

**Roberta Losi Guembarovski**

**ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* E  
DA PERDA DE HETEROZIGOSE EM 3p EM PORTADORES DE  
CARCINOMAS BUCAIS**

**Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Genética, do Departamento de Genética, UFPR, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Genética.**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Enilze M. S. F. Ribeiro**

**Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ilce Mara de Syllos Cólus**

**Curitiba**

**2007**

**Dedico este trabalho aos meus pais, Alda e Roberto, e ao meu marido, Márcio, pela dedicação, incentivo e amor, sempre.**

**A Deus, pela saúde, disposição e pela vida.**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro**, pela excelente orientação, dedicação, por ser um exemplo de profissional, por tudo que me ensinou neste período e, acima de tudo, por ter se tornado uma grande amiga, com certeza, para a vida toda. Nossos momentos dentro e fora da universidade aliviaram meu cansaço de viajar, de ficar fora de casa, longe da família. Será lembrada não apenas como minha orientadora, mas como uma das pessoas mais especiais que já conheci.

À minha co-orientadora, **Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus**, com quem trabalho há tantos anos, por tudo que me ensinou, desde o início, pela grande ajuda na elaboração e execução deste projeto e, acima de tudo, pela grande amizade e exemplo de profissionalismo, com certeza para toda vida. Ao longo destes quase dez anos de convivência e trabalho, aprendi muito mais do que apenas como ser uma boa profissional.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Iglénir João Cavalli**, por toda ajuda, orientação, paciência, dedicação e amizade ao longo destes quatro anos de convivência. Sem dúvida é hoje para mim um grande exemplo de profissionalismo, de respeito aos colegas, de ética. Sua preocupação com a formação pessoal dos profissionais me ensinou muito, jamais vou esquecer nossas conversas. Tornou-se uma pessoa muito especial em minha vida.

Algumas pessoas tiveram papel fundamental na realização deste projeto: **Fernando Polisel, Rodrigo Menezes, Vivian Nappi e Hellen Kuasne**, do Laboratório de Mutagênese da UEL. Muito obrigado, porque sem a preciosa ajuda de vocês este trabalho não teria se realizado. Além disso, se tornaram amigos, dentro e fora do laboratório, que espero manter por toda vida. Nunca vou esquecer nossos momentos de convivência, de descontração e de alegria.

A todos os **colegas do Laboratório de Citogenética Humana** da Universidade Federal do Paraná: Sarah, Giovana, Savana, Loraine, Márcia, Carol, Clarissa, Bruna, Virgínia, por toda a ajuda, sempre que precisei, e pelos momentos de alegria, amizade e descontração.

Ao **Marcos Euzébio Maciel**, em especial, pela amizade e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao **Andrei**, meu primo, e ao **Gustavo**, pela ajuda com as coletas e processamento das amostras, imprescindíveis na realização deste projeto.

Aos **colegas do Laboratório de Mutagênese da Universidade Estadual de Londrina**: Iara, Juliana, Mariana, Gustavo, e todos aqueles que de alguma forma me ajudaram e pelos momentos de alegria.

Ao **peçoal do Laboratório de Imunogenética** da Universidade Federal do Paraná, pela disposição em ajudar, sempre.

À **Liana**, em especial, por ter me ajudado muito na realização da segunda parte deste trabalho, sempre disposta a compartilhar seus conhecimentos. Além disso, se tornou uma amiga, alguém que passei a respeitar muito, como pessoa e como profissional.

À **Dani**, por estar sempre pronta e me ajudar, por tudo que colaborou para a realização deste trabalho, mas especialmente por ter se tornado uma grande amiga, de longas conversas, á quem muito admiro, pelo profissionalismo e pelo caráter. Espero que esta amizade seja pra sempre, independente da distância e do tempo.

À **Anilda**, técnica da SEAD, por estar sempre disposta a ajudar, pelos momentos divertidos que passamos, por ter sido indispensável para a realização deste trabalho.

Aos **professores do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná**, em especial a Nina, Maria Luíza, Marina, Erasto, Eleidi e Valéria, por tudo que me ensinaram dentro e fora das disciplinas que cursei.

Aos membros da **Banca de Acompanhamento**, Profa. Dra. Maria Luíza e Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, pelas sugestões durante a realização deste trabalho.

Aos médicos do **Hospital Erasto Gaertner**, de Curitiba, Dr. Gyl Ramos e Dr. Benedito de Oliveira, pela inestimável ajuda na obtenção das amostras.

Aos médicos e funcionários do **Hospital do Câncer de Londrina**, pela ajuda na obtenção das amostras.

Ao **Dr. Lauro Toyshi Mizuno**, do Centro de Odontologia da UEL, por estar sempre disposto a ajudar e pela grande colaboração durante o período de coleta das amostras.

À Profa. **Dra. Cláudia Rainho**, da UNESP de Botucatu, pelas preciosas dicas durante a realização deste trabalho e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos **meus pais, Alda e Roberto**, por terem me incentivado sempre, me apoiado, mesmo nos momentos mais difíceis. Por serem um exemplo de vida para mim, por nos amarmos tanto, pela nossa família me trazer tantas alegrias. Sem vocês, nada na minha vida teria sido possível. Meu muito obrigado hoje e sempre.

Ao **meu marido, Márcio**, por ter sempre me incentivado, por ter compreendido meus motivos para ficar fora de casa, por nunca ter me pedido para desistir de nada. Sua presença em minha vida me faz querer crescer ainda mais.

Ao **meu irmão, Marco**, por ser um grande amigo, por ter-me “aturado” em Curitiba por quatro anos, como sua hóspede, pelas nossas discussões, pela ajuda na realização deste projeto, pelo leva e busca todos os dias. Foi muito bom conviver com você.

A **todas as pessoas da minha família** que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado, amo todos vocês.

A **todas as minhas grandes amigas**: Gisele, Juliana, Luciana, Luciani, Liliane, Mirela, Renata, Sheila, Simoni, Tatiana. Vocês são muito importantes na minha vida, e sempre, de alguma forma, me motivaram a crescer. Adoro todas vocês.

A **todos os pacientes participantes desta pesquisa**, que mesmo em um momento difícil de suas vidas, souberam o valor da pesquisa e não se negaram a ajudar. Meu muito obrigado.

Às **Universidades Federal do Paraná e Estadual de Londrina**, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao **programa de Pós-graduação** da Universidade Federal do Paraná.

A **CAPES** pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 CÂNCERES DA CAVIDADE BUCAL.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Definição e Classificação.....	3
1.1.2 Diagnóstico e Prevenção.....	5
1.1.3 Tratamento e Prognóstico.....	7
1.1.4 Epidemiologia e Fatores de risco.....	9
<b>1.2 ASPECTOS GENÉTICOS EM CÂNCERES BUCAIS.....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Polimorfismo em genes responsáveis pela metabolização de xenobióticos.....	14
1.2.1.1 Superfamília Citocromo P450 - gene <i>CYP1A1</i> .....	16
1.2.1.2 Superfamília Glutathiona S-transferase - genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> .....	19
1.2.2 Perdas de heterozigose (LOH) e Instabilidade de microssatélites (MI).....	22
<b>2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	32
3.2 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	39
3.3 EXTRAÇÕES DE DNA GENÔMICO.....	39
3.4 REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR).....	41
3.4.1 Análise de presença/ausência em homozigose dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> .....	41
3.4.2 Análise do polimorfismo 3801T>C do gene <i>CYP1A1</i> .....	42
3.4.3 Análise de perda de heterozigose (LOH).....	44
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>

<b>4.1 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DOS GENES <i>CYP1A1</i>, <i>GSTM1</i> E <i>GSTT1</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1.2 Estudo de associação.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1.3 Análise dos parâmetros histopatológicos e clínico.....</b>	<b>59</b>
<b>4.2 MARCADORES MICROSSATÉLITES POLIMÓRFICOS EM 3p.....</b>	<b>62</b>
<b>4.2.1 Análise dos parâmetros histopatológicos e clínico.....</b>	<b>66</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>5.1 GENES CANDIDATOS DE SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER.....</b>	<b>72</b>
<b>5.2 MARCADORES MICROSSATÉLITES POLIMÓRFICOS EM 3p.....</b>	<b>81</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>94</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>96</b>
<b>8. APÊNDICES.....</b>	<b>119</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>127</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMAS BUCAIS.....	35
<b>TABELA 2.</b> INICIADORES E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO PARA OS GENES CANDIDATOS DE SUSCETIBILIDADE <i>CYP1A1</i> , <i>GSTM1</i> E <i>GSTT1</i> .....	47
<b>TABELA 3.</b> LOCALIZAÇÃO DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES SELECIONADOS PARA A ANÁLISE DE LOH NO BRAÇO CURTO DO CROMOSSOMO 3 .....	49
<b>TABELA 4.</b> NÚMERO DE INDIVÍDUOS COM E SEM GENÓTIPOS CONSIDERADOS DE RISCO E RESPECTIVAS ORS E INTERVALOS DE CONFIANÇA 95% PARA OS TRÊS GENESCANDIDATOS ANALISADOS.....	58
<b>TABELA 5.</b> DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM GENÓTIPOS CONSIDERADOS DE RISCO COM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE ENVOLVIMENTO DE LINFONODOS REGIONAIS.....	60
<b>TABELA 6.</b> DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM GENÓTIPOS CONSIDERADOS DE RISCO COM GRAUS II E III DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL.....	60
<b>TABELA 7.</b> DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM GENÓTIPOS CONSIDERADOS DE RISCO COM OCORRÊNCIA OU NÃO DE ÓBITO.....	60
<b>TABELA 8.</b> MÉDIAS EM CM DOS TAMANHOS DOS TUMORES DOS PACIENTES COM E SEM GENÓTIPOS CONSIDERADOS DE RISCO.....	61
<b>TABELA 9.</b> ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS APRESENTADOS NA TABELA 8.....	61
<b>TABELA 10.</b> FREQUÊNCIAS DE HETEROZIGOSE E DAS PERDAS ALÉLICAS OBTIDAS NOS SETE MARCADORES MICROSSATÉLITES ANALISADOS.....	65
<b>TABELA 11.</b> MÉDIAS DOS TAMANHOS DOS TUMORES E NÚMERO DE PACIENTES COM E SEM LOH PARA OS SETE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM 3p.....	66

