



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de São José dos Campos

Instituto de Ciência e Tecnologia

CELSO MULLER BANDEIRA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS PRINCIPAIS
METABOLIZADORES DE FASE II DE XENOBIÓTICOS: GSTM1,
GSTP1 e GSTT1 EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
BUCAL**

2018

CELSO MULLER BANDEIRA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS PRINCIPAIS METABOLIZADORES DE
FASE II DE XENOBIÓTICOS: GSTM1, GSTP1 e GSTT1 EM CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS 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
Coorientadora: Prof. 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).

Bandeira, Celso Muller

Estudo da expressão gênica dos principais metabolizadores de fase II de xenobióticos: GSTM1, GSTP1 e GSTT1 em carcinoma de células escamosas bucal / Celso Muller Bandeira. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.

73 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. Neoplasias bucais. 2. Carcinogênese. 3. Carcinoma de células escamosas. 4. Expressão gênica. 5. Xenobióticos. 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 (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. César Augusto Cardoso

Universidade de Taubaté

I Departamento de Medicina

Campus de Taubaté

Prof. Titular Antonio José Gonçalves

Faculdade de Ciências Médicas

Santa Casa de São Paulo

Campus de São Paulo

Profa. Titular Yasmin Rodarte Carvalho

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Prof. Dr. Luiz Eduardo Blumer Rosa

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 06 de fevereiro de 2018.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Saulus (in memorian), cirurgião-dentista, que embora ausente por longos anos busquei honrar seus princípios de honestidade, responsabilidade e amor ao próximo. Jamais poderia imaginar que um dia estaríamos tão ligados ao fazer uma pós-graduação em uma faculdade de odontologia.

A minha querida mãe Regina sempre presente com seu apoio e carinho. Com você também aprendi o sentido de servir ao próximo. Obrigado por acreditar sempre em mim.

A minha querida esposa Adriana, juntos estudamos desde que nos conhecemos. Amor a primeira vista nas aulas de anatomia da faculdade. Obrigado pelo seu amor e incentivo. Crescemos, amadurecemos, casamos, tivemos filhos e ... voltamos para escola. Você me completa em todos os momentos. Te amo.

Ao meu querido filho Caio, desde pequeno muito curioso. Me fez querer cada vez saber mais, me inspirando a perguntar e buscar respostas. Agradeço imensamente a você meu filho a me tornar uma pessoa melhor. Agora na sua juventude de poucas palavras mas muito carinho e companheirismo. Te amo também.

À minha querida e amada filha Taís, veio para completar o que faltava na família. Extremamente inteligente e de uma determinação impar. Na sua figura de garota, me tornou um pai mais humano e paciente. Me ensina todo dia e me torna mais feliz. Te amo também e também...

Aos queridos irmãos Flavio, Rafael e Cecília, vejo em vocês a nossa velha família, local de onde vim e que jamais esquecerei. Saudades sempre.

A duas famílias que sempre foram muito importantes em toda a minha vida. Família Muller representadas hoje pelos meus tios, poucos primos, e seus

respectivos cônjuges. Agradeço o carinho que sempre tiveram comigo, ao apoio incondicional e convivência prazerosa. A família Ávila de Almeida que desde sempre me acolheu em sua casa, “torcendo” por mim e me incentivando sempre. Queridos sogro, sogra e cunhados você não poderiam ficar de fora dessa dedicatória.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, na pessoa de seu diretor Professor Titular Estevão Tomomitsu Kimpara e da vice-diretora Professora Rebeca Di Nicoló.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio à pesquisa (FAPESP: 2016/08633-0) que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

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

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

À minha orientadora Professora Titular Janete Dias Almeida, incansável em suas ideias e projetos. Assistirmos ao seu concurso de Professora Titular nos fez refletir quão especial tem sido sua carreira. Me sinto honrado de poder participar de sua história mais recente. Obrigado pelo seu apoio e incentivo para caminhar sempre mais.

À minha querida coorientadora Professora Doutora Celina Faig Lima Carta, pessoa fundamental em todas as etapas de nossa jornada, sempre nos ajudando de maneira incondicional a qualquer momento, respeitando nossos pontos de vista e sugerindo melhorias. Desejo a você muito sucesso nessa sua nova etapa, talvez a mais doce e sublime de todas, ser mãe.

A professora Doutora Patrícia Pimentel de Barros, pela sua enorme colaboração nas atividades do laboratório de Biologia molecular do ICT/UNESP, incansável na busca pela perfeição. Todo o rigor técnico dos experimentos devo a você e me sinto

absolutamente grato pela sua dedicação. Apesar de tão diferente atividade gostei muito de trabalhar sob sua supervisão.

Ao Professor Doutor Antonio José Gonçalves, por seu apoio desde os tempos de mestrado, e agora como membro da banca. Vejo-o como um agregador de ideias, correntes e opiniões, mas principalmente de pessoas. Acompanho de longe a sua difícil arte de formar. Parabéns pela sua jornada.

Ao professor Doutor César Augusto Cardoso, pelo carinho e amizade desde os tempos de Hospital Municipal. Me sinto honrado de poder contar com sua amizade. Você é uma dessas pessoas que queremos estar por perto trocando experiências e sendo uma referencia na especialidade da região.

Ao professor, doutor, e amigo Luiz Eduardo Blumer Rosa, pelo carinho a amizade que temos a muitos anos. Poder conviver com você nos bancos da faculdade me ensinaram a vê-lo não só como patologista mas como um professor nato. Parabéns pela sua brilhante carreira.

A professora Yasmin Rodarte Carvalho, agradeço também por sua amizade e atenção. Foi uma honra ser seu aluno nesta pós-graduação onde o tempo todo fomos incentivados a ver muito mais do que uma imagem de exame. Uma verdadeira professora.

À Profa. Adj. Ana Lia Anbinder, cuja juventude e vigor vem acrescentar muito ao serviço de patologia, com um ponto de vista sempre pessoal, instigante que nos faz analisar o outro lado, e enxergar novas possibilidades. Com certeza também uma professora nata.

A Professora Estela Kaminagakura Tango, pelo seu carinho e atenção em toda a pós-graduação, seja discutindo casos ou preparando artigos. Agradeço muito o acolhimento.

A Professora Renata Falchete do Prado, com uma enorme competência na

Patologia seja dando aula ou nas discussões em nossas reuniões anátomo clínica. Agradeço muito o incentivo e apoio nesta jornada.

A professora Monica pelo enorme sorriso e acolhimento na pós-graduação.

Ao Prof. Adj. José Benedito Oliveira Amorim, pelo carinho fraterno, apoio e sorriso. Obrigado por nos aceitar tão bem no Instituto e nos incentivar.

A Professora Mônica Ghislaine Oliveira Alves, pelo apoio e atenção neste curto período que convivemos. Outra força jovem para os alunos e orientando, quer seja no ambulatório de propedêutica e nas sugestões e revisões de nosso trabalho.

Ao querido amigo Flávio Peres, de tantos anos, e tantos trabalhos. Retribuo aqui todo o carinho e incentivo que você sempre me deu. Pessoas como você são capazes de melhorar a nossa sociedade. Grande conhecimento e no lugar certo, ajudando inúmeros pacientes a reestabelecer a saúde, quer seja na luta pelo diagnóstico precoce das neoplasias de boca, nas campanhas de prevenção e promoção a saúde.

Prof. Chagas e Beatriz, meus eternos mestres, amigos e gurus. Agradeço sempre o enorme incentivo que sempre tive. Obrigado por ter me ensinado a especialidade e a operar. Me sinto um difusor de seu trabalho. Parabéns pela nobre arte de formação de estagiários e residentes. Me sinto orgulhoso de ter sido aluno de vocês.

Aos amigos da pós-graduação pela amizade e colaboração. Poder fazer parte dos trabalhos junto aos créditos foram momentos de amizade e cooperação. Um abraço especial as Profa. Dra. Noala Vicensoto Moreira Milhan, Profa. Dra. Vivian Narana Ribeiro El Achkar, e a Profa. Dra. Milagros del Valle El Abra Ankha

A minha querida e adotada “Turma 16”. Poder conviver com vocês foi revigorante e rejuvenescedor. Parabéns a todos vocês pela luta diária de trabalhar e estudar. Me sinto orgulhoso de ter podido fazer parte deste grupo.

Ao querido ICT/UNESP. Agradeço a cada um de vocês pelo enorme acolhimento que recebi desde o primeiro dia. A todos os Membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. A competente secretaria da pós-graduação, a maravilhosa equipe da biblioteca, aos especiais funcionários dos departamentos deste Instituto. Digo com orgulho que fiz parte da Unesp e levo comigo todo o carinho de todos. A vocês, o meu MUITO OBRIGADO.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE QUADROS	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 PROPOSIÇÃO	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivo Específico	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Seleção da amostra.....	23
3.1.1 Grupo 1 – CCE	24
3.1.2 Grupo 2 – Controle.....	24
3.2 Avaliação do Grau de Dependência de Nicotina e Perfil Tabágico	24
3.3 Avaliação do consumo de álcool.....	25
3.4 Coleta das amostras	26
3.5 Extração e quantificação do RNA.....	27
3.6 Escolha dos genes estudados	27
3.7 Análise da expressão gênica	27
3.8 Análise estatística	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Amostra	31
4.2 Expressão gênica	34
4.2.1 Expressão de GSTM1.....	34
4.2.2 Expressão de GSTP1	36
4.2.3 Expressão de GSTT1	39
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICES	62
ANEXOS.....	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fluxograma esquemático com os componentes da amostra 31
- Figura 2 – Gráfico da expressão do gene GSTM1 nos quatro grupos avaliados..... 35
- Figura 3 – Expressão gênica individual de GSTM1 em relação à carga tabágica (anos-maço) na amostra de pacientes com CCE bucal 36
- Figura 4 – Gráfico da expressão gênica de GSTP1 nos quatro grupos avaliados.... 37
- Figura 5 – Expressão gênica individual de GSTP1 em relação à carga tabágica (anos-maço) na amostra de pacientes com CCE bucal 38
- Figura 6 – Gráfico da expressão gênica de GSTT1 nos quatro grupos avaliados 39
- Figura 7 – Expressão gênica individual de GSTT1 em relação à carga tabágica (anos-maço) na amostra de pacientes com CCE bucal 41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação do nível de risco do uso do álcool segundo o AUDIT...26	
Quadro 2 – Sequência de <i>primers</i> escolhidos para o estudo.....30	
Quadro 3 – Descrição dos Estágios das amostras de CCE33	
Quadro 4 – Descrição dos valores do teste AUDIT para todos os participantes...34	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição das variáveis e perfil tabágico dos casos de CCE e controles fumantes	32
Tabela 2 – Descrição das variáveis da amostra dos casos de CCE e controles não fumantes	33
Tabela 3 – Valores de correlação linear de Pearson (R) e respectivo p valor entre expressão gênica de GSTM1 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)	35
Tabela 4 – Valores de correlação linear de Pearson (R) e respectivo p valor entre expressão gênica de GSTP1 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)	38
Tabela 5 – Valores de correlação linear de Pearson (R) e respectivo p valor entre expressão gênica de GSTT1 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 Use Disorders identification Test</i>
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CID10	Classificação Internacional de Doença – 10 ^a Revisão
CIF5IX	<i>Cancer Incidence in Five Continents Database</i>
DN	Dependência Nicotínica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Eficiência de Amplificação
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GENCAPO	Genoma no Câncer de Cabeça e Pescoço
GSTs	Glutathione S-Transferases
GSTM1	Glutathione S-Transferase Mu 1
GSTP1	Glutathione S-Transferases pi 1
GSTT1	Glutathione S-Transferases Theta1
HAP	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
HPV	Papilomavírus humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INHANCE	<i>International Head and Neck Cancer Consortium</i>
NAT	N-acetiltransferase
NMTADS	Neoplasia Maligna do Trato Aero Digestivo Superior
OMS	Organização Mundial de Saúde
P450	Citocromo P450
PUC	Pontifícia Universidade Católica
qPCR	<i>Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
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>
UGT	Uridina 5'-difosfatoglucoroniltransferase
UICC	<i>The Union for International Cancer Control</i>
VIGITEL	Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico
WHO	<i>World Health Organization</i>

Bandeira CM. Estudo da expressão gênica dos principais metabolizadores de fase II de xenobióticos: GSTM1, GSTP1 e GSTT1 em carcinoma de células escamosas bucal [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

Tabaco e álcool são considerados os principais fatores de risco para o carcinoma de células escamosas (CCE) bucal contribuindo de maneira desfavorável para o tratamento e desfecho clínico. Seus carcinógenos são metabolizados em duas fases, sendo a segunda fase realizada pelas Glutathione S-transferases (GSTs). O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão gênica da forma selvagem dos genes GSTM1, GSTP1 e GSTT1 por qPCR em 33 amostras de CCE bucal de fumantes, ex-fumantes e não fumantes, e 15 controles em busca de uma correlação clínica com consumo de tabaco, álcool e estadiamento clínico. A dependência nicotínica foi avaliada pelo Teste de Fagerström pra Dependência a Cigarros (TFDC) e para consumo de etílicos o Teste AUDIT. Foi observado aumento da expressão de GSTM1 no Grupo CCE fumante em relação ao Grupo Controle ($p=0,0161$). Contrariamente, foi encontrada uma menor expressão de GSTT1 no Grupo CCE fumante em relação ao Grupo Controle fumante ($p=0,0183$). No grupo CCE fumante não foi encontrada uma correlação entre a expressão dos genes estudados e fatores ligados ao tabagismo, etilismo e estadiamento clínico. No grupo Controle fumante, houve correlação entre teste AUDIT e a expressão de GSTM1 ($p=0,0000$). Para GSTP1 e GSTT1 houve correlação entre a expressão quando comparada a idade do paciente ($p=0,0008$; $p=0,0095$), idade de início do tabagismo ($p=0,0033$; $p=0,0081$), TFDC ($p=0,0102$; $p=0,0085$) e AUDIT ($p=0,0052$; $p=0,0219$) respectivamente. Para GSTT1 foi encontrada uma correlação entre a expressão e número de cigarros/dia ($p=0,0175$). Concluímos que as formas selvagens das GSTs estudadas apresentaram uma alta expressão nas amostras de CCE bucal, entretanto, quantitativamente essa expressão foi baixa, com grande variabilidade interindividual. Outrossim, não houve uma correlação direta entre níveis de expressão, carga tabágica, TFDC, teste AUDIT e estadiamento clínico. O aumento da expressão de GSTM1 e GSTP1 parece não ter tido um efeito protetor. A baixa expressão de GSTT1 em pacientes fumantes com CCE bucal se mostrou um potencial marcador a ser avaliado em pacientes fumantes que ainda não desenvolveram uma neoplasia maligna.

