não (0)	
6) Você fuma mesmo doente, quando precisa ficar acamado a maior parte do tempo?			
Sim (1)		Não (0)	

Fonte: Fagerström, 2012

Pontos	DN
0 – 2	Muito baixa
3 – 4	Baixa
5	Moderada
6 – 8	Elevada
9 – 10	Muito elevada

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO GENÉTICO DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE

Pesquisador: JANETE DIAS ALMEIDA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 42387315.0.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.033.312

Data da Relatoria: 17/04/2015

Apresentação do Projeto:

O trabalho ora apresentado pretende realizar estudos direcionados ao conhecimento genético individual na tentativa de novas classificações das diversas apresentações das neoplasias malignas de cabeça e pescoço. Estudos de genotipagem, metilação e expressão gênica tem sido o direcionamento dos atuais estudos, em conjunto com o conhecimento dos efeitos do tabaco e do perfil tabágico, juntamente com outros fatores como uso abusivo de álcool dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço, podem direcionar a uma melhor compreensão do problema resultando a promoção de tratamentos mais eficazes, menos invasivos e principalmente mais eficientes.

Cumpriu todas as etapas.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é avaliar a metilação dos genes supressores de tumor, expressão gênica relacionados ao metabolismo do tabaco, análise da ploidia do DNA, análise da saliva e de células esfoliadas da mucosa bucal de pacientes com carcinoma de células escamosas (CCE) intra-bucal em busca de correlação clinicopatológica entre tabagismo e o prognóstico da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O benefício para o participante do estudo é indireto, existindo o benefício relevante de participar

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa: ESTUDO GENÉTICO DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE BUCAL

Informações Preliminares

Responsável Principal

CPF: 09218849824	Nome: JANETE DIAS ALMEIDA
Telefone: (12) 3947-9078	E-mail: janete@fosjc.unesp.br

Instituição Proponente

CNPJ: 48.031.918/0014-49	Nome da Instituição: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP
--------------------------	---

É um estudo internacional? Não

■ **Assistentes**

CPF	Nome
291.777.128-38	Celina Faig Lima Carta

■ **Equipe de Pesquisa**

CPF	Nome
75335247649	ADRIANA ÁVILA DE ALMEIDA
29177712838	Celina Faig Lima Carta
62817795687	CELSO MULLER BANDEIRA
00442145373	Monica Ghislaine Oliveira Alves

Área de Estudo

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Outros

Título Público da Pesquisa: ESTUDO GENÉTICO DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE BUCAL

Contato Público

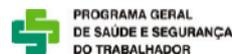
CPF	Nome	Telefone	E-mail
09218849824	JANETE DIAS ALMEIDA	(12) 3947-9078	janete@fosjc.unesp.br