<b>TABELA 12.</b> ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TAMANHOS DOS TUMORES DOS PACIENTES COM E SEM LOH PARA OS SETE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM 3p.....	67
<b>TABELA 13.</b> NÚMERO DE PACIENTES COM E SEM LOH E COM GRAUS II E III DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL NOS SETE MARCADORES ANALISADOS E RESULTADOS DO TESTE DO X <sup>2</sup> DE HOMOGENEIDADE.....	67
<b>TABELA 14.</b> NÚMERO DE PACIENTES COM E SEM LOH E COM E SEM OCORRÊNCIA DE ÓBITO NOS SETE MARCADORES ANALISADOS E RESULTADOS DO TESTE DO X <sup>2</sup> DE HOMOGENEIDADE.....	68
<b>TABELA 15.</b> NÚMERO DE PACIENTES COM E SEM LOH E COM E SEM INVASÃO DE LINFONODOS REGIONAIS NOS SETE MARCADORES ANALISADOS E RESULTADOS DO TESTE DO X <sup>2</sup> DE HOMOGENEIDADE.....	68

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> PERFIS DE PCR PARA OS POLIMORFISMOS DOS GENES <i>GSTM1</i> E <i>GSTT1</i> .....	48
<b>FIGURA 2.</b> PERFIS DE PCR PARA O POLIMORFISMO <i>3801T&gt;C</i> DO GENE <i>CYP1A1</i> ...48	48
<b>FIGURA 3.</b> POSIÇÕES RELATIVAS DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES MAPEADOS NO BRAÇO CURTO DO CROMOSSOMO 3 UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE LOH.....	50
<b>FIGURA 4.</b> EXEMPLO DE PERFIL DOS ALELOS DO MARCADOR D3S1274.....	51

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- CCE** - carcinoma de células escamosas
- CCECP** - carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço
- CYP** - citocromo P450
- CYP1A1* - citocromo P450, subfamília 1A, polipeptídeo 1
- CYP2E1* - citocromo P450, subfamília 2E, polipeptídeo 1
- CYP2D6* - citocromo P450, subfamília 2D, polipeptídeo 6
- DNA** - ácido desoxirribonucléico
- EPHX1* - epoxide hydrolase 1
- FHIT* - fragile histidine triad gene
- GDB** - Genome Data base
- Grau I** - tumor bem diferenciado
- Grau II** - tumor moderadamente diferenciado
- Grau III** - tumor pouco diferenciado
- GST** - glutathione-S-transferase
- GSTM1* - glutathione S-transferase M1
- GSTT1* - glutathione S-transferase theta1
- HOMO** – indivíduo homozigoto
- HET** – indivíduo heterozigoto
- HPV** - papiloma vírus humano
- IC** - intervalo de confiança
- ILR** - invasão de linfonodos regionais
- INCA** - Instituto Nacional do Câncer
- LOH** - perda de heterozigose (lost of heterozygosity)
- MI** - instabilidade de microssatélites (microsatellite instability)
- NATS** – N-acetiltransferases
- NAT2* - N-acetiltransferase 2
- OMS** - Organização Mundial da Saúde
- OR** - razão de probabilidade (Odds Ratios)

**PAHs - hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**

**PCR - reação em cadeia da polimerase**

***RARB - retinoic acid receptor beta***

***RASSF1A - ras association domain family protein 1***

**RFLP - polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição**

**SNPs - polimorfismo de base única (single nucleotide polymorphism)**

***VHL - von Hippel-Lindau syndrome***

**3p - braço curto do cromossomo três**

## RESUMO

Os cânceres de cabeça e pescoço, incluindo os da cavidade bucal, apresentam uma alta incidência no Brasil e a sobrevida média de aproximadamente cinco anos permanece como uma das menores entre os principais tipos de tumores malignos. Existe uma correlação entre enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos, o uso do tabaco e a suscetibilidade genética a este tumor. Alterações genéticas no braço curto do cromossomo 3 (3p), sugerem que esta região possa conter genes supressores tumorais, como os já mapeados *RARB*, *FHIT* e *VHL*, envolvidos na etiologia desta neoplasia. No presente estudo foram avaliados genes candidatos de suscetibilidade ao câncer (*CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1*) em 91 pacientes portadores de carcinomas epidermóides bucais e em 81 controles sem história de neoplasias, pareados por idade, sexo, etnia e hábito tabagista. O envolvimento da região 3p foi investigado quanto à perda de heterozigose (LOH) pela análise de sete marcadores microssatélites em 75 dos pacientes da amostra. PCR-RFLP e PCR-Multiplex foram utilizadas na detecção das variantes dos genes do metabolismo. Nas análises de LOH, foram utilizados DNAs sangüíneos e tumorais e as reações de PCR foram realizadas utilizando-se iniciadores marcados com agentes fluorescentes (D3S1286, D3S1263, D3S1274, D3S1581, D3S1300, D3S1079 e D3S1307). A análise da variância e o teste do Qui-Quadrado foram utilizados, respectivamente, na comparação entre as médias dos tamanhos tumorais e na análise de parâmetros histopatológicos (tamanho do tumor, invasão de linfonodos regionais e grau de diferenciação tumoral) e clínico (óbito), para os dez marcadores moleculares. O estudo de associação caso-controle indicou ausência de associação positiva ou negativa: *CYP1A1* (OR=1,24 – IC95%=0,67-2,31); *GSTM1* (OR=0,61 – IC95%=0,33-1,11) e *GSTT1* (OR=1,24 – IC95%=0,65-2,38). A análise combinada dos genótipos também mostrou ausência de associação: (OR=0,94 – IC95%=0,42-2,10) para indivíduos com dois genótipos considerados de risco e (OR=0,88 – IC95%=0,25-3,17) para indivíduos com três genótipos considerados de risco. Na análise dos parâmetros histopatológicos e clínicos, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas. Em relação aos marcadores microssatélites, em todos os locos analisados foram encontradas freqüências de LOH elevadas, variando de 37,1% para o marcador D3S1263 a 55,2% para o marcador D3S1286. Dos sete marcadores analisados, seis (D3S1286, D3S1079, D3S1300, D3S1274, D3S1307 e D3S1581) mostraram freqüências de LOH próximas ou superiores a 50%. A análise da freqüência de LOH em locos combinados também mostrou uma alta taxa de perda alélica, variando de 79,1% (em pelo menos um dos locos) a 23,6% (em quatro ou dos mais locos). O parâmetro invasão de linfonodos regionais apresentou um resultado significativo para dois dos sete marcadores analisados: D3S1263 ( $\chi^2_1=8,94$ ;  $P<0,01$ ) e D3S1307 ( $\chi^2_1=5,64$ ;  $P<0,05$ ). Com base nestes resultados, concluímos que, nesta amostra, as variantes alélicas dos genes candidatos de suscetibilidade *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* não influenciaram o desenvolvimento dos tumores bucais, porém, as altas taxas de LOH ressaltam a importância da região cromossômica 3p e dos genes *RASSF1*, *RARB*, *FHIT* e *VHL* no desenvolvimento deste tipo de neoplasia.

## ABSTRACT

The head and neck tumors, including oral cavity, present a high incidence in Brazil and the median survival of up five years continues one of the lowest among the common types of cancers. Many studies have been demonstrating the importance of the correlation between xenobiotic metabolizing enzymes, the use of tobacco and the susceptibility to oral cancer. Genetic alterations in the short arm of chromosome 3 (3p), suggest that this region may contain tumor suppressor genes, as the already mapped *RARB*, *FHIT* and the *VHL*, involved in the etiology of this neoplasia. In the present study, putative cancer susceptibility genes (*CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1*) were evaluated in 91 patients with oral squamous cell carcinomas and in 81 healthy controls, matched by age, gender, ethnic group and smoking habit. Loss of heterozygosity (LOH) at 3p region was investigated using microsatellite markers analysis in 75 patients. PCR-RFLP and PCR-Multiplex were used to detect genes variants. Peripheral blood DNA as control and tumor DNA were used to perform LOH analysis and the PCR reactions were performed with labeled primers with fluorescent agents (D3S1286, D3S1263, D3S1274, D3S1581, D3S1300, D3S1079, D3S1307). The variance analysis and the Chi-square test were used respectively, to compare the tumour size mean and in the analysis of the histopathological (tumor size, lymph node invasion and tumor differentiation) and clinical (death) parameters, for the ten molecular markers. The case-control association study did not detect positive or negative association: *CYP1A1* (OR=1,24 – IC95%=0,67-2,31); *GSTM1* (OR=0,61 – IC95%=0,33-1,11) and *GSTT1* (OR=1,24 – IC95%=0,65-2,38). The combining genotypes analysis also showed an absence of association: (OR=0,94 – IC95%=0,42-2,10) for individuals with two considered risk genotypes and (OR=0,88 – IC95%=0,25-3,17) for individuals with three considered risk genotypes. When the analysis of the histopathological and clinical parameters were performed no statistical significant differences were found. For microsatellites markers, in all loci analyzed we found a high frequency of LOH, varying of 37.1% for the marker D3S1263 to 55.2% for the marker D3S1286. Among the seven markers analyzed, six (D3S1286, D3S1079, D3S1300, D3S1274, D3S1307 and D3S1581) showed frequencies near or superior to 50%. The combining loci analysis also showed a high frequency of allelic loss, varying of 79.1% (in at least one locus) to 23.6% (in four or more locus). A significant result in two out of seven markers analyzed: D3S1263 ( $\chi^2_1=8.94$ ;  $P<0.01$ ) and D3S1307 ( $\chi^2_1=5.64$ ;  $P<0.05$ ) was seen in the analysis of lymph node invasion. Based in these results, we conclude that, in this sample, the allelic variants of the putative susceptibility genes *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* did not have influence in the development of oral cancer, however, the high frequencies of LOH point to the importance of the genomic region 3p and the genes *RASSF1*, *RARB*, *FHIT* and *VHL* in the development of these neoplasia.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença associada a alterações genéticas múltiplas, originando-se a partir de uma célula normal que acumulou mutações após sucessivas divisões celulares num processo de evolução clonal (CAVENEY e WHITE, 1995). Em geral, as mutações incluem alterações de seqüência, perdas, ganhos ou rearranjos em diversos genes, a maioria, segundo KOCH et al. (1994), relacionados ao crescimento e proliferação celular.