Palavras-chave: Neoplasias bucais. Mucosa bucal. Carcinogênese. Carcinoma de células escamosas. Expressão gênica. Xenobióticos.

Bandeira CM. Study of the gene expression of the main xenobiotic phase II metabolizers: GSTM1, GSTP1 and GSTT1 in squamous cell carcinoma of the oral cavity [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

Tobacco and alcohol are considered to be the main risk factors for oral squamous cell carcinoma (SCC), contributing to treatment and clinical outcome. Its carcinogens are metabolized in two phases, being the second phase carried out by Glutathione S-transferases (GSTs). The objective of the present study was to evaluate the wild-type gene expression of the GSTM1, GSTP1 and GSTT1 genes by qPCR in 33 samples of oral SCC from smokers, former smokers and nonsmokers, and 15 controls looking for a clinical correlation with tobacco and alcohol consumption and clinical staging. Nicotinic dependence was assessed by the Fagerström Test for Cigarette Dependence (FTCD) and alcohol consumption by the AUDIT Test. Increased expression of GSTM1 in the Smoker SCC Group was observed in relation to the Control Group ($p=0.0161$). Conversely, a lower expression of GSTT1 was found in the smoker SCC group compared to the Smoker Control Group ($p=0.0183$). In the smoker SCC group, no correlation was found between the genes expression studied and factors related to smoking, alcoholism and clinical staging. In the Smoker Control Group, there was a correlation between the AUDIT test and the GSTM1 expression ($p=0.0000$). For GSTP1 and GSTT1, there was a correlation between the expression compared with the patient's age ($p=0.0008$, $p=0.0095$), age of starting smoking ($p=0.0033$, $p=0.0081$), FTCD ($p=0.0102$, $p=0.0085$) and AUDIT ($p=0.0052$, $p=0.0219$) respectively. For GSTT1 a correlation was found between expression and number of cigarettes/day ($p=0.0175$). We concluded that the wild forms of the GSTs studied presented a high expression in the samples of oral SCC; however, quantitatively this expression was low, with great interindividual variability. Also, there was no direct correlation between levels of expression, pack-years, FTCD, AUDIT Test and clinical stage. Increased expression of GSTM1 and GSTP1 appears to have had no protective effect. The low GSTT1 expression in smokers with oral SCC was shown to be a potential marker to be evaluated in smoker patients who have not yet developed a malignant neoplasm.

Keywords: Mouth neoplasms. Buccal mucosa. Carcinogenesis. Gene expression. Squamous cell carcinoma. Xenobiotics.

1 INTRODUÇÃO

Câncer atualmente é um dos principais desafios de saúde pública no mundo. Nos países desenvolvidos está relacionado ao nível sócio cultural mais alto e populações com maior longevidade, embora suas maiores consequências em termos de morbimortalidade, seja em populações de baixa renda e principalmente de países em desenvolvimento (World Health Organization, 2015a).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimaram para o ano de 2012 que 57% de todos os casos de câncer ocorreriam no continente Africano, Ásia e Américas Central e do Sul, e seriam responsáveis por mais de 70% das mortes por câncer no mundo. Para as próximas duas décadas é esperado aumento de 70% no número de casos diagnosticados (World Health Organization, 2015a).

As neoplasias malignas da boca e faringe ocupam a sexta posição mundial para homens e mulheres, mostrando grandes variações de acordo com diferentes regiões do planeta. É altamente incidente em países como Papua-Nova Guiné, Bangladesh, Hungria e Sri Lanka (Johnson, 2001; Wunsch-Filho, 2002; Wunsch-Filho et al., 2010).

O carcinoma de células escamosas (CCE) é a neoplasia maligna mais frequente da região de cabeça e pescoço, com cerca de 90% de todos os casos de neoplasias malignas do trato aero digestivo superior (NMTADS) (Curado, Hashibe, 2009a; World Health Organization, 2005, 2015a).

Segundo dados da OMS em publicação do *Cancer Incidence in Five Continents Database* (CIF5IX), a cidade de São Paulo tem um dos maiores índices de carcinoma de boca no mundo e está entre as cinco cidades com maior incidência (Curado, Hashibe, 2009a; Curado et al., 2009b).

Ao considerar o sexo, o câncer de boca tem uma estimativa de incidência média de cerca de onze casos novos por 100.000 habitantes/ano em homens e três casos novos por 100.000 habitantes/ano entre as mulheres, para o próximo biênio. Em números absolutos tem ocupado a quinta e a décima segunda colocação respectivamente na população brasileira (Instituto Nacional do Câncer, 2018).

Anteriormente às técnicas de biologia molecular para o estudo das neoplasias malignas da região de cabeça e pescoço, dentre eles o projeto

GENOMA* e projeto GENCAPO**, a avaliação de prognóstico se baseava na classificação TNM da *Union for International Cancer Control* (UICC) em associação com a *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (World Health Organization, 2004). Atualmente tal classificação encontra-se em sua oitava edição cuja principal modificação para os tumores bucais foi a inclusão do parâmetro de profundidade da lesão à classificação do tamanho tumoral (T). Já 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).

Esta mesma atualização já considera fatores moleculares, entre eles, a identificação do papiloma vírus humano (HPV) como critério prognóstico para os tumores de orofaringe (Huang, O'Sullivan, 2017).

Estima-se que haja em todo mundo cerca de 1,5 bilhão de fumantes, ou seja, um terço da população mundial utiliza algum tipo de tabaco (Glynn et al., 2010; World Health Organization, 2015a).

O uso abusivo de tabaco e seus derivados é isoladamente a principal causa de câncer no mundo sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde uma doença. Consta na Classificação Internacional de Doença e problemas relacionados à saúde em sua décima revisão com o CID10-F17 (Wunsch-Filho et al., 2010; World Health Organization, 2015b).

O etilismo é um fator de risco associado ao processo de carcinogênese no desenvolvimento das neoplasias malignas do trato aero digestivo superior (NMTADS). Estudos evidenciam risco aumentado de câncer nos indivíduos etilistas quando comparados aos não etilistas (Hashibe et al., 2009).

O uso abusivo de álcool também é considerado uma doença, e consta na Classificação Internacional de Doenças e problemas relacionados a saúde como CID10-F10 (World Health Organization, 2015b).

O consumo excessivo e diário de cachaça e outras bebidas alcoólicas aumentam o risco de câncer de boca. Observa-se uma relação direta entre dose e efeito, de acordo com quantidade de ingestão, tempo de duração, e consumo cumulativo de álcool (Franco et al., 1989; Szymanska et al., 2011).

Levando em consideração diversos sítios de comprometimento pelas NMTADS, indivíduos etilistas têm um aumento do risco de desenvolvimento de câncer de quatro a cinco vezes para câncer de boca e orofaringe. Nesses pacientes

podemos observar um efeito somatório dos riscos, pois mais de 50% apresenta hábito de etilismo e tabagismo associados (Szymanska et al., 2011).

O tabaco, em suas diversas formas de consumo, aliado ao álcool são os maiores fatores de risco das NMTADS. Em relação à boca o uso simultâneo aumenta em até 15 vezes o risco de câncer (Dobrossy, 2005; Gandini et al., 2008 Hashibe et al., 2009; Petti, 2009; Marron et al., 2010; Szymanska et al., 2011).

Apesar desses diferentes fatores exógenos, bem como de seu grau variável de exposição, podemos observar que nem todos os indivíduos com esse perfil de fato irão desenvolver uma neoplasia maligna bucal. E para tentar explicar um pouco mais, características genéticas individuais têm sido os principais objetos de pesquisa, inicialmente com estudos de polimorfismos, expressão gênica, mutação genética, e mais recentemente fatores epigenéticos.

Os xenobióticos são compostos químicos exógenos ao organismo classificados em diversos tipos tais como: substratos químicos oriundos de defensivos agrícolas, conservantes, produtos de limpeza e fármacos, além de drogas como tabaco e álcool, os quais são utilizados frequentemente pelas diferentes sociedades (Masood et al., 2011a).

Durante o processo de combustão do cigarro milhares de compostos químicos são liberados na fumaça fazendo com que os fumantes recebam uma mistura altamente tóxica de substâncias como benzopirenos e outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), nitrosaminas tabaco específicas derivadas da nicotina e seus metabólitos, benzeno, formaldeídos, monóxido de carbono, cianetos, acroleína e polônio (World Health Organization, 2014).

Tais compostos são metabolizados e detoxificados em duas fases. Na fase I, tais carcinógenos são modificados e se solubilizam em água e são excretados, ou ainda se tornam mais eletrofílicos para reagirem na próxima fase pelas enzimas de fase II. Geralmente esta fase inicial é feita pelas enzimas da família Citocromo P450 (Masood et al., 2011b).

Em continuidade a este processo, as enzimas de fase II, como as Glutathione S-transferases (GSTs), são responsáveis pela transformação dos metabólitos eletrofílicos provenientes da fase I, ou de xenobióticos diretamente, em compostos inativos facilmente excretados pelo organismo (Gattás et al., 2006). Além disso, outras famílias de enzimas são importantes nesse processo de ativação e

detoxificação dos carcinógenos do tabaco como as substâncias Uridina 5'-difosfatoglucoroniltransferase (UGTs), *N*-Acetiltransferases (NATs) entre outras (United States Department of Health and Human Services, 2010).

Oito classes de GSTs foram encontradas em mamíferos, sendo que, ao menos 16 subunidades são encontradas na espécie humana, porém somente quatro têm sido bem caracterizadas como catalizadoras da conjugação da glutathione nos carcinógenos do tabaco (Sheehan et al., 2001).

São elas: GSTA1* (*alpha*), GSTM1** (*mu*), GSTP1*** (*pi*) e GSTT1**** (*theta*). Além disso, no processo de síntese dessas proteínas pelos seus respectivos genes uma significativa variação, ou seja expressão, pode ocorrer de indivíduo para indivíduo, bem como de tecido para tecido em um mesmo organismo (Rowe et al., 1997; Sherratt et al., 1997; Mulder et al., 1999).

As enzimas GSTM1, GSTP1 e GSTT1 são as principais responsáveis pela metabolização dos carcinógenos encontrados no tabaco, tais como nitrosaminas tabaco específicas, benzopirenos, HAP entre outros (Gattás et al., 2006).

Nos últimos dez anos muita ênfase tem sido dada às enzimas de metabolização de carcinógenos em sua fase I e II. Desta forma, a diminuição de atividade da enzima GSTM1, isoladamente ou em associação a outros genes polimórficos de fase I, tem sido considerada como fator de risco para o CCE bucal de indivíduos de etnia Pashtun dependentes do tabaco (Ali et al., 2017).

A diminuição das atividades enzimáticas de GSTM1 e GSTT1 confirma um maior risco para desenvolvimento do CCE bucal, justamente pela não conjugação da glutathione aos carcinógenos do tabaco que impediriam a excreção dos mesmos, predispondo ao desenvolvimento desta neoplasia (Dong et al., 2017).

Em estudo de pacientes do país Basco, foi observado que a diminuição acentuada e até a total ausência de expressão do gene GSTT1 era associado a uma maior carga tabágica (Bediaga et al., 2015).

Em estudo realizado na Índia com três grupos de indivíduos, sendo um grupo sem lesão, outro grupo com leucoplasia e o terceiro com CCE bucal, foi observado que a falta de atividade de GSTM1 tornaria a mucosa bucal mais susceptível à ação de carcinógenos do tabaco e ao desenvolvimento de um alto

*<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2938>; **<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2944>; ***<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2950>; ****<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2952>
Disponível em: National Center for Biotechnology Information

grau de displasia em leucoplasia e que, assim aumentaria a susceptibilidade de transformação maligna desta desordem (Tanwar et al., 2015).

As GSTs têm sido amplamente observadas em tecidos normais, sendo que a atividade enzimática superexpressa de GSTP1 tem sido observada em vários tipos de CCE, dentre eles os de cabeça e pescoço. Essa alta expressão em tecidos tumorais parece ter relação com o grau de inflamação e influencia diretamente no resultado clínico dos tratamentos anti-neoplásicos pela resistência a determinadas drogas anticancerígenas. Pacientes com baixa expressão de GSTP1 mostraram um melhor prognóstico em comparação aos pacientes que tiveram uma expressão mais alta (Yamamoto et al., 2013). Esse achado também foi relatado em estudo brasileiro sobre expressão gênica de GSTP1 em pacientes com neoplasias malignas mostrando que o aumento da expressão pode influenciar na piora do prognóstico dos pacientes principalmente relacionado a metabolização de alguns quimioterápicos (Soares et al., 2017).