Contato Celina Faig Lima Carta

ANEXO B – AUDIT



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



AUDIT – TESTE PARA IDENTIFICAÇÃO DE PROBLEMAS RELACIONADOS AO USO DE ÁLCOOL

DADOS PESSOAIS				
NOME				
ORIENTAÇÕES PARA REALIZAÇÃO DO TESTE				
<p>O uso de álcool pode afetar sua saúde e pode interferir com algumas medicações e tratamentos. Por isso é importante que você responda sobre o seu uso de álcool. <u>Suas respostas permanecerão confidenciais.</u></p> <p>Por favor, responda com toda a sinceridade.</p> <p>Assinale com "X" a alternativa que melhor descreve sua resposta a cada questão.</p>		<p>UM DRINK ou UMA DOSE =</p> <p>150 ml de vinho</p> <p>350 ml de cerveja</p> <p>1 dose de destilado (whisky, vodka, pinga), 40ml, ou 1 coquetel:</p>		
1. Com que frequência (quantas vezes por semana) você consome bebidas alcoólicas?				
() Nunca [0]	() Uma vez por mês ou menos [1]	() 2-4 vezes por mês [2]	() 2-3 vezes por semana [3]	() 4 ou mais vezes por semana [4]
2. Quantas doses de álcool você consome num dia normal?				
() 0 ou 1 [0]	() 2 ou 3 [1]	() 4 ou 5 [2]	() 6 ou 7 [3]	() 8 ou mais [4]
3. Com que frequência (quantas vezes por semana) você consome cinco ou mais doses em uma única ocasião?				
() Nunca [0]	() Menos que uma vez por mês [1]	() Uma vez por mês [2]	() Uma vez por semana [3]	() Quase todos os dias [4]
4. Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você achou que não conseguiria parar de beber, uma vez tendo começado?				
() Nunca [0]	() Menos que uma vez por mês [1]	() Uma vez por mês [2]	() Uma vez por semana [3]	() Quase todos os dias [4]
5. Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você não conseguiu fazer o que era esperado de você por causa do álcool?				
() Nunca [0]	() Menos que uma vez por mês [1]	() Uma vez por mês [2]	() Uma vez por semana [3]	() Quase todos os dias [4]
6. Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você precisou beber pela manhã para poder se sentir bem ao longo do dia, após ter bebido bastante no dia anterior?				
() Nunca [0]	() Menos que uma vez por mês [1]	() Uma vez por mês [2]	() Uma vez por semana [3]	() Quase todos os dias [4]
7. Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você se sentiu culpado ou com remorso após ter bebido?				
() Nunca [0]	() Menos que uma vez por mês [1]	() Uma vez por mês [2]	() Uma vez por semana [3]	() Quase todos os dias [4]
8. Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você foi incapaz de lembrar o que aconteceu devido à bebida?				
() Nunca [0]	() Menos que uma vez por mês [1]	() Uma vez por mês [2]	() Uma vez por semana [3]	() Quase todos os dias [4]
9. Você já causou ferimentos ou prejuízos a você mesmo ou a outra pessoa após ter bebido?				
() Não [0]		() Sim, mas não no último ano [2]		() Sim, durante o último ano [4]
10. Alguém ou algum parente, amigo ou médico, já se preocupou com o fato de você beber ou sugeriu que você parasse?				
() Não [0]		() Sim, mas não no último ano [2]		() Sim, durante o último ano [4]
RESULTADO DO TESTE				
NOME RESPONSÁVEL PELA APLICAÇÃO DO TESTE				
DATA				

Consumo de baixo risco ou abstinência = 0 a 7 pontos

Consumo de risco = 8 a 15 pontos

Uso nocivo ou consumo de alto risco = 15 a 19 pontos

Provável dependência = 20 ou mais pontos (máximo = 40 pontos)

AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test): descrição, referências e instrumento.

Este instrumento, elaborado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) por BABOR et al (1992), compõe-se de 10 questões e tem por objetivo identificar possíveis dependentes de álcool. Foi traduzido e validado no Brasil por LIMA et al. (2001). As questões referem-se aos últimos 12 meses, sendo que as três primeiras medem a quantidade e frequência do uso regular ou ocasional de álcool, as três questões seguintes investigam sintomas de dependência e as quatro finais são a respeito de problemas recentes na vida relacionados ao consumo do álcool. O escore varia de 0 a 40 e sua pontuação pode ser feita de vários modos. Por exemplo, uma pontuação superior a oito indica a necessidade de um diagnóstico mais específico. Porém, atualmente, o próprio autor principal (BABOR & HIGGLE-BIDDLE, 2003) vem propondo quatro níveis de escore para o AUDIT, que sugeririam fazer (ou não) uma intervenção breve, inserida na atenção primária à saúde e dirigida aos profissionais de saúde. O escore, então, seria classificado como descrito abaixo:

- Consumo de baixo risco ou abstêmios = 0 a 7 pontos
- Consumo de risco = 8 a 15 pontos
- Uso nocivo ou consumo de alto risco = 16 a 19 pontos
- Provável dependência = 20 ou mais pontos (máximo = 40 pontos)

O AUDIT, portanto, serve para o rastreamento dos possíveis casos, sendo um método simples para identificar pessoas com consumo de risco, uso nocivo e dependência do álcool.).

O padrão "*binge drinking*" ("beber com embriaguez" ou "tomando porre") enquadra-se dentro do consumo de alto risco, sendo que, para este, recomenda-se as seguintes atuações:

1. mostrar para o indivíduo que seu comportamento de beber é classificado como de risco;
2. encorajá-lo a reduzir o seu padrão de beber atual, apontando os riscos específicos a que está sujeito em decorrência do consumo acima do recomendável;
3. orientar no sentido de que a opção seja pelo beber de baixo risco ou pela abstinência, se o indivíduo concordar;



4. explicar o que seria um drinque ou dose-padrão e, pela definição, orientar sobre a quantidade máxima recomendada para o consumo do álcool, conforme o sexo e a condição clínica de cada um conforme figura abaixo, traçando metas que visem a diminuição gradual da ingestão alcoólica.