Os cânceres humanos são, na sua maioria, de origem somática resultantes da interação de fatores genéticos e ambientais (PERERA, 1997). Cerca de 5% a 10% são hereditários, provenientes de mutações na linhagem germinativa (FEARON, 1997). Dessa forma, o câncer é uma doença genética e a identificação e a caracterização dos genes envolvidos na sua origem e progressão é fundamental para a compreensão das bases moleculares desta doença. Este conhecimento contribui de forma decisiva para o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis e terapias mais eficazes (PARMIGIANI e CAMARGO, 2004).

A origem e o desenvolvimento neoplásico são caracterizados por alterações em dois grupos principais de genes: os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais (CHANG et al., 1995; HANAHAN e WEINBERG, 2000). Genes associados aos mecanismos de reparo aos danos do DNA são considerados como um terceiro grupo, que pode atuar direta ou indiretamente no processo de carcinogênese (HOEIJMAKERS, 2001).



Os proto-oncogenes são genes celulares normais que atuam no controle positivo do crescimento e diferenciação celular (IRISH e BERNSTEIN, 1993). São genes capazes de induzir ou manter a transformação celular em animais experimentais ou em culturas de células. Podem tornar-se oncogenes por meio de mutações resultantes da exposição aos carcinógenos, radiação ou através de infecções virais. A ativação desses genes ocorre através de translocações cromossômicas, ampliações gênicas ou mutações de ponto (KNUDSON, 1985), de maneira que alterações em um único alelo são suficientes para a transformação maligna da célula. Como consequência dessas alterações, a expressão dos oncogenes leva a uma proliferação celular anormal, resultando na transformação tumoral (COOPER, 1994).

Os genes supressores tumorais atuam como reguladores negativos da proliferação celular (VERMA e TRIANTAFILLOU, 1998). Sabe-se que as proteínas codificadas por eles fazem parte das vias de sinalização celular, retardando a progressão do ciclo, bloqueando a diferenciação ou induzindo a morte celular programada ou apoptose. Conseqüentemente, alterações inativadoras liberariam a célula da inibição imposta por estes genes, levando à proliferação desordenada, característica das células cancerosas (WEINBERG, 1991).

A análise da distribuição proporcional das causas de morte no Brasil mostra que, desde a década de 30, as neoplasias malignas, juntamente com as doenças do aparelho circulatório, são responsáveis por um número cada vez maior de óbitos, apontando para uma mudança no perfil de mortalidade semelhante àquela observada nos países desenvolvidos. Os tumores malignos de cabeça e pescoço pela expressiva

incidência e mortalidade, se constituem em relevante preocupação para a saúde mundial, particularmente nos países em desenvolvimento (PISANI et al., 2002).

As taxas de mortalidade, entretanto, variam entre as etnias, sexos e grupos etários. São encontradas grandes diferenças nas faixas anuais de incidência e mortalidade para o carcinoma bucal, por exemplo, variando até 20 vezes entre diferentes países. Muitas destas refletem diferentes hábitos das populações, expectativa de vida, educação preventiva e a qualidade dos relatórios médicos nos diferentes países. No Brasil, cânceres de cavidade bucal possuem uma alta prevalência, provavelmente pelo fato do país ser subdesenvolvido, e a maior parte da população não possuir acesso à saúde pública, incluindo a dentária, e à alimentação e higiene adequadas (DAMM e BOUQUOT, 1998).

## **1.1 CÂNCERES DA CAVIDADE BUCAL**

### **1.1.1 - Definição e Classificação**

Os cânceres de cabeça e pescoço são responsáveis por uma substancial morbidade e mortalidade por câncer. Os sítios anatômicos do trato aéreo digestivo superior acometidos compreendem: cavidade bucal, faringe, nasofaringe, hipofaringe, fossa nasal, laringe e glândulas (CANEVARI e ROGATTO, 2004), incluindo-se, como cânceres da cavidade bucal, aqueles que acometem: lábio, língua, gengiva, assoalho da boca, palato, glândulas salivares, amígdalas e orofaringe. O câncer bucal é o mais comum dentre os tumores de cabeça e pescoço (LIPPMAN e HONG, 2001), sendo o

tipo histológico mais prevalente o carcinoma de células escamosas (CCE) (ZAKRZEWSKA, 1999). Estes tumores surgem no epitélio superficial e a graduação histopatológica em que se encontram baseia-se na semelhança com o tecido original (epitélio escamoso) e relaciona-se ao seu comportamento biológico. As lesões são classificadas em uma escala, de maneira que os tumores menos diferenciados recebem os numerais mais altos (DAMM e BOUQUOT, 1998).

Segundo ZAKRZEWSKA (1999), os tipos mais comuns de cânceres encontrados na cavidade bucal são:

1) Carcinomas epiteliais

1.1. de células escamosas

--- verrucosos

--- de células fusiformes

--- adenóide-escamosos

1.2. de células basais

1.3. melanomas

2) Odontogênicos

3) Tumores ósseos primários

4) Tumores de glândulas salivares

-- mucoepidermóides

-- de células actínicas

-- adenocarcinomas

- 5) Hematopoiéticos
- 6) Linforeticulares
- 7) Metástases

### **1.1.2 - Diagnóstico e Prevenção**

O câncer de cavidade bucal causa grande morbidade e mortalidade, resultante da detecção tardia da doença, já em estágios avançados e com a presença de metástases (SMART, 1993; SCULLY e PORTER, 2000). Novos métodos para seu controle, incluindo prevenção e detecção precoce, vêm sendo desenvolvidos (LIPPMAN e HONG, 2001), o que facilitará o tratamento e terá uma influência sobre a sobrevivência (SMART, 1993).

Embora passível de prevenção e detectável em estágios iniciais, o carcinoma bucal não tem recebido suficiente atenção por parte da população e dos profissionais da saúde, sendo que muitos casos são diagnosticados em estágios avançados, apesar de serem visíveis e palpáveis com facilidade (KOWALSKI (1991); VANDERLEI et al., 1998). Segundo CARVALHO et al. (2004), o diagnóstico desta neoplasia no Brasil é, em geral, realizado mais tardiamente do que em países desenvolvidos.

A biópsia com anestesia local é considerada o melhor e mais simples método para o diagnóstico (ZAKRZEWSKA, 1999). Atualmente a ressonância magnética pode auxiliar na determinação da extensão da lesão.

O carcinoma escamoso se manifesta de diferentes maneiras, mas a maior parte das lesões iniciais é assintomática. Algumas lesões malignas apresentam pequenas úlceras indolores, enquanto que outras de malignidade intermediária podem apresentar ulceração persistente com fixação dos tecidos adjacentes e aumento de linfonodo regional (ZAKRZEWSKA, 1999).

Algumas lesões, como a leucoplasia, são consideradas como pré-malignas, mas ainda não existem evidências clínicas ou histológicas suficientes para determinar quais delas possuem potencial maligno (LIPPMAN e HONG, 2001; SUDBO et al., 2001).

A prevenção primária ao câncer bucal envolve evitar o hábito tabagista, já que a regressão de lesões pré-malignas tem sido observada em indivíduos ex-fumantes (GUPTA et al., 1995), além do consumo não elevado de bebidas alcoólicas e da adoção de uma alimentação saudável como medidas auxiliares de prevenção (INCA, 2006).

Em resumo, o estilo de vida e a educação dos pacientes são de grande importância na prevenção deste câncer. Segundo dados do INCA (2006), devem-se estimular a higiene bucal e a assistência odontológica como medidas de prevenção. Nos indivíduos de maior risco (fumantes e consumidores de bebidas alcoólicas), o exame clínico da boca deve ser extremamente cuidadoso, devendo os indivíduos com suspeita serem encaminhados a centros de referência em oncologia, objetivando a detecção precoce da doença, considerada a forma mais efetiva de prevenção da morbidade e da mortalidade.

Assim, vários estudos ressaltam a importância do cirurgião-dentista na redução da incidência da doença através de sua participação nos esforços preventivos, antecipação do diagnóstico, orientação dos tratamentos e na reabilitação dos pacientes (BIAZEVIC et al., 2006).

### **1.1.3 - Tratamento e Prognóstico**

O tratamento do carcinoma bucal é orientado pelo estágio clínico e histopatológico da doença e consiste em ampla excisão cirúrgica, radioterapia, ou uma combinação de ambos. Tradicionalmente, a quimioterapia é utilizada apenas em casos de recorrência da doença ou na presença de metástase (RODRIGUEZ-MONGE et al., 1997).

Mais de dois terços dos pacientes com tumores malignos de cabeça e pescoço são diagnosticados nos estágios III e IV, onde cirurgia seguida de radioterapia tem sido o procedimento padrão. Para aqueles pacientes em estágios iniciais da doença (I e II), cirurgia e radioterapia são empregadas com o intuito de levar a cura, que é alcançada em até 80% dos casos para pacientes de grau I e cerca de 60% para pacientes de grau II. Pacientes em estágios III e IV, em mais de 50% dos casos, desenvolvem recorrência local e em aproximadamente 30% dos casos evoluem para metástases distantes, o que diminui a eficácia do tratamento (RODRIGUEZ-MONGE et al., 1997).

Pacientes com doença metastática ou recorrente, os quais são submetidos à quimioterapia, possuem tempo de vida reduzido, uma vez que o tratamento quimioterápico é paliativo. Alguns dos agentes comumente empregados, com taxas de resposta que variam de 15% a 40%, incluem cisplatina, bleomicina, fluoracil, dentre outros (RODRIGUEZ-MONGE et al., 1997).