Em relação à expressão gênica do GSTP1 foi observado um aumento do risco de CCE de esôfago significativamente associado à redução de sua expressão (Liu et al., 2012). A baixa expressão de GSTP1 também pode estar relacionada ao baixo grau de diferenciação tumoral. Por este motivo esse gene pode ser um candidato a gene supressor tumoral, uma vez que pode o mesmo exercer influência sobre a proliferação celular, apoptose e outras alterações bioquímicas e metabólicas durante o processo de carcinogênese (Ma et al., 2015).

Considerando que o CCE é uma doença multifatorial verifica-se a oportunidade de avaliar a expressão gênica das enzimas GSTs de fase II de metabolização de xenobióticos e correlacionar com alguns dados epidemiológicos como o consumo de tabaco, álcool, além de outros fatores como estadiamento clínico.

O estudo sobre a expressão desses genes em pacientes portadores de CCE bucal poderá ainda estabelecer alguns critérios de prognóstico e a obtenção de algum marcador tumoral que possibilite monitoramento de desordens com maior propensão á transformação maligna.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a expressão gênica dos genes GSTM1, GSTP1 e GSTT1 metabolizadores dos xenobióticos de fase II, pelo método de qPCR em carcinoma de células escamosas bucal.

2.2 Objetivo Específico

Estabelecer uma correlação clínica entre o perfil de consumo dos principais fatores de risco, como idade de início e tempo de uso do tabaco, carga tabágica, Teste de Fagerström para Dependência a cigarros, AUDIT e estadiamento e a expressão gênica das GSTs no processo de detoxificação dos carcinógenos, em busca de possíveis marcadores tumorais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética (ANEXO A) protocolo nº 1.033.312/2015 PH/CEP e recebeu auxílio pesquisa FAPESP: 2016/08633-0.

Trata-se de estudo caso-controle realizado no período de fevereiro de 2015 a fevereiro de 2018, realizado no Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT-UNESP), junto ao Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, nas disciplinas de Propedêutica Estomatológica, Laboratório de Patologia Bucal e Microbiologia e Imunologia.

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 inclusão: Pacientes acima de 18 anos com diagnóstico de CCE fumantes, ex-fumantes e não fumantes. Os 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 de pacientes consecutivos que deram entrada para diagnóstico e tratamento nos serviços 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 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 de pacientes consecutivos pareados por idade, sexo, carga tabágica e exposição ao álcool aos pacientes do Grupo CCE, que apresentaram algum tipo de lesão cirúrgica benigna bucal e que foram submetidas à biópsia excisional, atendidos no ambulatório da Disciplina de Propedêutica Estomatológica do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciências e Tecnologia (ICT-UNESP) e 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/SP.

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 dependência nicotínica foi realizada por meio do Teste de

Fagerström para Dependência a Cigarros (TFDC), que é composto por seis questões pontuadas segundo as respostas. De acordo com a pontuação obtida, os pacientes foram alocados em cinco categorias em relação à dependência nicotínica: 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 B).

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, ou seja, a quantificação de quanto o indivíduo fumou até a presente data, foi feita com o cálculo de anos-maço (*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).

Em relação ao consumo de tabaco foram consideradas as seguintes definições:

- Fumantes ou tabagistas ativos: 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 (Reichert et al., 2008).

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 dentro do Grupo fumante.

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 Teste de AUDIT (ANEXO B) (Moretti-Pires, Corradi-Webster, 2011).

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).

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) Coleta de um fragmento de 0,5 x 0,5 x 0,5 cm da lesão de pacientes com CCE bucal, durante a cirurgia de biópsia incisional da lesão ou de seu tratamento cirúrgico;
- b) Nos casos de pacientes dos grupos controle submetidos a algum tipo de biópsia de lesão benigna, foi utilizada borda de tecido sadio ao redor da mesma com as dimensões especificadas.

As amostras foram armazenadas em 0,5 ml da solução *Allprotect tissue reagent* (Qiagen, CA. USA) *overnight* em frasco *Eppendorff* a temperatura de 4°C, e após este período a -80°C. Toda a parte experimental foi realizada no laboratório de Microbiologia e Imunologia do ICT-UNESP.

3.5 Extração e quantificação do RNA

Foi realizada a extração de RNA de uma amostra de tecido (fígado), que usualmente expressa os genes alvos, para utilização na avaliação das curvas de eficiência dos *primers*. Todas as amostras foram avaliadas 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 pureza, que indica a qualidade do RNA, foi analisada por meio das proporções A260/A280 e A260/A230, sendo que em relação à proporção A260/A280 valores obtidos estavam entre 1,8 e 2,0 e para A260/A230 valores próximos de 1,2.

3.6 Escolha dos genes estudados

O gene que codifica as enzimas da família Glutathione S-transferases são altamente polimórficas, variando sua prevalência entre as diversas populações. Devido a grande miscigenação entre os três principais grupos étnicos responsáveis pela colonização brasileira (europeus, índios e africanos) a prevalência destes polimorfismos é baixa em nosso país.

Por este motivo optamos pela escolha de genes selvagens os quais se apresentam mais prevalentes (da Fonte de Amorim et al., 2002; Rossini et al., 2002, 2007; Ribeiro Pinto et al., 2003)

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 livre de nuclease 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 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 (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), e TUBA1c (*Tubulin Alpha 1c*), mas ao final foi selecionado o TUBA1c 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 $2^{-\Delta\Delta CT}$ em comparação ao gene de referência, previamente selecionado, e que resulta em valor 1 (Livak, Schmittgen, 2001).

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 µL de *Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG*, 1 µL de ROX (corante de referência), 0,5 µL de *primer forward*, 0,5 µL de *primer reverse*, 4µL de cDNA diluído (1:5) e água livre de *RNAase/DNAase* para atingir o volume final de 25 µL; 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 na quadro 2.

Foram realizados testes de eficiência dos *primers* (Bustin et al., 2009) e padronização da quantidade de cDNA, concentração e temperatura de anelamento. Todos os *primers* designados para o experimento apresentaram uma eficiência entre 95 e 154%.

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

Genes	Nome do oligonucleotídeo	Sequência dos <i>primers</i>	
		<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
Genes estudados	GSTM1	ACTTGATTGATGGGGCTCAC	ATGGTTGTCCATGGTCTGGT
	GSTT1	GTTGCTCGAGGACAAGTTCC	ATCAGCTCCGTGATGGCTAC
	GSTP1	CAGGTGTCAGGTGAGCTCTG	ATGACCCGTTACTTGGCTGG
Genes de referência	ACTB	CCAACCGCGAGAAGATGAC	GCCGATCCACACGGAGTACT
	TUBA1c	CCGGGCAGTGTTTGTAGACT	TTGCCTGTGATGAGTTGCTC
	GAPDH	CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC	TTGACTCCGACCTTCACCTT

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.8 Análise estatística

Todos os resultados foram correlacionados com os dados clínicos, com os de consumo de tabaco, uso de álcool e estágio da doença. A comparação da expressão gênica entre os grupos foi realizada pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.

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

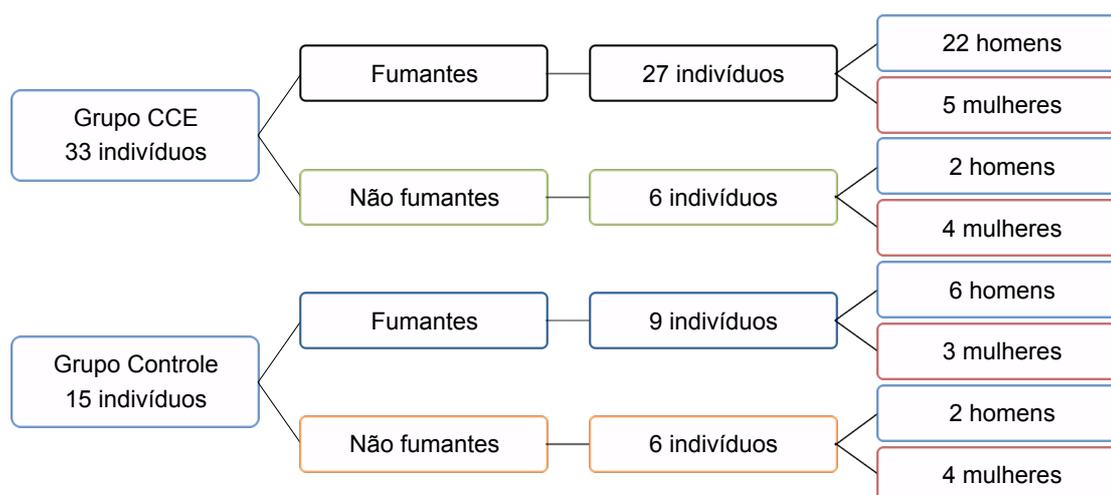
Em todos os testes foi adotado nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Amostra

Ao todo foram coletadas 60 amostras (37 de CCE e 23 de controle). Contudo foram excluídas das análises 4 amostras de CCE e 8 de controle, pois não apresentaram quantidade suficiente de RNA extraído para realização do qPCR durante os testes laboratoriais. O estudo foi composto por 48 amostras, sendo 29 amostras de homens e 19 de mulheres, divididos em dois grupos: CCE e Controle (Figura 1).

Figura 1 – Fluxograma esquemático com os componentes da amostra



Fonte: Elaborada pelo autor.

Dentre os fumantes casos e controles, foi observada que boa parte dos indivíduos começou a fumar por volta da infância e adolescência. Apresentaram uma grande quantidade de cigarros fumados diariamente, a maioria com um tempo de uso acima de trinta anos, e uma carga tabágica elevada. De acordo com Teste de Fagerström para dependência ao cigarro, foi observada uma dependência elevada em ambos os grupos, bem como um padrão de consumo de risco segundo AUDIT. Considerando o estágio da doença por ocasião da coleta de material para

diagnóstico, tratamento e pesquisa, 21 (63,63%) pacientes portadores de CCE estavam em fase avançada da doença nos estágios III e IV (Tabela 1). As variáveis demográficas e de perfil tabágico dos 36 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	27	9
Sexo		
- Homens	22	6
- Mulheres	5	3
Idade, anos	59,4 ± 13,2	54,6 ± 11,2
- Homens	59,0 ± 11,0 (39 – 82)	55,8 ± 9,8 (37 – 65)
- Mulheres	61,4 ± 22,1 (28 – 88)	52,0 ± 15,7 (34 – 63)
Início uso do tabaco, anos	17,3 ± 6,9	15,9 ± 5,4
- Homens	16,7 ± 6,5 (5 – 31)	14,5 ± 2,8 (9 -16)
- Mulheres	20 ± 8,8 (9 – 30)	18,7 ± 9,0 (13 – 29)
Tempo de uso, anos	38,4 ± 16,6	34,2 ± 9,7
- Homens	40,6 ± 15,5 (16 – 70)	37,5 ± 9,7 (21 – 48)
- Mulheres	28,8 ± 19,6 (7 – 57)	27,7 ± 6,8 (20 – 33)
Quantidade de cigarros fumados/dia	23,8 ± 9,4	31,1 ± 20,1
- Homens	25,9 ± 8,5 (10 – 40)	38,3 ± 17,2 (20 – 60)
- Mulheres	14,6 ± 7,8 (3 – 20)	16,7 ± 20,2 (4 – 40)
Carga tabágica, anos-maço	45,5 ± 27,5	57,7 ± 41,9
- Homens	51,6 ± 26,2 (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	19 indivíduos	7 indivíduos
- Homens	17	5
- Mulheres	2	2
Teste de Fagerström, pontos	5,2 ± 2,2	5,5 ± 2,3
- Homens	5,6 ± 1,8	5,5 ± 2,1
Baixa a moderada (0 – 5)	10	3
Elevada a muito elevada (6 – 10)	12	3
- Mulheres	3,6 ± 2,8	3,0 ± 2,0
Baixa a moderada (0 – 5)	3	3
Elevada a muito elevada (6 – 10)	2	0

Fonte: Elaborada 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 e controles não fumantes

Variáveis	Grupo CCE não fumante	Grupo Controle não fumante
Sexo	6	6
Homens	2	2
Mulheres	4	4
Idade (anos)	52,5 ± 17,2	46 ± 9,8
Homens	72 ± 12,7	55,5 ± 2,1
Mulheres	42,8 ± 7,8	41,3 ± 8,3

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os grupos CCE a classificação segundo o sistema TNM está descrita no quadro 3.

Quadro 3 – Descrição dos Estágios das amostras de CCE

Grupos	Estágio	Homens	Mulheres	Total
CCE fumante	I	1 (4,50%)	0	1 (3,70%)
	II	4 (18,18%)	2 (40,00%)	6 (22,22%)
	III	5 (22,72%)	1 (20,00%)	6 (22,22%)
	IV	12 (54,54%)	2 (40,00%)	14 (51,85%)
Total		22 (100,00%)	5 (100,00%)	27 (100%)
CCE não fumante	I	1 (50,00%)	0	1 (16,66%)
	II	0	4 (100,00%)	4 (66,66%)
	III	0	0	0
	IV	1 (50,00%)	0	1 (16,66%)
Total		2 (100,00%)	4 (100,00%)	6 (100%)

Fonte: Elaborado pelo autor.

A classificação segundo AUDIT pode ser observada no quadro 4.

Quadro 4 – Descrição dos valores do teste AUDIT para todos os participantes

AUDIT, pontos	Grupo CCE fumante	Grupo Controle fumante	Grupo CCE não fumante	Grupo Controle não fumante
n	27 (100,00%)	9 (100,00%)	6 (100,00%)	6 (100,00%)
Homens	22 (81,48%)	6 (66,66%)	2 (33,33%)	2 (33,33%)
Não faz uso	-	3 (50,00%)	-	1 (50,00%)
Baixo risco	3 (13,63%)	1 (16,66%)	2 (100,00%)	1 (50,00%)
Consumo de risco	13 (59,09%)	1 (16,66%)	-	-
Alto risco	4 (18,18%)	1 (16,66%)	-	-
Provável dependência	2 (9,09%)	-	-	-
Mulheres	5 (18,51%)	3 (33,33%)	4 (66,66%)	4 (66,66%)
Não faz uso	-	1 (33,33%)	2 (50,00%)	3 (75,00%)
Baixo risco	3 (60,00%)	1 (33,33%)	2 (50,00%)	1 (25,00%)
Consumo de risco	1 (20,00%)	1 (33,33%)	-	-
Alto risco	1 (20,00%)	-	-	-
Provável dependência	-	-	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Expressão gênica

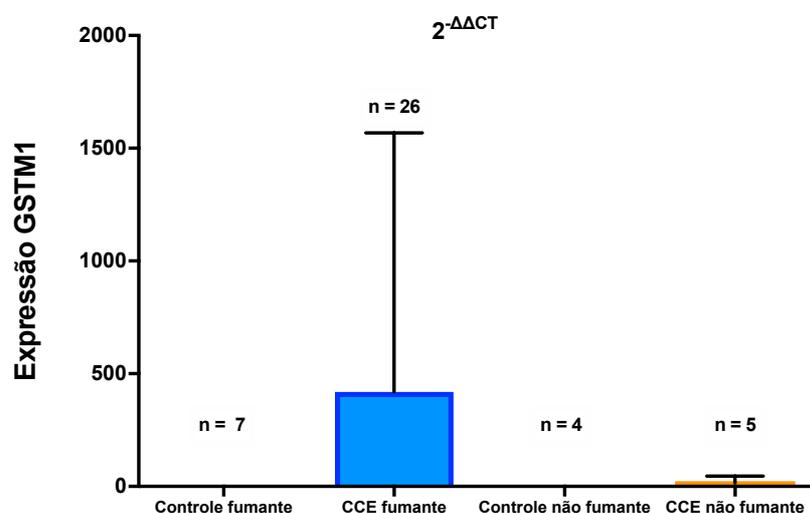
A avaliação da expressão gênica foi realizada para os genes: GSTM1, GSTP1 e GSTT1.

4.2.1 Expressão de GSTM1

Nas amostras de 33 pacientes com CCE houve expressão para GSTM1 em 31(94%). Os resultados de expressão gênica indicaram um aumento da expressão no Grupo CCE fumante quando comparados com o Grupo Controle fumante de acordo com Teste de Mann-Whitney ($p=0,0161$).

O mesmo não ocorreu para o Grupo CCE não fumante quando comparado ao Grupo Controle não fumante, como pode ser observado na figura 2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos avaliados de acordo com teste de Kruskal-Wallis ($p=0,0957$).

Figura 2 – Gráfico da expressão do gene GSTM1 nos quatro grupos avaliados



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 – Valores de correlação linear de Pearson (R) e respectivo p valor entre expressão gênica de GSTM1 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)

GSTM1 Nível de Expressão	Idade	Número de cigarros/ dia	Início tabagismo	Tempo de uso	Carga tabágica	Fagerström	AUDIT	Estágio	
CCE fumante n=26	-0,0569	-0,0741	-0,0343	-0,1483	-0,1232	0,1478	0,2470	-0,1645	*
	0,7824	0,7190	0,8678	0,4696	0,5488	0,4711	0,2237	0,4221	#
CCE não fumante n=5	-0,8000	**	**	**	**	**	**	-0,3162	*
	0,1333	**	**	**	**	**	-0,7906	0,5333	#
Controle fumante n=7	-0,0082	0,0449	-0,5224	0,3123	-0,0237	-0,3752	-0,6018	**	*
	0,9682	0,8276	-0,5224	0,1203	0,9084	0,0589	0,0000	**	#
Controle não fumante n=4	0,0526	**	**	**	**	**	**	**	*
	0,9333	**	**	**	**	**	**	**	#

*Coeficiente de correlação de Spearman; # p-valor; ** Não realizado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

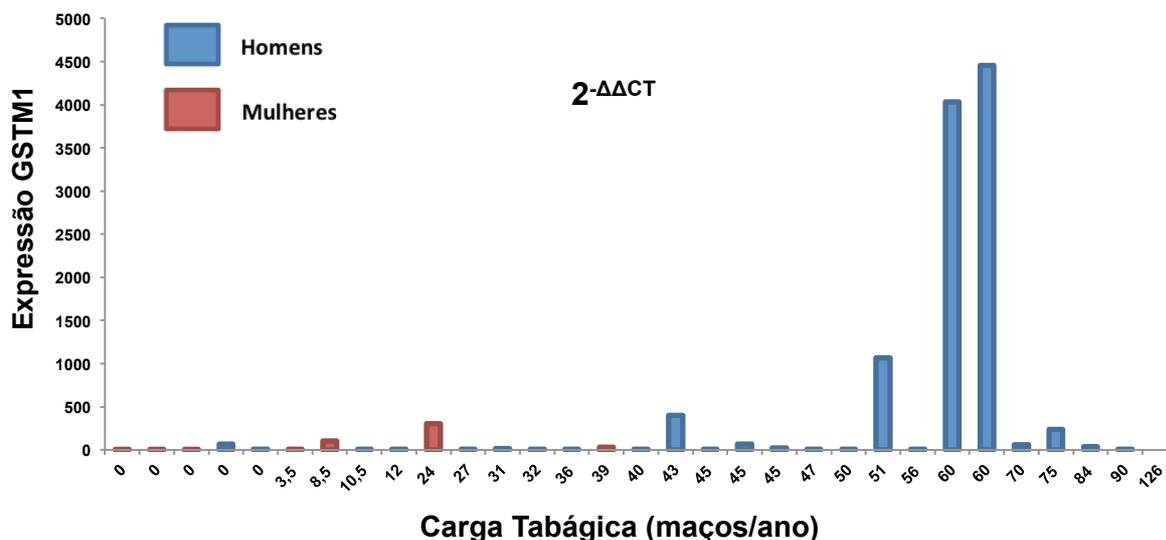
A correlação de Spearman foi realizada entre a expressão gênica de GSTM1 nos quatro grupos avaliados comparados com idade, número de cigarros fumados ao dia, início do tabagismo, tempo de uso de cigarros, carga tabágica, Teste de

Fagerström, AUDIT e estágio da doença. Houve correlação entre o AUDIT e a expressão no Grupo Controle fumante, porém inversa, ou seja, quanto maior AUDIT, menor a expressão de GSTM1 ($p=0,0000$) (Tabela 3).

Foi avaliada a expressão gênica individual de GSTM1 em relação à carga tabágica para o Grupo CCE fumante. Não houve uma relação direta entre a carga tabágica e a expressão mostrando uma distribuição aleatória entre os diversos níveis de exposição de carga tabágica.

Em cinco amostras de indivíduos não tabagistas houve a expressão de GSTM1. Também não foi observada relação com o sexo. A expressão gênica individual de GSTM1 em relação à carga tabágica está ilustrada na figura 3.

Figura 3 – Expressão gênica individual de GSTM1 em relação à carga tabágica (anos-maço) na amostra de pacientes com CCE bucal



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2 Expressão de GSTP1

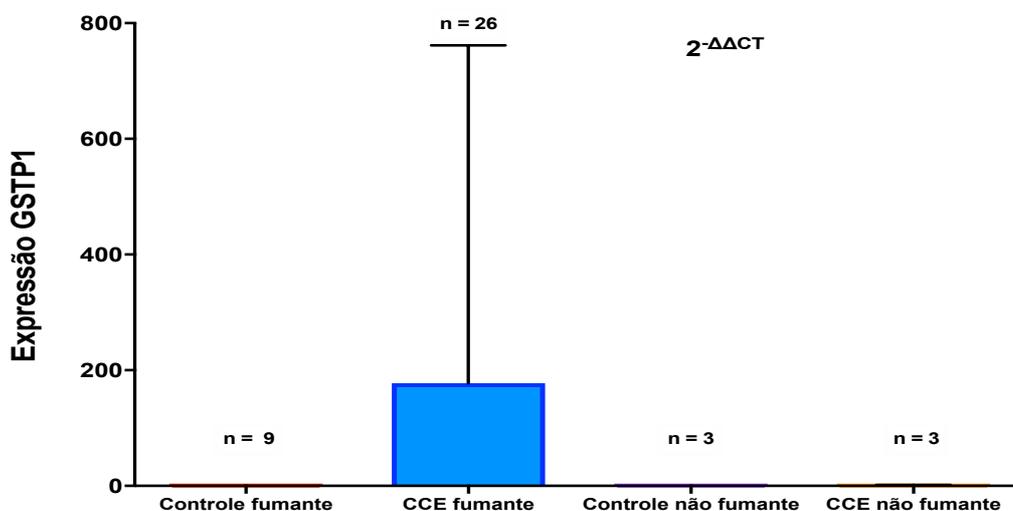
Vinte e nove amostras de pacientes com CCE (88%) expressaram GSTP1. Na comparação entre os Grupos CCE fumante e Controle fumante com o grau de

expressão gênica não foi observada diferença estatisticamente significativa pelo Teste de Mann-Whitney ($p=0,4890$). Da mesma forma, não encontramos resultados significativos quando comparamos a expressão gênica nos Grupos CCE e Controle não fumantes ($p=0,4000$).

Foi observado aumento da expressão do gene GSTP1 do Grupo CCE fumante em relação aos demais grupos, como pode ser observado na figura 4, porém, esta relação não foi estatisticamente significativa.

Não foi constatada diferença na expressão do gene GSTP1 entre os Grupos CCE fumante e não fumante, segundo o Teste de Mann-Whitney ($p=0,8194$). Quando os quatro grupos foram comparados entre si, não houve diferença estatisticamente significativa pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p=0,8016$).

Figura 4 – Gráfico da expressão gênica de GSTP1 nos quatro grupos avaliados



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na análise do teste de Spearman não houve correlação significativa entre a expressão do gene GSTP1 e os parâmetros de tabagismo e etilismo para o Grupo CCE fumante. No entanto, os indivíduos do Grupo Controle fumante exibiram uma correlação significativa entre os níveis de expressão gênica com a idade ($p=0,0008$), idade de início do tabagismo ($p=0,0033$), Teste de Fagerström ($p=0,0102$) e AUDIT ($p=0,0052$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de correlação linear de Pearson (R) e respectivo p valor entre expressão gênica de GSTP1 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)

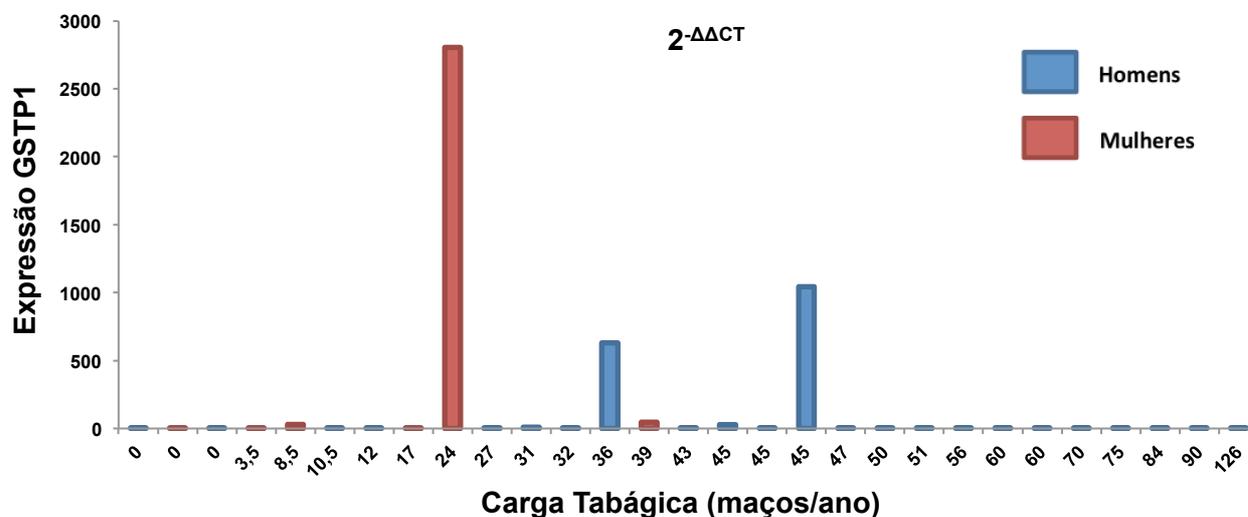
GSTP1 Nível de Expressão	Idade	Número de cigarros/ dia	Início tabagismo	Tempo de uso	Carga tabágica	Fagerström	AUDIT	Estágio	
CCE fumante n=26	-0,0528	-0,0054	-0,1332	0,2062	0,1509	0,3249	-0,0130	0,0230	*
CCE não fumante n=3	0,7978	0,9792	0,5166	0,3123	0,4618	0,1053	0,9496	0,9113	#
Controle fumante n=9	0,5000	**	**	**	**	**	0,8660	-0,8660	*
Controle não fumante n=3	1,0000	**	**	**	**	**	0,6667	0,0000	#
	0,6181	-0,3105	0,5549	0,1609	-0,1786	-0,5039	-0,5435		*
	0,0008	0,1227	0,0033	0,4325	0,3826	0,0102	0,0052		#
	1,0000	**	**	**	**	**	**	**	*
	0,3333	**	**	**	**	**	**	**	#

*Coeficiente de correlação de Spearman; # p-valor; ** Não realizado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A expressão gênica individual de GSTP1 em relação à carga tabágica está ilustrada na figura 5.