O tamanho do tumor, a presença ou não de metástases e o envolvimento de linfonodos regionais são os melhores indicadores de prognóstico do paciente (DAMM e BOUQUOT, 1998; NAGPAL e DAS, 2003). A taxa de sobrevida de cinco anos livre da doença é de cerca de 70% se não houver metástase ao diagnóstico, podendo variar de 30-50% na presença das mesmas (DAMM e BOUQUOT, 1998; SCULLY e PORTER, 2000; LIPPMAN e HONG, 2001).

Apesar dos avanços, a sobrevida dos pacientes tem permanecido praticamente inalterada ao longo dos anos. Acredita-se que isto resulte de uma combinação de diagnóstico tardio e terapia inadequada (DAMM e BOUQUOT, 1998). Relatos da literatura indicam ainda que o estilo de vida do paciente influencie no sucesso do tratamento, pois, aqueles que mantêm a exposição aos fatores de risco, principalmente cigarro e álcool, apresentam um pior prognóstico em relação a pacientes que optam pelo abandono destes (SCULLY e PORTER, 2000).

#### **1.1.4 - Epidemiologia e Fatores de Risco**

A epidemiologia do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) é extremamente complexa devido à natureza multigênica da doença, sendo considerada uma doença progressiva resultante do acúmulo de alterações em genes reguladores da proliferação e diferenciação celular (CALIFANO et al., 1996; NAGPAL e DAS, 2003; CANEVARI e ROGATTO, 2004).

Esta neoplasia tem sido considerada como o sexto tipo mais comum no mundo (BOYLE et al., 1992; PARKIN et al., 1993, 2001) e o sétimo no Brasil, estando entre as principais causas de óbito por câncer (INCA, 2006). Milhares de novos casos são detectados por ano no mundo (só no Brasil são mais de 10.000) e sua incidência vem aumentando (CLARK, 1999; ZAKRZEWSKA, 1999). A taxa de mortalidade já é semelhante àquela atribuída aos cânceres de mama, cervicais e melanomas (JOHNSON e WARNAKULASURIYA, 1993).

A distribuição mundial do câncer bucal varia muito, mas as maiores incidências ocorrem na Índia, onde é o tipo mais comum (BOYLE et al., 1992; BARTSCH, 2000) e no Sri Lanka, onde corresponde a cerca de 40% de todos os cânceres diagnosticados (CLARK, 1999). No entanto, um aumento na incidência deste tumor vem sendo descrito no oeste e centro da Europa, especialmente entre homens jovens. Apesar disso, é incomum em países desenvolvidos, exceto em partes da França, mas se encontra disseminado no mundo subdesenvolvido, particularmente no sudeste da Ásia e no Brasil, principalmente em indivíduos pertencentes a classes sócio-econômicas menos favorecidas (SCULLY e PORTER, 2000).



No Brasil ocorre a mais alta incidência deste câncer da América Latina, com grandes variações por regiões geográficas do país. A cidade de São Paulo registra isoladamente a mais alta incidência das Américas (WÜNSCH-FILHO e CAMARGO, 2001; WÜNSCH-FILHO, 2002).

Na população brasileira a apresentação clínica é mais grave do que em países desenvolvidos, com doença mais avançada ao diagnóstico e alta taxa de segundo tumor primário. Segundo a Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil para o ano de 2006 (INCA, 2006), o câncer de boca, deve ter apresentado cerca de 13.470 novos casos, sendo 10.060 casos estimados entre os homens e 3.410 entre as mulheres. No Estado do Paraná estimou-se cerca de 1.080 novos casos, sendo 210 apenas na capital Curitiba.

De um modo geral, este tipo de neoplasia afeta indivíduos do sexo masculino, em torno dos 60 anos, fumantes e de baixa renda (CLARK, 1999; SCULLY e PORTER, 2000). Nos últimos anos a razão entre homens e mulheres tem se mostrado em declínio como decorrência do aumento da incidência entre as mulheres. A mais alta incidência neste sexo é encontrada em asiáticas e está relacionada com hábitos culturais de consumo de tabaco (CLARK, 1999; McMAHON e CHEN, 2003).

Com relação aos fatores de risco, acredita-se que sua distribuição varia consideravelmente nas diferentes populações (CANEVARI e ROGATTO, 2004), mas parece não haver um fator causador (carcinógeno) isolado, claramente definido, pois tanto fatores extrínsecos quanto intrínsecos podem atuar, sendo provável que mais de um seja necessário (DAMM e BOUQUOT, 1998).

Os fatores de risco intrínsecos incluem estados sistêmicos, como a desnutrição, anemia por deficiência de ferro e deficiência imune. Os fatores extrínsecos incluem o tabaco e o álcool, considerados os dois principais, uma dieta pobre em frutas e vegetais e exposição ao HPV, especialmente dos tipos 16 e 18 (DAMM e BOUQUOT, 1998; CLARK, 1999; SCULLY e PORTER, 2000).

Cigarro e álcool parecem possuir um efeito sinérgico e dependente de dose, gerando um risco cerca de 20 vezes maior em relação a indivíduos não-fumantes e não consumidores de álcool (GAUDET et al., 2004; LAZARUS e PARK, 2000). Outros fatores de risco são: idade superior a 40 anos, má higiene bucal e uso de próteses dentárias mal-ajustadas.

Estudos epidemiológicos demonstram que o tabaco é o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer bucal (ZAKRZEWSKA, 1999; SCULLY e PORTER, 2000). Este fato se deve à presença, na sua composição, de cerca de 300 compostos carcinogênicos, que são convertidos em metabólitos reativos capazes de interagir com o DNA pela ação das enzimas oxidativas (CANEVARI e ROGATTO, 2004). Além disso, de acordo com DAMM e BOUQUOT (1998), o uso de tabaco sem fumaça ou “cuspo de tabaco”, em culturas ocidentais, também é considerado um fator de risco em usuários crônicos.

Quanto à importância do álcool, embora seja desconhecido o mecanismo pelo qual este induz a carcinogênese, supõe-se que células basais e epiteliais da cavidade bucal devem ser alteradas por elevadas concentrações de etanol diretamente na mucosa exposta e, subseqüentemente, por concentrações mais altas de carcinógenos e pró-

carcinógenos oriundos de seu metabolismo (LAZARUS e PARK, 2000; CANEVARI e ROGATTO, 2004).

Segundo SCHLECHT et al., (1999), no que diz respeito ao alcoolismo, sua participação no risco de neoplasias do trato aéreo-digestivo superior foi descrita no Brasil não apenas como fator independente, mas como efeito de interação com o tabaco. DAMM e BOUQUOT (1998) afirmam que aproximadamente um terço dos pacientes com carcinoma bucal é etilista. HAMADA et al., (1991) afirmaram que o álcool e o tabaco seriam responsáveis por níveis de incidência de câncer bucal no Brasil comparáveis aos da Índia, país em que o risco mais elevado do mundo tem sido associado ao hábito de mascar tabaco.

JOHNSON (1991) verificou que existem poucas evidências de que a higiene bucal e infecções de origem viral ou fúngica possuam um importante papel como fatores de risco. Entretanto, existem fortes evidências na literatura de que a infecção ao vírus HPV esteja correlacionada ao desenvolvimento de CCECP, sendo estes detectados em indivíduos mais jovens, com histórico de prática de sexo oral e número elevado de parceiros sexuais (PEREZ-ORDOÑEZ et al., 2006).

Já o consumo de frutas e vegetais parece possuir um efeito protetor, especialmente aqueles ricos em vitaminas A, C e betacaroteno. Contrariamente, carnes e pimentas vermelhas são considerados fatores de risco (FRANCO et al., 1989; GAUDET et al., 2004). RODRIGUEZ et al. (2004) estudando uma população jovem encontraram associação entre baixo consumo de vegetais e desenvolvimento de tumores malignos bucais, além de terem observado efeito protetor para o consumo de frutas e café. Quando combinaram a alimentação ao hábito tabagista e etilista, os

mesmos autores correlacionaram estes fatores a 85% dos casos naqueles pacientes com idade inferior a 46 anos.

Estudos epidemiológicos descrevem ainda associação entre câncer bucal e exercício de determinadas ocupações, como por exemplo: agricultura, pintura, carpetaria, dentre outras. Exposições ocupacionais a substâncias químicas específicas também têm sido descritas, tais como formaldeído e herbicidas (ANDREOTTI et al., 2006). Segundo estes autores, no Brasil não existem pesquisas reportando especificamente os efeitos da ocupação na gênese do câncer bucal.

Estudos de pacientes portadores de CCE bucal indicam também a história familiar como um fator de risco, com uma discreta associação, o que parece ter relação com o ambiente comum de exposição ambiental a cigarro e álcool (GOLDSTEIN et al., 1994 apud ZAKRZEWSKA, 1999; NAGPAL e DAS, 2003).

De acordo com CLARK (1999), a procura pelo dentista em caso de surgimento de lesão, também é um fator de grande importância, já que segundo BIAZEVIC et al. (2006), maior acesso aos serviços de saúde propicia condições mais favoráveis para o diagnóstico precoce e o sucesso terapêutico.

Considerando-se o aumento de incidência e o lento progresso na oncologia de cabeça e pescoço, torna-se importante a investigação genética na tentativa de identificar marcadores moleculares para esta doença (SUDBO et al., 2001). Segundo CANEVARI e ROGATTO (2004), em conjunto, os fatores de risco não explicam adequadamente todos os casos de carcinomas de cabeça e pescoço e esta disparidade sugere a existência de fatores genéticos para o desenvolvimento destas neoplasias.

## **1.2 ASPECTOS GENÉTICOS EM CÂNCERES BUCAIS**

### **1.2.1 - Polimorfismos em Genes Responsáveis pela Metabolização de Xenobióticos**

Muitas doenças complexas são determinadas por três fatores principais: o estilo de vida, a exposição ambiental e a suscetibilidade genética. Estudos epidemiológicos estimam que cerca de 90% dos cânceres estão relacionados a fatores ambientais. Tumores malignos de cabeça e pescoço, que incluem os da cavidade bucal, seguem esta mesma linha (LICHTENSTEIN et al., 2000; SCULLY et al., 2000).