Figura 5 – Expressão gênica individual de GSTP1 em relação à carga tabágica (anos-maço) na amostra de pacientes com CCE bucal



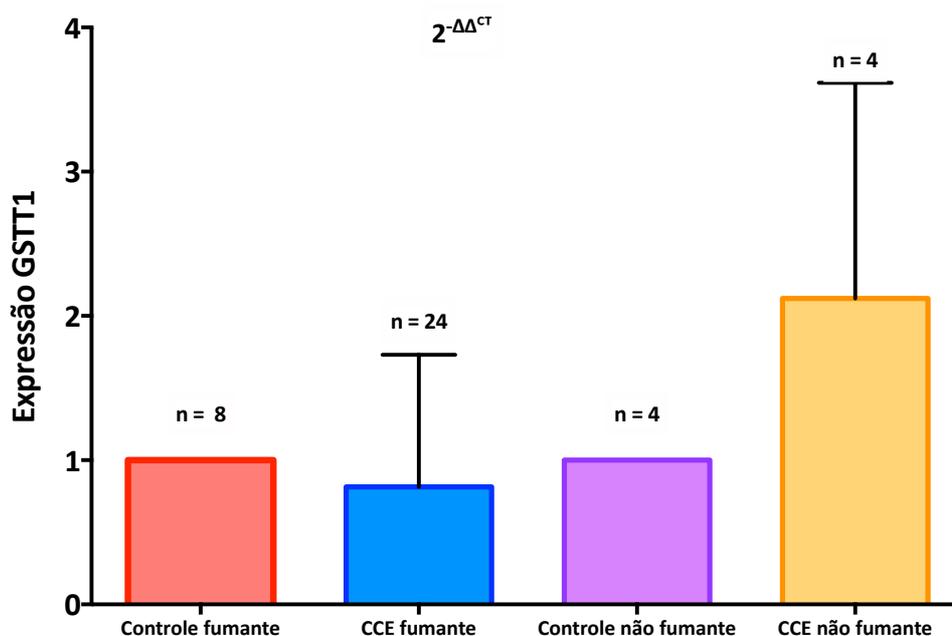
Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi avaliada a expressão gênica individual de GSTP1 em relação à carga tabágica para os grupos CCE fumante e não fumante. Não foi observada uma relação entre o nível de expressão e a carga tabágica, mostrando ter havido uma baixa expressão quantitativa e aleatória. Também não foi observada uma relação entre expressão gênica individual e o sexo (Figura 5).

4.2.3 Expressão de GSTT1

Os resultados de expressão gênica indicaram que o gene GSTT1 foi expresso em (85%) das amostras dos pacientes com CCE, sendo 24 fumantes e 4 não fumantes. Ao se comparar os quatro grupos avaliados em relação ao nível de expressão de GSTT1, foi observado uma diferença estatisticamente significativa pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p=0,0236$), ilustrada na figura 6.

Figura 6 – Gráfico da expressão gênica de GSTT1 nos quatro grupos avaliados



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na comparação da expressão de GSTT1 entre os Grupos CCE fumante e Controle fumante foi observado que no grupo com câncer houve uma menor expressão quando comparado ao Grupo Controle fumante e que essa diferença foi estatisticamente significativa através do Teste de Mann-Whitney ($p=0,0183$). Porém, os níveis de expressão entre os Grupos CCE não fumante e controle não fumante, não apresentou significância ($p=0,4571$). Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos CCE fumante e CCE não fumante ($p=0,6418$), ambos pelo Teste de Mann-Whitney.

A análise da correlação entre o nível de expressão de GSTT1 e fatores ligados ao tabagismo, etilismo e estadiamento, não foi observada correlação significativa no Grupo CCE fumante.

Tal correlação foi observada no Grupo Controle fumante e foi estatisticamente significativa entre o nível de expressão gênica e idade dos pacientes ($p=0,0095$), número de cigarros fumados ao dia ($p=0,0175$), início do tabagismo ($p=0,0081$), Teste de Fagerström ($p=0,0085$), AUDIT ($p=0,0219$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores de correlação linear de Pearson (R) e respectivo p valor entre expressão gênica de GSTT1 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)

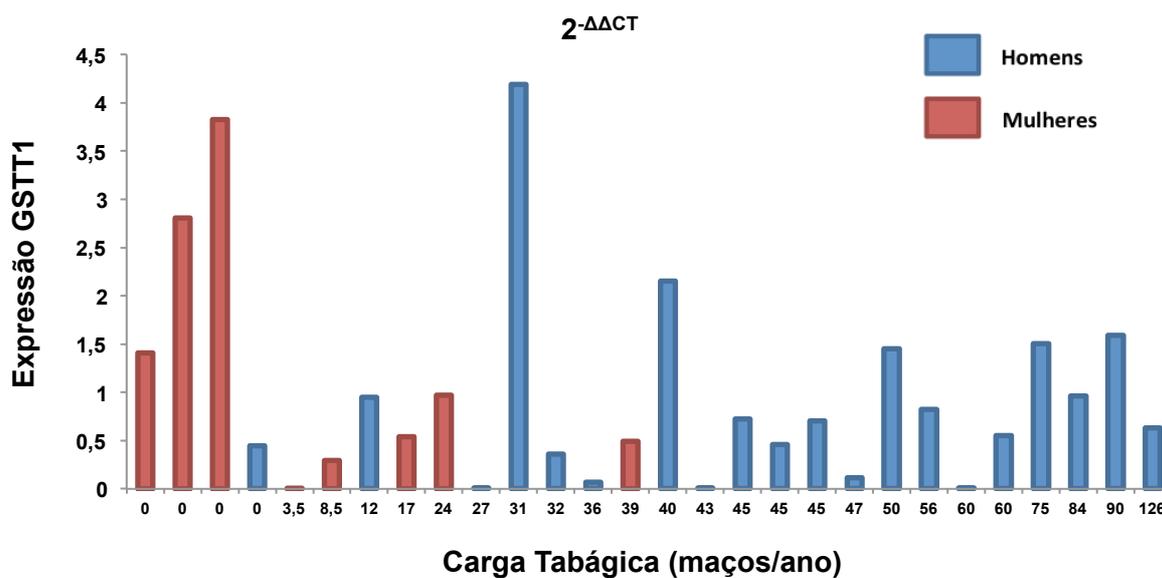
GSTT1 Nível de Expressão	Idade	Número de cigarros/ dia	Início tabagismo	Tempo de uso	Carga tabágica	Fagerström	AUDIT	Estágio	
CCE fumante n=24	-0,1091 0,6118	-0,2555 0,2282	0,1346 0,5306	-0,1761 0,4105	-0,2890 0,1708	-0,2174 0,3075	-0,0328 0,8792	-0,3967 0,0550	* #
CCE não fumante n=4	0,2000 0,9167	** **	** **	** **	** **	** **	0,0000 0,6667	0,3162 1,0000	* #
Controle fumante n=8	-0,5183 0,0095	0,4805 0,0175	-0,5271 0,0081	-0,2707 0,2008	0,2959 0,1604	0,5242 0,0085	0,5606 0,0219	** **	* #
Controle não fumante n=4	** **	** **	** **	** **	** **	** **	** **	** **	* #

*Coeficiente de correlação de Spearman; # p-valor; ** Não realizado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na figura 7 está ilustrada a expressão gênica individual das amostras de CCE fumantes e não fumantes, e suas respectivas cargas tabágicas.

Figura 7 – Expressão gênica individual de GSTT1 em relação à carga tabágica (anos-maço) na amostra de pacientes com CCE bucal



Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Neoplasias malignas de cavidade bucal estão entre as neoplasias mais incidentes em todo mundo e apresentam uma grande variabilidade entre os diversos continentes (World Health Organization, 2015a). Dados do Instituto Nacional do câncer (2018) têm mostrado que no Brasil ocupam a quinta e sétima posição, entre homens e mulheres respectivamente e representam um importante problema de saúde pública. O diagnóstico precoce com intervenções terapêuticas menos agressivas proporcionam maiores possibilidades de cura (Malik et al., 2015).

Tabaco e álcool são os principais fatores de risco relacionados a este tipo de neoplasia. Portanto a exposição prolongada aos principais carcinógenos provenientes desses produtos aumentam as chances de alterações celulares e desenvolvimento do câncer.

Os pacientes acometidos por CCE geralmente têm um perfil de indivíduos do sexo masculino, com início precoce do consumo de tabaco e álcool, escolaridade e nível sócio econômico baixos. Assim, medidas de educação e prevenção devem ser direcionadas principalmente a esse extrato social como forma de reduzir a incidência deste tipo de neoplasia, como sugerido por Boing et al. (2011).

Em nossos resultados encontramos uma prevalência maior de homens fumantes, que estão em concordância com os dados de pesquisa do Vigitel que também demonstrou uma maior prevalência de tabagismo entre homens (12,7%) em relação às mulheres (8%) na população brasileira acima de 18 anos (Brasil, 2017).

O tabagismo entre os grupos CCE e Controle foi semelhante em muitos aspectos como a média geral de idade, idade de início do uso e tempo de uso do tabaco. Nos dois grupos os homens iniciaram o tabagismo mais cedo, porém o grupo Controle apresentou uma carga tabágica bem superior quando comparado ao Grupo CCE fumante devido ao maior consumo diário de cigarros. Este comportamento mostrou características preocupantes uma vez que predispõe a um risco aumentado de desenvolvimento de doenças tabaco relacionadas, dentre elas o câncer (Hashibe et al., 2009; Warnakulasuriya et al., 2010; Winn et al., 2015).

A dependência nicotínica (DN) foi avaliada por meio do TFDC. Em nossa casuística observamos que a maioria dos homens com câncer apresentou

dependência elevada ou muito elevada ao contrário das mulheres. Estes achados foram semelhantes aos encontrados por Almeida et al. (2014) em uma população com neoplasias malignas de cabeça e pescoço. Entretanto, Chen et al. (2017) não encontraram diferença significativa entre os valores do TFDC entre homens e mulheres. Em relação ao Grupo Controle fumante houve um equilíbrio no grau de DN entre os homens, com predomínio de baixa dependência entre as mulheres.

A persistência do tabagismo após o diagnóstico de câncer está relacionada ao maior risco de desfechos desfavoráveis no tratamento, como recidiva tumoral, surgimento de segundo tumor primário e complicações dos procedimentos cirúrgicos e terapias adjuvantes. Em nossa amostra, 70% continuavam a fumar mesmo após o diagnóstico do CCE bucal. Estes resultados foram contrários aos encontrados por Almeida et al. (2014) onde cerca de 90% dos pacientes haviam parado de fumar.

Ao considerarmos o grau de exposição dos indivíduos com câncer fumantes observamos um prolongado tempo de uso com média geral de cerca de 38 anos e uma diferença entre a média do tempo de uso dos homens (40,6 anos) quando comparado as mulheres (28,8 anos). Entretanto, em ambos os sexos, foi observado um alto desvio padrão, mostrando não existir um consumo médio uniforme entre os pacientes. Tal achado sugere uma maior vulnerabilidade das mulheres em relação ao uso do tabaco, uma vez que na média, as mesmas fumaram um quarto a menos que os homens e apresentaram uma neoplasia de boca em estágio avançado. Em nossa casuística uma das pacientes apresentava uma lesão estágio IV com apenas vinte oito anos de idade.

Em concordância com este achado, em nossa casuística tivemos cinco mulheres fumantes com câncer, sendo quatro acima de 50 anos sem histórico de reposição hormonal, o que poderia estar relacionado ao desenvolvimento do câncer.

Dados de literatura têm mostrado que o estrógeno parece ter um papel protetor importante. Hashim et al. (2017) mostraram que mulheres fumantes em menopausa, porém em uso de terapia de reposição hormonal tiveram uma menor incidência de NMTADS. Observou também que quanto mais precoce o início da reposição e quanto maior esse período, menores eram os riscos das mesmas desenvolverem este tipo de neoplasia.

Por outro lado, ao contrário desses achados de Hashim et al. (2017), o fator hormonal não pode ser valorizado como fator protetor, uma vez que em nossa

casuística quatro mulheres que ainda não haviam entrado na menopausa, e também não tinham histórico de consumo de tabaco e álcool apresentaram CCE de língua em estágio inicial.

Considerando esse fato, Toporcov et al. (2015) também observaram um aumento crescente dessa forma de apresentação da doença em pacientes adultos jovens, questionando um provável fator familiar genético desconhecido. No Brasil, Moysés et al. (2013) analisaram fatores clínicos, patológicos e demográficos, e encontraram uma quantidade considerável de mulheres jovens que nunca fumaram ou beberam e que apresentaram CCE bucal.

Embora já haja uma relação estabelecida entre tumores de orofaringe e HPV, a literatura ainda é controversa particularmente sobre o papel do HPV nas lesões da cavidade bucal (Poling et al., 2014). Em estudo realizado por Kaminagakura et al. (2012) os autores encontraram uma prevalência de cerca de 68% de HPV positivo em pacientes adultos jovens. No entanto, boa parte da amostra era de indivíduos com história de etilismo e tabagismo associado. Em nossa casuística tivemos quatro pacientes com idade abaixo de 40 anos, sendo dois deles fumantes com alta carga tabágica e dois deles sem nenhum histórico de etilismo ou tabagismo. Seria essa uma forma diferente de manifestação do CCE bucal ?

Em estudo realizado Juli e Juli (2015), os autores mostraram que fatores genéticos têm influenciado as diversas etapas de adição, predispondo as pessoas a uma maior vulnerabilidade para o início e manutenção do hábito, bem como uma maior propensão para a dependência. Esses resultados mostram a importância do componente genético.

Ao considerarmos o comportamento de risco dos indivíduos para o consumo de etílicos através do AUDIT, observamos um padrão diferente entre homens e mulheres. Cerca de 80% dos homens exibiram um consumo de risco alto e provável dependência, bem diferente das mulheres, que por consumirem menos apresentaram menor risco de dependência. O consumo de etílicos é de difícil quantificação uma vez que pode ser extremamente variável durante a vida.

Em geral, o comportamento de consumo e dependência está associado a problemas sócio econômicos, desemprego, desajustes emocionais, baixa autoestima, depressão, conflitos quer sejam familiares ou no trabalho, como observado em estudo realizado por Silveira et al. (2012).

A associação entre tabagismo e etilismo no contexto do CCE bucal está bem estabelecida. Em nossa amostra, dos 13 indivíduos com comportamento de risco observados por meio do AUDIT, seis deles apresentaram escores elevados ou muito elevados pelo TFDC. Tal situação mostrou a relação de co-dependência entre múltiplos fatores exógenos nocivos e que potencializam um maior risco de surgimento de câncer. Esses achados estão em concordância com inúmeros trabalhos que demonstraram a relação entre as múltiplas dependências químicas e o aumento no risco de câncer (Hashibe et al., 2009; Warnakulasuriya et al., 2010; Winn et al., 2015).

Ao analisarmos o estágio evolutivo da doença, cerca de 2/3 encontrava-se em estágios avançados (III e IV), sendo 20 pacientes no Grupo CCE fumante (17 homens e 3 mulheres), ao contrário do Grupo CCE não fumante, onde dos seis pacientes, apenas um homem apresentou doença em estágio IV.

Em nossa casuística pacientes não fumantes apresentaram estágios mais iniciais da doença tendo propiciado tratamento menos agressivo e prognóstico melhor. De acordo com Peterson et al. (2016), estágios mais avançados da doenças foram associados a um grau de exposição maior ao tabaco, como tempo, grau de exposição e duração do hábito, devendo esse fator ser sempre considerado durante a análise estratificada juntamente com outros fatores prognósticos.

Dados de literatura têm mostrado que o CCE bucal em fases mais avançadas geralmente é mais prevalente em fumantes, o que está de acordo com os achados do nosso estudo, que mostraram pacientes não fumantes em estágios mais iniciais da doença, propiciando um tratamento menos agressivo e um prognóstico melhor (Peterson et al., 2016).

Além disso, nossos resultados indicaram uma maior preocupação das mulheres não fumantes quanto ao surgimento de uma lesão na boca, onde foram encontrados estágios mais iniciais da doença. No entanto, as mulheres fumantes de nossa casuística apresentaram estágios mais avançados da doença, ou seja III e IV.

O diagnóstico tardio compromete de forma acentuada as perspectivas de tratamento e cura, conforme demonstrado em trabalhos realizados por diversas populações ao redor do mundo. O estadiamento precoce ainda é um grande desafio aos profissionais envolvidos no diagnóstico e tratamento (Huang, O'Sullivan, 2017).

Em estudo multicêntrico do grupo *INHANCE Consortium*, o tabagismo foi

considerado fator prognóstico de sobrevida aos tumores de boca. Os indivíduos que consumiam acima de 20 cigarros/dia diminuíram em 41% a sobrevida em cinco anos, e apresentaram estadiamento mais avançado da doença, porém sem relação com aumento do consumo de álcool (Giraldi et al., 2017).

A frequência gênica das Glutathione S-transferases tem sido estudada em diferentes populações. Estes estudos relacionam-se especialmente às questões sobre o polimorfismo desta categoria e sua atividade enzimática resultante.

Em nosso trabalho, a escolha pela variante selvagem é justificada pela sua maior prevalência na população brasileira (da Fonte de Amorim et al., 2002; Rossini et al., 2002, 2007; Ribeiro Pinto et al., 2003). Nossa população é resultado da miscigenação basicamente entre portugueses, índios e africanos. Nossos resultados mostraram uma importante expressão da forma selvagem dos genes GSTM1 (94%), GSTP1 (88%) e GSTT1 (85%) em amostras de CCE bucal, sendo que, até o momento tais valores não foram descritos na literatura.

Em estudo sobre polimorfismos genéticos de GSTs e quimioterapia em pacientes de câncer de cabeça e pescoço, Pincinato (2015) observou que GSTT1 apresentou uma frequência de cerca de 83% na sua forma selvagem em amostras de sangue periférico. Todavia, diferente de nossos achados em relação aos genes GSTM1 e GSTP1 selvagens o autor encontrou uma frequência de 48% e 42% respectivamente, principalmente de população composta por caucasóides e negróides (Pincinato, 2015). Tais valores também foram encontrados em outro estudo brasileiro conduzido por Rossini et al. (2007). Vale ressaltar que em ambos os estudos tal frequência foi encontrada em sangue periférico e não em amostra de tecido tumoral. Em nossa casuística quase a totalidade foi composta de caucasóides, e nenhum paciente asiático ou descendente.

A baixa atividade ou atividade nula das enzimas GSTs, determinada pelo genótipo nulo, é outro ponto importante de investigação. Pesquisadores acreditam que o genótipo nulo aumentaria as chances de desenvolvimento de CCE, pois não haveria detoxificação de compostos eletrofílicos vindos da fase I ou de carcinógenos diretos para a fase II, permitindo a interação com DNA da célula como sugerido por Rao et al. (2017).

Diversos trabalhos de literatura têm mostrado a importância do estudo das formas polimórficas nulas como fator de risco para as neoplasias malignas, em

particular as NMTADS. Assim, estudos têm sido realizados em grupos de indivíduos portadores de fenótipo que apresentaram uma diminuição da capacidade de metabolização de carcinógenos em sua fase II, ou seja, de conjugação da glutathione a componentes eletrofilicos e sua subsequente excreção (Yadav et al., 2010; Sharma et al., 2017). Porém, em estudo de Hatagima et al. (2008) realizado com uma população do Rio de Janeiro, não foi comprovada a relação entre casos de CCE bucal e controles ao se analisar o genótipo nulo de GSTs.

A possibilidade de estudo dos genes Glutathione S-transferases em uma população de risco para tabaco e álcool dependente mostrou-se ideal, uma vez que são populações com alto grau de exposição a carcinógenos (Krüger et al., 2015). O método escolhido para o presente estudo foi o qPCR que identifica a expressão e quantifica o total de cDNA transcrito do RNA mensageiro. 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.

Em nossa casuística foi encontrada uma frequência de 94% na expressão de GSTM1 selvagem nos casos de amostras de pacientes com CCE fumantes. Não encontramos na literatura nenhum artigo com valores tão altos de expressão em tecido tumoral. Este valor é bem diferente dos estudos geralmente realizados em sangue periférico, cuja variação é relacionada a diferentes populações, tendo sido descrita em torno de 40 a 50%.

No Grupo CCE fumante foi observado um aumento da expressão quando comparada ao Grupo Controle fumante, significativo estatisticamente. No entanto não houve correlação importante entre o grau de exposição aos carcinógenos do tabaco avaliados por meio dos parâmetros do perfil tabágico, entre eles DN, carga tabágica, tempo de uso, e a expressão de GSTM1 do Grupo CCE fumante.

Contrário aos nossos achados, Melo et al. (2015), verificaram uma associação entre expressão de formas selvagens, principalmente de GSTM1 e GSTT1, e DN, onde uma maior expressão e conseqüentemente uma maior metabolização da nicotina, diminuíram seus efeitos colaterais e promoveram uma maior dependência.

No Grupo Controle fumante foi observada uma correlação entre o diminuição nos níveis de expressão de GSTM1 e um aumento do comportamento de risco para

o uso de álcool, avaliado pelo AUDIT. Entretanto parece não haver significado clínico uma vez que o álcool é metabolizado por enzimas como as álcool desidrogenases (ALDH), que também é uma enzima de fase II, como as Glutathione S-transferases, bem como as enzimas de fase I da família Citocromo P450, em especial CYP2E1. Sendo assim, é provável que a diminuição da expressão de GSTM1 nos controles, tenha sido compensada por uma maior expressão das enzimas metabolizadoras do álcool conferindo um fator protetor a este grupo.

Na análise individual da expressão gênica em relação a carga tabágica de cada indivíduo pudemos observar que a quantificação da expressão variou de forma individual e aleatória, não mostrando uma relação direta entre as variáveis. Apesar das maiores expressões terem sido observadas acima de 50 anos-maço algumas cargas tabágicas maiores mostraram menores expressões. Além disso, não observamos nenhuma relação entre a expressão gênica de GSTM1 e o estadiamento.

Em nossa amostra, cinco pacientes não tabagistas e não etilistas apresentaram expressão de GSTM1. Este fato também observado por Soares et al. (2017), foi justificado pelo fato de outros possíveis xenobióticos poderem estimular a expressão de GSTs em particular GSTM1, e que não estariam relacionadas aos carcinógenos do tabaco e álcool.

Como foi mostrado em nossa casuística quase a totalidade dos pacientes apresentaram uma carga tabágica acima de 10 anos-maço, e metade deles por longos períodos. Esses achados foram semelhantes a Natphopsuk et al. (2016) que observaram indivíduos com carga tabágica elevada (acima de 5 a 10 anos-maço), por períodos mais longos (acima de 40 anos), poderiam levar a uma saturação de carcinógenos, impedindo o processo de desintoxicação e conseqüentemente podendo levar a carcinogênese, mostrando a importância dessas variáveis.

Em relação a expressão gênica de GSTP1 selvagem não foi observada diferença entre os grupos avaliados. Ao contrário do gene GSTM1, que demonstrou aumento de atividade, a expressão de GSTP1 ocorreu de forma mais homogênea em todos os grupos analisados não tendo resultado estatisticamente significativo.

No Grupo CCE fumante, não foi observada correlação da expressão gênica de GSTP1 e todas as variáveis de exposição ao tabaco, álcool e estadiamento clínico da doença. Já no Grupo Controle fumante pôde-se observar uma correlação

direta entre o nível de expressão quando comparado com a idade dos pacientes, início do hábito. Assim, o nível de expressão aumentou à medida que esses indivíduos começaram a fumar em idade mais tardias e tinham idade mais avançada, mostrando que a expressão gênica provavelmente foi induzida mais tardiamente, auxiliando no processo de detoxificação dos carcinógenos e conferindo proteção.

Todavia, o número de cigarros fumados ao dia, tempo de uso em anos, e carga tabágica em anos-maço, ou seja, o grau de exposição desses controles ao longo da vida parece não ter sido importante. Em nosso Grupo Controle fumante constatamos que os mesmos fumavam cerca de 1 maço de cigarro a mais por dia, tinham uma carga tabágica muito maior, porém com um tempo de uso menor quando comparado aos casos do Grupo CCE fumante. Apesar disso, não houve significância para esses fatores.

Embora a grande maioria dos pacientes tenham expressado GSTP1 no Grupo CCE fumante, essa expressão foi fraca podendo ser considerada um fator importante ao desenvolvimento do câncer pela não detoxificação dos componentes carcinógenos. Natphopsuk et al. (2016) propuseram uma justificativa a esse achado, onde provavelmente tenha havido uma saturação dos níveis de carcinógenos do tabaco nas células e que teriam impedido o mecanismo de detoxificação do sistema enzimático de fase II podendo ter colaborado com o processo de carcinogênese.

Além disso, a baixa expressão de GSTP1 foi relacionada por Ma et al. (2015) como um importante fator de diferenciação tumoral, podendo estar relacionada com a proliferação celular, apoptose, e outras alterações bioquímicas do metabolismo celular. Para os três casos onde a expressão do GSTP1 foi indetectável, a hipótese de genótipo nulo deve ser considerada.

Ainda no Grupo Controle fumante a expressão de GSTP1 e sua correlação com o Teste de Fagerström, foi significativa, porém com uma fraca correlação, não sendo observado no Grupo CCE fumante. Quanto menor o teste de Fagerström, maior foi o nível de expressão de GSTP1. O TFDC é mais relacionado aos sintomas de dependência e abstinência pela velocidade de metabolização da nicotina. No entanto, o principal metabolizador da nicotina são as enzimas da família Citocromo P450, em especial CYP2A6. O comportamento poligênico que envolve a DN está bem estabelecido, e relacionada a diversos fatores como metabolização da nicotina,

receptores nicotínicos cerebrais, sistemas de recompensa cerebral entre outros como demonstrado por Minicã et al. (2017).

Para Zakiullah et al. (2015) o gene CYP1A1, que codifica a enzima da fase I com mesmo nome, também exerce influencia na expressão dos genes de fase II, como GSTM1 e GSTP1, porém com um mecanismo ainda desconhecido, sugerindo que este tipo de estudo seja feito a associação desses três genes, tanto na forma selvagem quanto polimórfica.