De acordo com análises da incidência de carcinomas de cabeça e pescoço, sugere-se que estes tumores surgem após seis a dez eventos genéticos independentes. Atualmente é aceita a hipótese de que o carcinoma bucal segue este padrão no seu desenvolvimento, sendo precedido por lesões pré-malignas (displasias, leucoplasias e eritroplasias) e evoluindo para o carcinoma com o acúmulo de mutações. Entretanto, a natureza precisa das alterações genéticas que ocorrem em cada passo, desde a iniciação até a progressão da doença, não está ainda totalmente esclarecida, o que ressalta a necessidade de estudos genético-moleculares adicionais (DASGUPTA et al., 2002; NAGPAL e DAS, 2003).

A importância do estilo de vida, principalmente o uso do álcool e do tabaco, além do papel da dieta já está bem determinada. Como 25% dos pacientes desenvolvem tumores malignos de cabeça e pescoço na ausência destes ou de outros fatores de risco, sugere-se que a predisposição genética possua um papel relevante na

etiologia tumoral (LICHTENSTEIN et al., 2000; SCULLY et al., 2000; HATAGIMA, 2002; RODRIGUEZ et al., 2004).

A suscetibilidade individual ao câncer pode resultar de vários fatores relacionados ao metabolismo de xenobióticos, reparo do DNA, expressão de genes supressores de tumor e de proto-oncogenes (HATAGIMA, 2002). Segundo GATTÁS (2001), pode-se estimar o risco individual de câncer pela avaliação dos seguintes aspectos: expressão de um agente ambiental ou de seus metabólitos (biomarcadores de exposição); identificação de alterações genéticas nos tumores (biomarcadores de efeito ou de resposta); identificação de indivíduos propensos a ter câncer quando expostos a substâncias carcinogênicas (biomarcadores de suscetibilidade).

Durante a evolução, a espécie humana se tornou capaz de metabolizar um grande número de compostos químicos que se acumulam nas células e podem causar danos para a saúde. O metabolismo é o principal mecanismo para manter a homeostasia durante a exposição dos organismos aos xenobióticos. O equilíbrio das taxas de absorção e eliminação dos mesmos tem um papel importante na prevenção de danos no DNA (HATAGIMA, 2002).

Variações no metabolismo individual têm sido relacionadas a variantes alélicas de genes que codificam enzimas envolvidas na ativação e detoxificação de carcinógenos químicos. Tais variações são atribuídas à presença de polimorfismos genéticos, os quais, muitas vezes, estão correlacionados à suscetibilidade a determinados tipos tumorais. De crucial importância tem sido identificar quais destas variantes são importantes na etiologia do câncer e quais podem ser consideradas irrelevantes (HATAGIMA, 2002; WÜNSCH e ZAGO, 2005).

Segundo WÜNSCH e ZAGO (2005), pesquisas abordando simultaneamente a prevalência de polimorfismos genéticos e exposição a fatores ambientais contribuirão na compreensão da etiologia do câncer e, ainda, trarão novas contribuições sobre o prognóstico e a terapia da doença.

Uma vez que a carcinogênese é influenciada por vários genes, uma única variante polimórfica possui, individualmente, um efeito pequeno, mas o risco populacional atribuído a tais genes de suscetibilidade pode ser grande e deve ser levado em consideração, justificando a realização da análise de várias variantes simultaneamente (SHIELDS et al., 2000 apud NORPPA, 2003).

As variantes alélicas do metabolismo de xenobióticos que têm sido associadas de forma mais consistente com o aumento do risco de câncer incluem aquelas pertencentes às famílias do Citocromo P450 (CYPs), das Glutathiona S-transferases (GSTs) e das N-acetil-transferases (NATs) (GATTÁS, 2001).

#### **1.2.1.1 - Superfamília Citocromo P450 - gene *CYP1A1***

A superfamília de genes do citocromo P450 codifica numerosas enzimas que catalisam uma variedade de reações químicas e metabolizam um grande número de substratos exógenos e endógenos, como lipídeos e esteróides (CASCORBI, 2006). Conseqüentemente, é considerado o sistema biológico de metabolização mais versátil conhecido, sendo encontrado em procariotos e eucariotos. Todos os genes desta superfamília evoluíram a partir de um ancestral comum, há cerca de dois bilhões e meio de anos (CONFORTI, 2004).

Presume-se que no genoma humano existam em torno de 60 a 100 genes codificadores de enzimas P450, muitos deles envolvidos na codificação de enzimas que metabolizam compostos exógenos. Os substratos para CYP450 incluem: vitaminas, esteróides, ácidos graxos, prostaglandinas, amins e xenobióticos de um modo geral, tais como drogas, carcinógenos ambientais, antioxidantes, solventes, anestésicos, corantes, pesticidas, produtos derivados do petróleo, álcoois, entre outros (CONFORTI, 2004).

As isoenzimas P450 estão divididas em famílias denominadas: CYP1, CYP2 e CYP3 com base em sua relação evolutiva, similaridade de seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos. As freqüências das variantes alélicas da superfamília CYP diferem entre as etnias (SHASTRY, 2006) e, até o momento, as que parecem mais relevantes para a carcinogênese são as que envolvem os genes *CYP1A1*, *CYP2E1* e *CYP2D6*.

O *CYP1A1* é considerado um gene chave no metabolismo de carcinógenos, constituindo-se num biomarcador de suscetibilidade ao câncer, particularmente naqueles tumores ligados ao hábito tabagista. Localiza-se no cromossomo 15 e codifica uma isoenzima que catalisa a oxidação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) em produtos fenólicos e epóxidos. A indução da expressão deste gene ocorre via ligação do composto indutor ao receptor, que ativa a transcrição de outros genes que codificam proteínas envolvidas na metabolização de xenobióticos (HAWAJIRI et al., 1993). Dentre os PAHs metabolizados por esta enzima, encontra-se o benzo(a)pireno, um potente carcinógeno presente na fumaça do cigarro, que é transformado em benzopireno diol epóxido (BPED), um composto altamente reativo, capaz de formar ligações covalentes com o DNA (CASCORBI, 2006). Além dos



PAHs, a expressão do gene *CYP1A1* é também induzida por compostos encontrados em plantas da família das crucíferas (repolho e brócolis) e pela luz ultravioleta nas células da pele e do fígado (McDONNEL et al., 1992; RANNUG et al., 1995).

A atividade catalítica e o modo de indução da enzima CYP1A1 parecem ser altamente conservados, confirmando sua importante função fisiológica. O padrão de atividade e a capacidade indutora, relacionados com a formação dos metabólitos de PAHs, é de grande importância na estimativa do risco de desenvolver câncer. Esta enzima é expressa principalmente no pulmão, linfócitos e na placenta (ANTTILLA et al., 1991).

Este gene é altamente polimórfico, mas um grande número de trabalhos foca em duas variantes alélicas principais (CASCORBI, 2006). Através do uso da enzima de restrição *MspI*, foi detectada uma variante originada pela transição T-C (*3801T>C*), resultando no alelo polimórfico denominado *CYP1A1\*2A* (WALKER, 1996). Esta variante resulta na presença (CCGG) do sítio *MspI* na posição 3801 da molécula de DNA e leva a um aumento da atividade catalítica da enzima. Isto pode conferir uma suscetibilidade aumentada ao câncer por promover uma maior ativação de pró-carcinógenos na fase I da biotransformação (GOTO et al., 1996; FONTANA et al., 1998). A frequência deste alelo mostra extensa variação étnica, tendo sido observados os valores de 31% e 12% entre japoneses e populações caucasóides, respectivamente (NEBERT et al., 1996). Uma segunda mutação de ponto (*2455A>G*) é responsável por outro polimorfismo no éxon 7, originando o alelo polimórfico *CYP1A1\*2B*, que se encontra em forte desequilíbrio de ligação com o polimorfismo *MspI* (HAYASHI et al., 1991; RAIMONDI et al., 2005).

Os alelos polimórficos acima descritos foram associados a um aumento na suscetibilidade ao câncer de pulmão em populações japonesas (HAYASHI et al., 1991), porém, esta associação não foi confirmada em populações caucasóides ou afro-americanas (HIRVONEN et al., 1992). KIHARA et al. (1995), acreditam que a combinação dos genótipos *CYP1A1* e *GSTM1*, juntamente com outros polimorfismos, é um fator preditivo na suscetibilidade genética ao câncer de pulmão, principalmente em fumantes. Segundo MATTHIAS et al. (1998) e GRONAU et al. (2003), não há associação entre a variante *380IT>C* e cânceres do trato aéreo digestivo superior.

INGELMAN-SUNDBERG (2001), afirmam que a associação entre variantes polimórficas dos genes CYPs e o risco ao desenvolvimento de câncer de boca ainda não está bem estabelecida, o que justifica a análise deste polimorfismo em trabalhos envolvendo pacientes brasileiros.

#### **1.2.1.2 - Superfamília Glutationa S-transferase - genes *GSTM1* e *GSTT1***

Polimorfismos de enzimas que promovem conjugação na fase II do metabolismo, como N-acetil-transferases (NATs) e Glutationa-S-transferases (GSTs), e seu papel na suscetibilidade a diversas neoplasias tem sido extensivamente investigado (CASCORBI, 2006).

Dentre as enzimas de fase II, as Glutationa S-transferases (GSTs) desempenham um papel fundamental no metabolismo celular, bem como na modificação de compostos eletrofílicos reativos, tanto pela conjugação com moléculas endógenas, como as glutations, como por ligação não covalente com vários agentes

xenobióticos presentes, por exemplo, na fumaça do cigarro e na dieta alimentar, impedindo a ligação destes com o DNA (HAYES e PULFORD, 1995).

Estima-se que existam pelo menos 20 GSTs na espécie humana, estando estas presentes na maioria das espécies (BUETLER e EATON, 1992). A família destas enzimas é composta por proteínas diméricas solúveis e multifuncionais, que podem se conjugar a moléculas eletrofilicas tornando-as menos tóxicas (PERSSON et al., 1995). Sua maior concentração é observada no fígado, contudo, é encontrada também em outros órgãos, como pulmões e intestino delgado. As GSTs humanas foram agrupadas com base em seu ponto isoelétrico e na seqüência de aminoácidos, em alfa (básicas), mu (próximas ao pH neutro) e teta (ácidas), cada uma contendo produtos de diferentes locos gênicos (HAYES e PULFORD, 1995).

Dentre os genes desta superfamília mais conhecidos encontram-se os genes *GSTM1* e *GSTT1*. O gene *GSTM1*, localizado no cromossomo 1, é polimórfico possuindo dois alelos funcionais (*GSTM1\*A* e *GSTM1\*B*) e um alelo com atividade nula por deleção (*GSTM1\*0*), sendo que os alelos funcionais possuem a mesma eficácia de detoxificação (WIDERSTEN et al., 1991). O gene *GSTT1*, localizado no cromossomo 22, assim como o *GSTM1*, é polimórfico, podendo apresentar fenótipo nulo por deleção. A deleção em homozigose do gene *GSTM1* é observada em frequências que variam de 20 a 70% nas diferentes populações, enquanto que para o gene *GSTT1* esta variação é de 11 a 38% (ARRUDA et al., 1998).

Como as enzimas codificadas por esses genes realizam um importante passo na detoxificação de xenobióticos, torna-se claro que a ausência de sua atividade pode levar a um aumento na toxicidade e na suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores

malignos (CASCORBI, 2006). Diversos estudos detectaram uma frequência elevada do genótipo nulo para estes dois genes em indivíduos portadores de diferentes neoplasias. OLSHAN et al., (2000) demonstraram um aumento no risco de desenvolvimento de CCECP, incluindo aqueles de cavidade bucal, para indivíduos portadores de deleções do gene *GSTT1*. A deficiência do gene *GSTM1* vem sendo correlacionada a outras doenças associadas ao hábito tabagista, como arteriosclerose (OLSHAN et al., 2003) e enfisema pulmonar (CASCORBI, 2006).

Vários autores não encontraram associação entre os genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulo e diversos tipos de câncer, como pulmão, boca e outros (WORRALL et al., 1998; JOURENKOVA-MIRONOVA et al., 1999; GRONAU et al., 2003; GASPAR et al., 2004; GAUDET et al., 2004; GAJECKA et al., 2005; SUGIMURA et al., 2006).

Segundo KADLUBAR (2001) o impacto de um único polimorfismo genético pode ser pequeno ou inexistente, mas a análise de interações entre várias variantes pode evidenciar uma suscetibilidade. Como exemplo destas interações, AUTRUP (2000), GEISLER e OLSHAN (2001) e GRONAU et al. (2003) sugeriram uma maior suscetibilidade para os indivíduos que possuem uma combinação de genótipos considerados de risco, como presença do alelo *CYP1A1\*2A* e *GSTM1/GSTT1* nulos.

NACCARATI et al., (2006) encontraram associação entre dano genotóxico (quebras de fita simples) e combinações genotípicas para os genes *EPHX1* (epóxido hidrolase) e *GSTM1/GSTT1* em população europeia. Os mesmos autores também associaram maior formação de aductos no DNA em indivíduos com combinações dos genótipos *CYP1A1\*2A* e *GSTM1* nulo. Entretanto, HAHN et al., (2002) não encontraram associação entre variantes dos genes *CYP1A1*, *GSTM1* e *NAT2* e

desenvolvimento de cânceres bucais, sugerindo que a combinação destas não estaria relacionada a este câncer.

Segundo SHASTRY (2006), variações inter-individuais na resposta ao tratamento de pacientes com câncer se constituem num sério problema. Não existem até o momento biomarcadores que possam prever qual grupo responderá positivamente e quais indivíduos não irão responder ou sofrerão os efeitos adversos da presença das drogas no organismo. Evidências sugerem que polimorfismos, especialmente de nucleotídeo único (SNPs), presentes em genes que codificam enzimas envolvidas com a metabolização de quimioterápicos, poderiam influenciar na toxicidade e na resposta ao tratamento.

A identificação de indivíduos mais propensos a acumular mutações poderá, num futuro próximo, conduzir a novas perspectivas para o diagnóstico precoce e a prevenção de determinadas neoplasias. Compreender os mecanismos envolvidos na suscetibilidade herdada motivará também o desenvolvimento de drogas terapêuticas mais específicas (GATTAS 2001; WÜNSCH e ZAGO, 2005).

### **1.2.2 - Perdas de Heterozigose (LOH) e Instabilidade de Microssatélites (MI)**

A instabilidade genética é considerada uma fonte potencial para a diversidade de tumores malignos, de maneira que quanto mais instável for um tumor, maior será a possibilidade de progressão para um fenótipo mais agressivo. Vários estudos foram realizados para investigar a instabilidade genômica em cânceres humanos, e têm

revelado perdas somáticas em locos de genes supressores e em genes envolvidos no reparo a danos no DNA (ROSSI e PINHO, 1999).

Sabe-se que as mutações responsáveis pelo desenvolvimento do câncer podem ser cromossômicas e/ou gênicas. No caso dos genes supressores de tumor, nos quais há a necessidade de inativação dos dois alelos, o primeiro geralmente é inativado por mutação gênica e o segundo é perdido por deleções cromossômicas envolvendo a região na qual o gene em questão está localizado (VOGEL e MOTULSKY, 1997). Na inativação destes genes, os mecanismos que levam à perda de seqüências podem também envolver as regiões cromossômicas próximas ao gene. Assim, marcadores de DNA que demonstravam heterozigose antes da progressão do tumor podem sofrer uma redução até atingirem a perda alélica parcial ou total, mecanismo conhecido como perda de heterozigose (LOH) (WEINBERG, 1991).

A LOH de marcadores genéticos polimórficos é interpretada como a deleção de segmentos genômicos. Quando esta perda é detectada como um evento somático específico do tumor, pode representar a deleção de um alelo de um gene supressor tumoral e indicar a localização do outro, provavelmente mutado e não-funcional, no cromossomo homólogo. Estas alterações conferem uma vantagem ao crescimento que leva à expansão clonal das células (ANDO et al., 2000). A análise de LOH pode caracterizar alterações não detectadas por outros métodos e o posterior mapeamento pode levar à identificação de novos genes supressores tumorais (KEMP, 1999).

A pesquisa de LOH se constitui num método indireto de investigar a possível localização de um gene supressor de tumor através do estudo de alterações em seqüências repetitivas em *tandem*, chamadas de microssatélites, comuns em genomas

de eucariotos. Os microssatélites são seqüências altamente polimórficas, com variações entre 2 a 6 pares de bases, que podem estar localizadas entre ou dentro dos genes (PERUCHO, 1996). A alta freqüência e a ampla distribuição destas seqüências pelo genoma humano as qualificam para estudos que visam definir regiões mínimas de perdas cromossômicas, sugerindo a presença de genes supressores (SPEICHER, 1995; LOTHE, 1997).

A discrepância entre o tamanho dos microssatélites observada em células tumorais comparada ao tecido normal do mesmo paciente, resultado da expansão ou diminuição do seu comprimento, denomina-se instabilidade de microssatélites (MI). Este evento resulta de mutações em genes de reparo a erros de pareamento do DNA. Indiretamente, esses erros de pareamento estariam associados à transformação celular e a um fenótipo maligno. A maioria das repetições de microssatélites ocorre fora das regiões codificadoras dos genes e, portanto, a instabilidade não deve levar diretamente ao desenvolvimento tumoral, mas a desestabilização dessas seqüências pode tornar o genoma suscetível a mutações (ESHLEMAN et al., 1995; CLAIJ e RIELE, 1999; RAJANBABU e PATRARCA, 1999).

Anormalidades em seqüências microssatélites têm sido associadas a várias doenças genéticas, incluindo diversos tipos de tumores malignos (WOOSTER et al., 1994), como o câncer bucal (JEFFRIES e FOULKES, 2001). A utilização de microssatélites como marcadores na identificação de sítios específicos está amplamente descrita na literatura (MAO et al., 1996a; ROSIN et al., 2000; SEM, 2000; LIPPMAN e HONG, 2001; SUDBO et al., 2001).

Muitas regiões genômicas vêm sendo estudadas nos carcinomas de cabeça e pescoço e relacionadas a possíveis locos de genes envolvidos com o processo tumoral. Segundo van der RIET et al. (1994) e ROSIN et al. (2000), LOH em 9p pode ser um evento inicial em neoplasias escamosas de cabeça e pescoço, sendo observada inclusive em lesões pré-neoplásicas. YAMAMOTO et al. (2001) sugerem o envolvimento do cromossomo 21 (21q) nestas neoplasias, afirmando que a avaliação de LOH nesta região pode ser um marcador útil na determinação do potencial de recorrência tumoral. REIS et al. (2002) sugerem que o cromossomo 22 (22q) possa conter genes supressores específicos para diferentes localizações anatômicas dos CCECP, incluindo a região bucal, e que alterações nestas regiões poderiam ter uma relevância clínica e prognóstica. NUMASAWA et al. (2005) afirmam que a frequência de LOH por eles observada em 2q indica a presença de genes candidatos a supressores tumorais em 2q14-21 e 2q36, dados que corroboram os de YAMAMOTO et al. (2003).

Em uma meta-análise das publicações utilizando ensaios de LOH em CCECP, CANEVARI e ROGATTO (2004) mostraram que algumas regiões cromossômicas foram intensamente investigadas como 1p, 1q, 3p, 5q, 7q, 8p, 9p, 10q, 11q, 13q, 17p e 18q. Nesse mesmo estudo, foram avaliados publicações e dados disponíveis em bancos públicos sobre hibridação genômica comparativa (CGH) para esse tipo tumoral (<http://www.helsinki.fi/cmgi/>). Essa análise demonstrou que as regiões mais frequentemente envolvidas em ganhos foram 1q, 3q, 5p, 7, 8q, 9q, 11q, 16p, 17q, 19, 20 e 22q, enquanto perdas foram detectadas em 1p, 2q, 3p, 4, 5q, 6q, 8p, 9p, 10q, 11, 13, 17p, 18q, 19, 21q e 22q. No conjunto, estes dados demonstram múltiplas regiões genômicas que provavelmente contenham genes supressores ainda não identificados.