Ainda no Grupo Controle fumante foi observada uma correlação entre o aumento nos níveis de expressão de GSTP1 e a diminuição do comportamento de risco para o uso de álcool, avaliado pelo AUDIT. Entretanto parece não haver significado clínico uma vez que o álcool é metabolizado por enzimas da família CYP450, em especial CYP2E1 na fase I, bem como as álcool desidrogenases (ALDH), em fase II (Cederbaum, 2012).

O aumento na expressão de GSTP1 em indivíduos tabagistas e etilistas ainda sem lesão de CCE poderia demonstrar um mecanismo protetor. No entanto do ponto de vista de marcados tumoral tal avaliação só poderia ser realizada em pacientes com alguma patologia da cavidade bucal que necessitassem de tratamento cirúrgico. Essa situação nos parece de pouca utilidade prática no momento.

Em estudo de Soares et al. (2017) que analisando a expressão de GSTP1 em margens livres de pacientes etilistas e tabagistas com CCE, e comparando com margem de tumor de indivíduos que nunca fumaram ou beberam, observaram uma maior expressão em indivíduos fumantes e etilistas. Este achado sugere uma possível falha no mecanismo de proteção, e diminuição do processo de detoxificação cuja falha poderia ter influenciado no processo de carcinogênese, em um possível campo de cancerização.

Na análise da expressão gênica individual de GSTP1 e sua relação com a carga tabágica também não observamos relação entre dose e expressão. Poucos pacientes do Grupo CCE fumante apresentaram uma maior expressão, cuja análise individual também não mostrou nenhuma relação com alguma característica clínica específica. Esses três pacientes tiveram doença avançada, TFDC elevado, o que não diferiu muito do padrão de nossa amostra.

Na análise comparativa da expressão gênica de GSTT1 entre os Grupos CCE fumante e Controle fumante identificamos uma diferença significativa, mostrando uma diminuição da expressão do Grupo CCE fumante, em relação ao Grupo Controle fumante. A menor expressão no Grupo CCE fumante já era esperada uma vez que os indivíduos que tiveram câncer provavelmente não tiveram a metabolização dos carcinógenos, e que tais indivíduos poderiam apresentar a forma nula do gene. Dados de literatura têm mostrado que a forma nula está relacionada a um maior risco de CCE bucal (Dong et al., 2017).

Assim como nos genes anteriormente estudados a expressão de GSTT1 foi expressiva em quase a totalidade das amostras, porém quantitativamente baixa. Em nossa casuística esta forma selvagem esteve presente em boa parte das amostras. Este achado também confirma a teoria de que GSTT1 é o gene selvagem mais expresso entre as demais GSTs. No Brasil, a frequência desse gene selvagem costuma ser alta. Pincinato et al. (2015) encontraram alta expressão em sangue periférico.

Como nos demais genes estudados, não encontramos na literatura nenhum trabalho que mostrasse a frequência de GSTT1 tanto selvagem quanto polimórfico em amostras de tecido tumoral de pacientes com CCE bucal.

Ao se fazer a correlação da expressão gênica de GSTT1 com fatores de exposição no Grupo CCE fumante, não houve significância em nenhum dos fatores. No entanto, essa correlação foi estatisticamente significativa no Grupo Controle fumante, para as variáveis idade do paciente, número de cigarros fumados ao dia, idade de início, Teste de Fagerström e AUDIT.

Diferente de GSTP1, quanto menor a idade do indivíduo controle e quanto menor a idade de início do tabagismo maior foi o nível de expressão de GSTT1. Além disso, quanto maior o número de cigarros fumados ao dia, quanto maior o TFDC e AUDIT maior foi a expressão de GSTT1. Esses achados mostraram que a alta exposição do Grupo Controle fumante foi um fator de maior expressão de GSTT1 em relação ao Grupo CCE fumante, e que provavelmente conferiu proteção ao Grupo Controle. No entanto vale ressaltar a importância do acompanhamento ambulatorial desses indivíduos, onde apesar de não apresentarem uma neoplasia maligna permaneceriam com um maior risco de desenvolvimento de um câncer ao

considerarmos um fator de saturação conforme proposto por Natphopsuk et al. (2016).

Na análise individual da expressão de GSTT1, três pacientes não tinham histórico de tabagismo nem de etilismo. Este fato mostrou, que esses indivíduos apresentaram expressão desse gene, porém provavelmente devido a outros xenobióticos, como postulado por Soares et al. (2017) ao analisar a expressão gênica de GSTP1 em pacientes não tabagistas e não etilistas.

No Brasil, Gattás et al. (2006) mostraram a associação entre genes de detoxificação de fase I (CYP1A1 e CYP2E1), e de fase II (GSTM1 e GSTT1), porém sem associação entre GSTT1 nulo e câncer bucal, como foi demonstrado posteriormente por Zakiullah et al. (2015).

De acordo com Soares et al. (2017) o aumento da expressão de GSTs pode ser um indicador de resistência quimioterápica. Este fato nos levaria a pensar também, que do ponto de vista de um tratamento quimioterápico individualizado, as diferentes expressões de GSTs deveriam ser consideradas. Em nossa casuística houve diferença nas expressões das subunidades de GSTs estudadas, mas apenas GSTT1 mostrou uma diminuição da expressão entre os casos do Grupo CCE fumante e que portanto poderiam se beneficiar com a quimioterapia. No entanto, as indicações de terapia neoadjuvante para câncer de boca tem sido cada vez mais restritas, e a adjuvância só é indicada nos casos de margem cirúrgica comprometida ou extravasamento extra-capsular de metástase regional (Adelstein et al., 2017)

Entre as limitações do estudo, houve dificuldade de pareamento de amostras de indivíduos com CCE e controle considerando idade, sexo e carga tabágica. A aquisição dos blocos em parafina teria possibilitado estudo imunohistoquímico da expressão dos genes estudados conforme trabalho realizado por Soares et al. (2017).

Apesar da pesquisa ter sido realizada com amostras coletadas em quatro serviços distintos, localizados em municípios diversos, o número de amostras evidencia a necessidade de um biobanco com dados consistentes.

Outro fator limitante foi o fato de não ter sido possível uma avaliação da curva de sobrevida de nossos pacientes com CCE bucal em virtude do pouco período de seguimento dos casos onde a grande maioria tinha menos de 12 meses

de tratamento, impedindo assim uma avaliação de fatores prognósticos relacionados a expressão gênica.

Assim como outros estudos genéticos o CCE bucal é uma doença multifatorial e poligênica que envolve inúmeros mecanismos de carcinogênese e anti carcinogênese onde o papel de cada fator ainda necessita de maiores esclarecimentos

6 CONCLUSÃO

Concluimos que as formas selvagens das GSTs estudadas apresentaram uma alta expressão nas amostras de pacientes com CCE bucal. Entretanto, quantitativamente essa expressão foi baixa, com grande variabilidade interindividual. Outrossim, não houve uma correlação direta entre níveis de expressão, carga tabágica, TFDC, teste AUDIT e estadiamento clínico no grupo CCE fumante. O aumento da expressão de GSTM1 e GSTP1 parece não ter tido um efeito protetor. A baixa expressão de GSTT1 em pacientes fumantes com CCE bucal se mostrou um potencial marcador a ser avaliado em pacientes fumantes que ainda não desenvolveram uma neoplasia maligna.

REFERÊNCIAS*

Adelstein D, Gillison ML, Pfister DG, Spencer S, Adkins D, Brizel DM, et al. NCCN Guidelines Insights: Head and Neck Cancers, Version 2.2017. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017 Jun;15(6):761-70. doi: 10.6004/jnccn.2017.0101.

Ali J, Sabiha B, Jan HU, Haider SA, Khan AA, Ali SS. Genetic etiology of oral cancer. *Oral Oncol*. 2017 Jul;70:23-8. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.05.004.

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.

Bediaga NG, Marichalar-Mendia X, Rey-Barja N, Setien-Olarrá A, Gonzalez-Garcia JA, de Pancorbo MM, et al. Polymorphisms in alcohol and tobacco metabolism genes in head and neck cancer in the Basque Country. *J Oral Pathol Med*. 2015 Nov;44(10):769-75. doi: 10.1111/jop.12305.

Boing AF, Antunes JL, de Carvalho MB, de Góis Filho JF, Kowalski LP, Michaluart P Jr, et al. How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk? *J Epidemiol Community Health*. 2011 Aug;65(8):709-14. doi: 10.1136/jech.2009.097691. PubMed PMID: 20724282.

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.

Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis*. 2012 Nov;16(4):667-85. doi: 10.1016/j.cld.2012.08.002.

Chen A, Krebs NM, Zhu J, Sun D, Stennett A, Muscat JE. Sex/Gender differences in cotinine levels among daily smokers in the pennsylvania adult smoking study. *J Womens Health (Larchmt)*. 2017 Nov;26(11):1222-30. doi: 10.1089/jwh.2016.6317.

* 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

Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol*. 2009a May;21(3):194-200. doi: 10.1097/CCO.0b013e32832a68ca.

Curado MP, Voti L, Sortino-Rachou AM. Cancer registration data and quality indicators in low and middle income countries: their interpretation and potential use for the improvement of cancer care. *Cancer Causes Control*. 2009b Jul;20(5):751-6. doi: 10.1007/s10552-008-9288-5.

da Fonte de Amorim L, Rossini A, Mendonça GAS, Lotsch PF, de Almeida Simão T, de Moura Gallo CV, et al. CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer Lett*. 2002 Jul;181(2):179–86.

Döbrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev*. 2005 Jan;24(1):9-17. doi: 10.1007/s10555-005-5044-4.

Dong TT, Wang LJ, Liu LZ, Ma SN. Susceptibility to oral squamous cell carcinoma: correlation with variants of CYP1A1-Mspl, GSTT1, GSTM1, ALDH2, EC-SOD and Lifestyle factors. *Balkan J Med Genet*. 2017 Mar 9;19(2):61-70. doi: 10.1515/bjmg-2016-0037.

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.

Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer*. 1989 Jun 15;43(6):992-1000. doi: 10.1002/ijc.2910430607.

Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2008 Jan 1;122(1):155-64.

Gattás GJ, de Carvalho MB, Siraque MS, Curioni OA, Kohler P, Eluf-Neto J, et al. Genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. *Head Neck*. 2006 Sep;28(9):819-26.

Gencapo. Head and neck genome project [Internet] [acesso em 2017 Jun 22]; [aproximadamente 1 p.]. Disponível em: <http://www.gencapo.famerp.br/>

Giraldi L, Leoncini E, Pastorino R, Wunsch-Filho V, de Carvalho M, Lopez R, et al. Alcohol and cigarette consumption predict mortality in patients with head and neck cancer: a pooled analysis within the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) Consortium. *Ann Oncol*. 2017;28(11):2843-51.

Glynn T, Seffrin JR, Brawley OW, Grey N, Ross H. The globalization of tobacco use: 21 challenges for the 21st century. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(1):50-61. doi:10.3322/caac.20052.

- 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 Feb;18(2):541-50. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0347.
- 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 Aug;6(8):1998-2007. doi: 10.1002/cam4.1136.
- Hatagima A, Costa EC, Marques CF, Koifman RJ, Boffetta P, Koifman S. Glutathione S-transferase polymorphisms and oral cancer: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol.* 2008 Feb;44(2):200-7.
- 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; [acesso em 2018 Jun 10] Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>
- Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ.* 2001 Apr;65(4):328-39.
- Juli G, Juli L. Genetic of addiction: common and uncommon factors. *Psychiatr Danub.* 2015 Sep;27 Suppl 1:S383-90.
- Kaminagakura E, Villa LL, Andreoli MA, Sobrinho JS, Vartanian JG, Soares FA, Nishimoto IN, Rocha R, Kowalski LP. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Int J Cancer.* 2012 Apr 15;130(8):1726-32. doi: 10.1002/ijc.26185.
- Krüger M, Pabst AM, Mahmoodi B, Becker B, Kämmerer PW, Koch FP. The impact of GSTM1/GSTT1 polymorphism for the risk of oral cancer. *Clin Oral Investig.* 2015 Nov;19(8):1791-7. doi: 10.1007/s00784-015-1400-0.
- Liu R, Yin L, Pu Y. Association between gene expression of metabolizing enzymes and esophageal squamous cell carcinomas in China. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012 Oct;16(10):1211-7. doi: 10.1089/gtmb.2012.0032.
- 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.
- Ma HL, Yu C, Liu Y, Tan YR, Qiao JK, Yang X, et al. Decreased expression of glutathione S-transferase pi correlates with poorly differentiated grade in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2015 Mar;44(3):193-200. doi: 10.1111/jop.12229.
- 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.
- Marron M, Boffetta P, Zhang ZF, Zaridze D, Wunsch-Filho V, Winn DM, et al. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol*. 2010 Feb;39(1):182-96. doi: 10.1093/ije/dyp291.
- Masood N, Malik FA, Kayani MA. Expression of xenobiotic metabolizing genes in head and neck cancer tissues. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011a;12(2):377-82.
- Masood N, Kayani MA, Malik FA, Mahjabeen I, Baig RM, Faryal R. Genetic variation in carcinogen metabolizing genes associated with oral cancer in pakistani population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011b;12(2):491-5.
- Melo LG de, Vargas HO, Pizzo de Castro MR, Watanabe MA, Guembarovski RL, Maes M, et al. Genetic polymorphisms by deletion in genes that encode for glutathione S-transferases are associated with nicotine dependence and tobacco use-related medical disorders. *Neuro Endocrinol Lett*. 2015 Dec;36(6):529-38.
- Minicã CC, Mbarek H, Pool R, Dolan CV, Boomsma DI, Vink JM. Pathways to smoking behaviours: biological insights from the Tobacco and Genetics Consortium meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2017 Jan;22(1):82-8. doi: 10.1038/mp.2016.20.
- 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.
- Moyses RA, Lopez RV, Cury PM, Siqueira SA, Curioni OA, Gois Filho JF, et al. Significant differences in demographic, clinical, and pathological features in relation to smoking and alcohol consumption among 1,633 head and neck cancer patients. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68(6):738-44.
- Mulder TP, Court DA, Peters WH. Variability of glutathione S-transferase alpha in human liver and plasma. *Clin Chem*. 1999 Mar;45(3):355-9.
- Natphopsuk S, Settheetham-Ishida W, Phuthong S, Ishida T. Preliminary study of the GSTM1 null polymorphism and history of tobacco Smoking among oral cancer patients in northeastern Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(2):739-42

Peterson LA, Bellile EL, Wolf GT, Virani S, Shuman AG, Taylor JM, et al. University of Michigan Head and Neck Specialized Program of Research Excellence Program. Cigarette use, comorbidities, and prognosis in a prospective head and neck squamous cell carcinoma population. *Head Neck*. 2016 Dec;38(12):1810-20. doi: 10.1002/hed.24515.

Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol*. 2009;45(4-5):340-50. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.018.

Pincinato C. Polimorfismos em genes do sistema da glutathione-s-transferase de detoxificação celular na farmacogenética da cisplatina associada à radioterapia em portadores de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço [tese] [Internet]. Campinas: Universidade Campinas - UNICAMP; 2015 [acesso em 2017 Nov 3]. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/308607/1/Pincinato_EderdeCarvalho_D.pdf

Poling JS, Ma XJ, Bui S, Luo Y, Li R, Koch WM, et al. Human papillomavirus (HPV) status of non-tobacco related squamous cell carcinomas of the lateral tongue. *Oral Oncol*. 2014;50(4):306-10.

Rao AK, Parameswar P, Majumdar S, Uppala D, Kotina S, Vennamaneni NH. Evaluation of genetic polymorphisms in glutathione s-transferase theta1, glutathione S-transferase mu1, and glutathione s-transferase mu3 in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma with deleterious habits using polymerase chain reaction. *Int J Appl Basic Med Res*. 2017;7(3):181-5.

Reichert J, Araújo AJ, Gonçalves CM, Godoy I, Chatkin JM, Sales MP, et al. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Smoking cessation guidelines--2008. *J Bras Pneumol*. 2008 Oct;34(10):845-80.

Ribeiro Pinto LF, Teixeira Rossini AM, Albano RM, Felzenszwalb I, de Moura Gallo C V, Nunes RA, et al. Mechanisms of esophageal cancer development in Brazilians. *Mutat Res*: 2003;544(2-3):365-73. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.06.021>.

Rossini A, Rapozo DC, Amorim LM, Macedo JM, Medina R, Neto JF, et al. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet Mol Res*. 2002 Sep 30;1(3):233-40.

Rossini A, Rapozo DC, Soares Lima SC, Guimarães DP, Ferreira MA, Teixeira R, et al. Polymorphisms of GSTP1 and GSTT1, but not of CYP2A6, CYP2E1 or GSTM1, modify the risk for esophageal cancer in a western population. *Carcinogenesis*. 2007 Dec;28(12):2537-42.

Rowe JD, Nieves E, Listowsky I. Subunit diversity and tissue distribution of human glutathione S-transferases: interpretations based on electrospray ionization-MS and peptide sequence-specific antisera. *Biochem J*. 1997 Jul 15;325(Pt 2):481-6.

Sharma V, Nandan A, Sharma AK, Singh H, Bharadwaj M, Sinha DN, et al. Signature of genetic associations in oral cancer. *Tumour Biol.* 2017 Oct;39(10):1-9. doi: 10.1177/1010428317725923.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 2001 Nov 15;360(Pt 1):1-16.

Sherratt PJ, Pulford DJ, Harrison DJ, Green T, Hayes JD. Evidence that human class Theta glutathione S-transferase T1-1 can catalyse the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse. Comparison of the tissue distribution of GST T1-1 with that of classes Alpha, Mu and Pi GST in human. *Biochem J.* 1997 Sep 15;326 (Pt 3):837-46.

Silveira CM, Siu ER, Wang YP, Viana MC, Andrade AG, Andrade LH. Gender differences in drinking patterns and alcohol-related problems in a community sample in Sao Paulo, Brazil. *Clinics (São Paulo).* 2012;67(3):205-12.

Soares PO, Maluf Cury P, Mendoza Lopez RV, Cernea CR, Fukuyama EE, Livingstone Alves Figueiredo D, 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.

Szymańska K, Hung RJ, Wünsch-Filho V, Eluf-Neto J, Curado MP, Koifman S, et al. Alcohol and tobacco, and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Latin America: a case-control study. *Cancer Causes Control.* 2011 Jul;22(7):1037-46. doi: 10.1007/s10552-011-9779-7.

Tanwar R, Iyengar AR, Nagesh KS, Patil S, Subhash BV. Prevalence of glutathione S-transferase M1 null polymorphism in tobacco users, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma patients in South Indian population: a polymerase chain reaction study. *Contemp Clin Dent.* 2015 Mar;6(Suppl 1):S59-64. doi: 10.4103/0976-237X.152941.

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.

United States Department of Health and Human Services. Cancer. In: United States Department of Health and Human Services: the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease: a report of the surgeon general. Rockville: Department of Health and Human Services; 2010. p. 225-305.

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Audit: teste de identificação de desordens devido 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

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, INHANCE consortium. The INHANCE consortium: toward a better understanding of the causes and mechanisms of head and neck cancer. *Oral Dis*. 2015 Sep;21(6):685-93. doi: 10.1111/odi.12342.

World Health Organization. World cancer report 2014. Lyon: IARC; 2014.

World Health Organization. Cancer fact sheets [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015a [acesso em 2017 Nov 29]; [aproximadamente 7 p]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

World Health Organization. International statistical classification of diseases and related health problems: 10th revision ICD-10: 2015 WHO version for [internet]. Geneva: WHO; 2015b [acesso em 2017 Nov 17]. Disponível em: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2015/en#/F10-F19>

World Health Organization. Classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours [Internet]. In: Paul Kleihues MD, Leslie H. Sobin MD, John W. Eveson MD, Peter Reichart MD, David Sidransky MD, editors. Lyon 2004: IARC Press; 2005. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Iarc-Classification-Of-Tumours/Who-Classification-Of-Head-And-Neck-Tumours-2017>

Wunsch-Filho V, Mirra AP, López RVM, Antunes LF. Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*. 2010;13(2):175-87.

Wunsch-Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol*. 2002;38(8):737-46.

Yadav DS, Devi TR, Ihsan R, Mishra AK, Kaushal M, Chauhan PS, et al. Polymorphisms of glutathione S-transferase genes and the risk of aerodigestive tract cancers in the Northeast Indian population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010 Oct;14(5):715-23. doi: 10.1089/gtmb.2010.0087.

Yamamoto Y, Konishi H, Ichikawa D, Arita T, Shoda K, Komatsu, et al. Significance of GSTP1 for predicting the prognosis and chemotherapeutic efficacy in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2013 Oct;30(4):1687-94. doi: 10.3892/or.2013.2606.

Zakiullah, Ahmadullah, Khisroon M, Saeed M, Khan A, Khuda F, et al. Genetic susceptibility to oral cancer due to combined effects of GSTT1, GSTM1 and CYP1A1 gene variants in tobacco addicted patients of Pashtun ethnicity of Khyber Pakhtunkhwa province of Pakistan. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(3):1145-50.

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, portadora do registro no Conselho Regional de Odontologia CROSP 40530, telefone para contato 12-3947 9079, 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 será 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 será 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 através 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 pela participação no 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 outros laboratórios 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 outros fatores relacionado à 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 alguma consideração ou dúvida sobre a ética do desenvolvimento do projeto, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética (CEP) do Instituto de Ciências e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP, situado na Av. Engº Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, São José dos Campos-SP, fone 012-3947-9028, e-mail ceph@fosjc.unesp.br e comunicar-se com a Coordenadora Profa. Dra. DENISE NICODEMO. Informo ainda, que está garantida a sua liberdade de retirada do consentimento e de participação a qualquer momento. Também não haverá custo nem pagamento pela sua participação voluntária.

Eu, _____ portador do RG de número _____ declaro que, o pesquisador _____ me convidou a participar dessa pesquisa, tendo me explicado detalhadamente a finalidade, e lido comigo este termo de consentimento. Minhas dúvidas foram esclarecidas. Autorizo a utilização das informações que serão por mim fornecidas ao responder os questionamentos e dos resultados obtidos. Declaro conhecer o que será feito, que foi garantida a confidencialidade e o acesso permanente aos esclarecimentos, e que minha participação não implicará em nenhum custo. Sendo assim, ACEITO participar. Caso seja de minha vontade posso desistir a qualquer hora sem que haja nenhum prejuízo ao meu tratamento.

Assinatura do paciente

Assinatura do Pesquisador

São José dos Campos, de de 20

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
Quantas doses (copos) você consome num dia típico em que está bebendo?	
5 a 6	Vinho 120 ml
7 a 9	Destilado (<i>whisky</i> , 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: Elaborado pelo autor.

Exame clínico:

1) Extra-bucal

2) Intra-bucal

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	
	- 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: Elaborado pelo autor.

Parte III - 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	Dependência nicotínica
0 – 2	Muito baixa
3 – 4	Baixa
5	Moderada
6 – 8	Elevada
9 – 10	Muito elevada

Fonte: Fagerström, 2012

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

2017-6-23

Plataforma Brasil

Saúde



CARLOS ALBERTO GUEDES - Secretária | V3.0

Projetos Cadastros Administrativo Reunião Relatórios

UNESP - Instituto de Ciência Sua sessão expira em: 35 min 58

Você está em: CEP > Detalhar Notificação

DETALHAR NOTIFICAÇÃO

— DADOS DA VERSÃO 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 BUCAL

Pesquisador Responsável: JANETE DIAS ALMEIDA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 42387315.0.0000.0077

Submetido em: 06/04/2015

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

Situação da Versão do Projeto: Parecer Consubstanciado Emitido (Aprovado)

Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável

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



— DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Adição de genes complementares ao estudo.

Justificativa: O estudo dos genes GSTM1, GSTP1 e GSTT1 além dos genes CYP1A, CYP1B1 e CYP2A6, através da técnica RT-PCR, permitirá melhor interpretação dos resultados obtidos. Tais genes codificam proteínas envolvidas na fase II de metabolização de carcinógenos de álcool e tabaco. Tanto os genes da família CYP quanto GSTs, fazem parte do sistema de metabolização e excreção de xenobióticos, em suas fases I e II.

Data do Envio: 27/09/2016

Situação da Notificação: Notificação aceita

— DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

- ↳ Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 2
 - ↳ Projeto Original (PO) - Versão 2
 - ↳ Notificação (N5) - UNESP - Instituto de Ciê
 - ↳ Notificação (N4) - UNESP - Instituto de Ciê
 - ↳ Notificação (N3) - UNESP - Instituto de Ciê
 - ↳ Notificação (N2) - UNESP - Instituto de Ciê
 - ↳ Documentos da Notificação
 - ↳ Pareceres
 - ↳ Notificação (N1) - UNESP - Instituto de Ciê
 - ↳ Documentos da Notificação
 - ↳ Outros
 - ↳ Currículo dos Assistentes
 - ↳ Ceilna Faig Lima Carta
 - ↳ Documentos do Projeto
 - ↳ Folha de Rosto - Submissão 1
 - ↳ Informações Básicas do Projeto - Subm
 - ↳ Outros - Submissão 1
 - ↳ Projeto Detalhado / Brochura Investigad
 - ↳ TCLE / Termos de Assentimento / Justif
 - ↳ Apreciação 1 - UNESP - Instituto de Ciênci
 - ↳ Projeto Completo

Tipo de Documento ^	Situação ^	Arquivo ^	Postagem ^	Ações
Outros	Aceito	Notificacao.pdf	27/09/2016 22:31:49	

— HISTÓRICO DE TRÂMITES

Apreciação	Data/Hora	Tipo Trâmite	Versão	Autor	Perfil	Origem	Destino	Informações
N1	03/10/2016 17:24:49	Aceitação do PP	2	CARLOS ALBERTO GUEDES	Secretária	PESQUISADOR	UNESP - Instituto de Ciência e Tecnologia - Campus de São José dos Campos	
N1	27/09/2016 22:36:03	Notificação enviada	2	JANETE DIAS ALMEIDA	Pesquisador	PESQUISADOR	UNESP - Instituto de Ciência e Tecnologia - Campus de São José dos Campos	O estudo dos genes GSTM1, GSTP1 e GSTT1 além dos ver mais >>



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

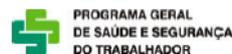
CPF	Nome	Telefone	E-mail
09218849824	JANETE DIAS ALMEIDA	(12) 3947-9078	janete@fosjc.unesp.br

Contato Celina Faig Lima Carta

ANEXO B – AUDIT – Teste de Identificação de Desordens Devido ao Uso de Álcool



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



PROGRAMA GERAL
DE SAÚDE E SEGURANÇA
DO TRABALHADOR

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 abstinência = 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.