O braço curto do cromossomo 3 (3p) é uma das regiões onde frequentemente se encontram anormalidades cromossômicas em cânceres humanos, como pulmão, rim e cavidade bucal (SHRIVER et al., 1998). Estudos citogenéticos e moleculares têm sugerido que genes supressores tumorais localizados neste cromossomo poderiam exercer um importante papel na carcinogênese bucal, principalmente nos estágios avançados do desenvolvimento tumoral (ARAI et al., 2002; DASGUPTA et al., 2002).

Diversos estudos investigaram a ocorrência de LOH em 3p (WU et al., 1994; CALIFANO et al., 1996; MAO et al., 1996b; PARTRIDGE et al., 1996; YAMAMOTO et al., 1996; ARAI et al., 2001; GUO et al., 2001; TABOR et al., 2001; EL-NAGGAR et al., 2001; DASGUPTA et al. 2002; ARAI et al., 2002; YOO et al., 2004). Em conjunto, estes dados indicaram as regiões 3p14, 3p21 e 3p24 como as mais frequentemente envolvidas em perdas alélicas em CCECP de diferentes localizações anatômicas.

Segundo PARTRIDGE et al. (1996), ARAI et al. (2002) e DASGUPTA et al. (2002), existe uma associação entre LOH em 3p com tempo livre da doença, progressão tumoral e parâmetros clínicos do tumor, indicando um significado prognóstico e terapêutico para alterações nesta região cromossômica em tumores bucais. CALIFANO et al. (1996) propuseram um modelo de progressão tumoral em CCECP, em que o espectro de perdas cromossômicas aumentava progressivamente com o estadiamento histopatológico, levando à transição da mucosa normal para displasia. EL-NAGGAR et al. (2001) analisaram 37 amostras de pacientes com CCE da cavidade bucal pareadas com amostras de secreções orais (saliva) do mesmo paciente. Os autores encontraram LOH em 18 (49%) amostras de saliva e em 32 (86%)

amostras tumorais em pelo menos 1/25 marcadores estudados correlacionando-as com o consumo de álcool e tabaco. A maior frequência de LOH em amostras de saliva foi encontrada para o marcador mapeado em 3p14.2. DASGUPTA et al. (2002) avaliaram 57 amostras de CCECP sendo 38 de cavidade bucal, 8 de laringe e 11 da região orofacial. Investigaram 20 marcadores microssatélites ao longo do cromossomo 3. Destes, 15 estavam mapeados em 3p e 5 em 3q. Os autores encontraram 96% (49/51 casos de carcinomas de células escamosas) de LOH nos marcadores mapeados na região 3p e 50% (26/51) em 3q. Alta frequência de perda foi encontrada em 3p21-22 (37-42%) pela análise dos marcadores D3S3719, D3S1289, D3S1611 e em 3p12-13 (34-38%) pela análise de D3S3634, D3S1276, D3S1284. BEDER et al. (2003) avaliaram 22 amostras de CCECP com 53 marcadores mapeados ao longo dos 22 cromossomos autossômicos. Destes, 15 (28,30%) estavam mapeados no cromossomo 3 e apresentaram alta frequência de LOH, principalmente para o marcador D3S2432 (67%), mapeado em 3p24.1.

De um modo geral, as investigações baseadas em ensaios de LOH em 3p permitiram o delineamento de regiões críticas nesta região, indicando a presença de genes supressores relacionados à etiologia dos cânceres de cabeça e pescoço, incluindo os de cavidade bucal (WU et al., 1994; ROWLEY et al., 1996; UZAWA et al., 1998; ARAI et al., 2002; NUNN et al., 2003). Os genes supressores tumorais contidos nestas regiões: Receptor beta do ácido retinóico em 3p24 (*retinoic acid receptor beta-RARB*), Família de domínios associada ao RAS em 3p21.3 (*Ras association (RalGDS/AF-6) domain family -RASSF1A*) e *fragile histidine triad gene (FHIT)* em

3p14.2 foram caracterizados como candidatos a participarem da carcinogênese (YANG et al., 2002) e serão discutidos posteriormente.

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os cânceres de cabeça e pescoço, incluindo os da cavidade bucal, apresentam uma alta incidência no Brasil e a sobrevida média de aproximadamente cinco anos permanece como uma das menores entre os principais tipos de cânceres. Métodos disponíveis para a detecção e o tratamento não têm sido eficientes para modificar este quadro, justificando estudos que forneçam um melhor conhecimento biológico destes tumores.

A maior parte dos estudos moleculares é realizada em tumores malignos de cabeça e pescoço histologicamente distintos, o que dificulta o estabelecimento de associações entre os dados genéticos e os parâmetros histopatológicos. Neste estudo foram avaliados genes candidatos de suscetibilidade ao câncer (*CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1*) e o envolvimento da região cromossômica 3p exclusivamente em carcinomas de células escamosas da cavidade bucal.

1. Considerando-se as informações obtidas da literatura, postulou-se a hipótese de que a presença do alelo *CYP1A1*\*2A (em heterozigose ou homozigose) e a ausência em homozigose dos alelos de *GSTM1* e *GSTT1* predis põem seus portadores ao câncer bucal. Considerando-se que as vias de metabolização possuem várias enzimas atuantes, o efeito individual de cada variante pode não ser detectado. Postulou-se a hipótese de que o efeito conjunto de aumento de atividade catalítica (presença do alelo *CYP1A1*\*2A) e ausência de produto enzimático de detoxificação

(*GSTM1* e/ou *GSTT1* nulos) possa conferir aumento de suscetibilidade ao câncer bucal. Para testar estas hipóteses tivemos os seguintes objetivos específicos:

- determinar as frequências genóticas de *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes e controles e realizar um estudo de associação do tipo caso-controle para avaliar a significância estatística das diferenças na distribuição genotípica em cada uma das amostras;
- determinar as frequências genóticas de *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes e controles e realizar o estudo de associação do tipo caso-controle para avaliar a significância estatística das diferenças na distribuição do conjunto de genótipos considerados de risco (T/C+C/C e/ou *GSTM1* e/ou *GSTT1*nulos) em cada uma das amostras;
- verificar se as frequências genóticas dos pacientes estão igualmente distribuídas em relação a parâmetros clínicos e histopatológicos.

2. Alterações no braço curto do cromossomo 3 (3p) indicam que esta região contém genes supressores tumorais cujas mutações contribuem na gênese e progressão do câncer bucal. Com o intuito de testar esta hipótese, tivemos como objetivos específicos:

- determinar a frequência de perda de heterozigosidade (LOH) em sete marcadores microssatélites mapeados em 3p em amostras de tecido tumoral;
  
- determinar a frequência de perda de heterozigosidade (LOH) no conjunto dos marcadores microssatélites mapeados em 3p;
  
- verificar se a presença ou ausência de LOH está igualmente distribuída em relação aos parâmetros clínicos e histopatológicos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- Caracterização da amostra

Foram analisados 91 pacientes com média de idade de  $58,62 \pm 10,46$  anos, sendo 79 homens e 12 mulheres e 81 indivíduos sem história de neoplasia atual ou anterior, com média de idade de  $58,58 \pm 9,90$  anos, sendo 61 homens e 20 mulheres. A etnia euro-descendente foi predominante tanto nos pacientes ( $n=79-86,8\%$ ) como nos controles ( $n=68-83,9\%$ ). Onze (12,1%) e 12 (14,8%) indivíduos eram de origem afro-descendente entre pacientes e controles, respectivamente. Dois indivíduos descendentes de asiáticos também fizeram parte da amostra, sendo um (1,1%) no grupo dos pacientes e outro (1,2%) no grupo dos controles.

O grupo controle foi constituído a partir de um banco de DNA, pertencente ao Laboratório de Mutagênese da Universidade Estadual de Londrina, e também a partir de coletas realizadas no Hospital de Clínicas e no Hospital Universitário de Londrina, com pacientes de diversos setores, exceto a oncologia.

A análise laboratorial foi realizada com amostras de sangue periférico e de fragmentos de tumores bucais (carcinomas de células escamosas), primários e não-tratados, de pacientes e com amostras de sangue periférico de controles, pareados aos pacientes por idade ( $\pm 5$  anos), sexo, etnia e hábito tabagista (fumante ou não fumante). O período de coleta foi de julho de 2002 a julho de 2005.

Como demonstrado na Tabela 1, 27 pacientes tinham tumor de língua (29,67%) e 18 de assoalho bucal (19,78%), as duas localizações anatômicas mais prevalentes

desta amostra. Além disso, 11 dos pacientes apresentaram tumor de orofaringe, 11 de mucosa sem especificação, 8 de palato, 6 de trígono retromolar e um de lábio interno. Alguns pacientes (n=8) possuíam tumores pertencentes a mais de uma localização anatômica, sendo 3 de língua e assoalho, 1 de mucosa sem especificação e trígono, 1 de assoalho e palato, 1 de língua e trígono, 1 de língua, palato e trígono e 1 de língua, assoalho e trígono. Para um dos pacientes (66) não foi possível obter a localização anatômica exata do carcinoma bucal (Tabela 1).

No parâmetro invasão de linfonodos regionais, dos 73 pacientes com informação disponível, 46 (63%) apresentaram os linfonodos comprometidos e 27 (37%) não comprometidos (Tabela 1). Apenas três pacientes apresentaram metástases à distância, sendo um no jejuno, um no esôfago e um no esôfago e pulmão. Estes três pacientes também tiveram os linfonodos regionais comprometidos.

Dentre os pacientes em que foi possível obter a informação sobre o grau de diferenciação tumoral (n=66), apenas três apresentaram tumores bem diferenciados (grau I), 39 tumores moderadamente diferenciados (grau II) e 24 tumores pouco diferenciados (grau III) (Tabela 1).

Com relação ao tratamento, observou-se que a grande maioria dos pacientes recebeu uma combinação de cirurgia e radioterapia (n=32), sendo poucos os pacientes submetidos a outras combinações de tratamento: 6 deles a quimio/radioterapia e 1 apenas a uma combinação de cirurgia e quimioterapia. Alguns pacientes receberam tratamento exclusivamente radioterápico (n=18), exclusivamente cirúrgico (n=15) e apenas dois pacientes receberam exclusivamente quimioterapia (Tabela 1).



Também pudemos observar que um grande número de pacientes (n=34) foi a óbito em decorrência do processo tumoral, o equivalente a 43% da amostra, quando excluídos os 12 pacientes para os quais não foi possível obter esta informação (Tabela 1).

O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética dos centros de coleta envolvidos (Hospital Erasto Gaertner de Curitiba, Hospital do Câncer de Londrina e Centro Odontológico Universitário Norte do Paraná) e, também, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Foi realizada uma entrevista com cada doador (pacientes e controles) que recebeu as informações sobre os objetivos da pesquisa e o formulário para a assinatura do Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos), para posterior coleta do material.

A cada indivíduo foi solicitado responder a um Questionário Padrão (Anexos), também aprovado pelas Comissões de Bioética, referente ao seu estilo de vida, local de nascimento, origem étnica dos pais, idade, ocupação e história familiar de câncer, entre outros, baseado naquele proposto por CARRANO e NATARAJAN (1988).

**Tabela 1. Parâmetros histopatológicos e clínicos dos pacientes portadores de carcinomas bucais**

<b>Amostras</b>	<b>Localização</b>	<b>Tamanho (cm)</b>	<b>ILR</b>	<b>Diferenciação</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Óbito</b>
1.	Língua	4,5	Sim	-	Quimio/radioterapia	Sim
2.	Língua	4,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Sim
3.	Orofaringe	4,0	Sim	Grau III	Cirúrgico/radioterapia	Não
4.	Trígono retromolar	4,0	Sim	-	Radioterapia	Sim
5.	Orofaringe	2,0	Sim	-	Cirúrgico	Não
6.	Trígono retromolar	3,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Não
7.	Língua	2,5	Não	-	Cirúrgico/radioterapia	Não
8.	Mucosa (SE) e trígono	6,0	Não	-	Radioterapia	Sim
9.	Língua	5,0	Sim	Grau III	Radioterapia	Sim
10.	Mucosa (SE)	7,0	Sim	-	Quimioterapia	Sim
11.	Orofaringe	2,5	Sim	-	Cirúrgico	Não
12.	Língua	4,0	Não	-	Cirúrgico/radioterapia	Não
13.	Assoalho	4,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Não
14.	Língua	1,5	Sim	-	Cirúrgico	Sim
15.	Língua e assoalho	3,0	Não	-	Cirúrgico	Não
16.	Trígono retromolar	2,5	Sim	-	Cirúrgico	Não
17.	Orofaringe	4,0	Sim	-	Radioterapia	Sim
18.	Orofaringe	3,0	Sim	Grau III	-	Não
19.	Língua	3,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Sim
20.	Mucosa (SE)	3,0	Sim	Grau III	Cirúrgico/radioterapia	Não
21.	Língua	4,5	Sim	Grau III	Radioterapia	Sim
22.	Palato	4,0	Não	Grau II	Radioterapia	Não
23.	Orofaringe	-	-	Grau II	-	-

24.	Trígono retromolar	2,0	-	Grau II	-	Não
25.	Palato	-	Não	Grau III	Cirúrgico	Não
26.	Palato	3,0	Não	Grau III	Radioterapia	Não
27.	Assoalho e palato	3,5	Sim	Grau III	Cirúrgico/radioterapia	Sim
28.	Palato	6,0	Sim	Grau III	Químio/radioterapia	Não
29.	Assoalho	1,5	-	Grau II	-	Não
30.	Mucosa (SE)	2,5	Não	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Não
31.	Assoalho	1,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Sim
32.	Língua	4,0	Sim	Grau III	-	Sim
33.	Língua	3,0	Não	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Não
34.	Palato	3,0	Não	-	Cirúrgico	Não
35.	Orofaringe	7,0	Não	-	Químio/radioterapia	Não
36.	Palato	8,4	Sim	-	Cirúrgico/radioterapia	Não
37.	Língua	7,0	N.A.	-	Radioterapia	Sim
38.	Assoalho	1,2	Não	Grau III	Cirúrgico/radioterapia	Não
39.	Língua	2,0	Não	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Não
40.	Língua	2,0	Não	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Não
41.	Palato	2,0	Sim	Grau II	Quimioterapia	Sim
42.	Orofaringe	4,5	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Sim
43.	Língua	3,0	Não	-	Cirúrgico/radioterapia	Não
44.	Mucosa (SE)	2,0	N.A.	Grau II	Radioterapia	Sim
45.	Assoalho	2,0	Sim	Grau II	Radioterapia	Sim
46.	Língua	1,5	Não	Grau II	Cirúrgico	Não
47.	Orofaringe	3,5	Sim	Grau II	Químio/radioterapia	Sim
48.	Assoalho	3,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Sim
49.	Assoalho	3,0	N.A.	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Sim

50.	Língua e assoalho	-	-	Grau II	-	
51.	Língua	-	Sim	Grau II	Radioterapia	Sim
52.	Língua e trígono	6,5	Sim	Grau II	Radioterapia	Sim
53.	Língua	2,0	Sim	Grau II	Radioterapia	Sim
54.	Língua, palato e trígono	4,5	Não	Grau III	Cirúrgico/radioterapia	Não
55.	Assoalho	4,5	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Sim
56.	Assoalho	4,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radio/químio	Não
57.	Assoalho	5,0	Sim	Grau II	Radioterapia	Sim
58.	Língua	5,0	Sim	Grau III	Cirúrgico/radioterapia	Sim
59.	Trígono retromolar	-	-	Grau II	-	-
60.	Assoalho	2,0	Sim	Grau II	-	Não
61.	Assoalho	2,5	Sim	Grau II	-	Não
62.	Assoalho	3,0	Não	Grau II	Radioterapia	Não
63.	Orofaringe	1,5	Não	Grau I	Cirúrgico/radioterapia	Sim
64.	Orofaringe	-	Sim	Grau I	Químio/radioterapia	Não
65.	Assoalho e língua	1,0	Não	Grau II	Radioterapia	Não
66.	-	6,0	Sim	Grau III	Químio/radioterapia	Sim
67.	Assoalho	3,0	Não	Grau III	Cirúrgico	Sim
68.	Língua	4,0	Não	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Não
69.	Mucosa (SE)	-	-	-	Cirúrgico	Não
70.	Lábio interno	2,0	Sim	Grau III	Cirúrgico/radioterapia	Não
71.	Mucosa (SE)	-	-	-	-	-
72.	Língua	-	-	-	-	-
73.	Trígono retromolar	5,0	-	Grau II	-	-
74.	Mucosa (SE)	3,0	Não	Grau III	Cirúrgico	Não

75.	Língua	5,0	-	Grau III	-	-
76.	Palato	-	-	-	-	-
77.	Língua	3,0	Sim	-	Cirúrgico/radioterapia	Sim
78.	Língua	-	Não	Grau III	Cirúrgico/quimioterapia	Não
79.	Língua, assoalho e trígono	-	-	-	-	-
80.	Mucosa (SE)	2,0	-	Grau III	-	-
81.	Língua	2,0	Não	Grau III	Cirúrgico/radioterapia	Não
82.	Assoalho	3,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Não
83.	Língua	1,0	-	Grau III	Cirúrgico	-
84.	Assoalho	-	Sim	Grau I	Cirúrgico/radioterapia	Não
85.	Língua	-	-	-	-	-
86.	Assoalho	3,0	Sim	Grau II	Cirúrgico	Não
87.	Mucosa (SE)	3,0	Não	Grau III	Cirúrgico/radioterapia	Sim
88.	Assoalho	3,0	Não	-	Cirúrgico	Sim
89.	Língua	-	Sim	Grau II	Cirúrgico	-
90.	Mucosa (SE)	4,0	Sim	Grau II	Radioterapia	Sim
91.	Mucosa (SE)	2,5	Sim	Grau III	Radioterapia	Não

Legenda: ILR: invasão de linfonodos regionais; N.A.: não avaliáveis; Grau I: bem diferenciado; Grau II: moderadamente diferenciado; Grau III: pouco diferenciado; SE: sem especificação; -: ausência de informação.

### **3.2-Coleta do material biológico e análise histopatológica**

As coletas de sangue foram realizadas através de punção intravenosa. De cada indivíduo foram coletados 10 ml de sangue, que foi colocado em tubos contendo solução anti-coagulante ACD (0,016 M de ácido cítrico; 0,068 M de citrato de sódio; 0,081 M de glicose).

As amostras de tecido tumoral, após a ressecção cirúrgica, foram dissecadas para remoção do tecido normal. Uma parte da amostra foi avaliada por um patologista para confirmar a presença do tumor, procurando-se retirar as áreas necróticas ou de tecido não-neoplásico. As amostras foram transferidas para frascos estéreis e estocadas a -80°C para posterior extração do DNA.

A análise histopatológica foi realizada com coloração HE de rotina, para confirmação das suspeitas clínicas. A classificação histopatológica dos tumores foi realizada de acordo com os critérios internacionais estabelecidos pela Classificação Internacional de Tumores (WHO). O estadiamento clínico foi determinado de acordo com o estadiamento TNM do câncer.

### **3.3-Extrações de DNA genômico**

A) A extração de DNA sanguíneo foi realizada segundo método descrito por MILLER et al. (1988). A amostra de sangue foi centrifugada a 2500 rpm e o plasma foi aspirado. Foi adicionada solução de lise de hemáceas (solução A: 0,32 M de sucrose; 10 mM de tris-HCl pH-7,5; 5 mM de MgCl<sub>2</sub> 1% de Triton X-100) e a amostra

foi mantida no gelo por 30 min. A amostra foi centrifugada a 2500 rpm por 15 min e o sobrenadante descartado. O procedimento foi repetido, o sobrenadante foi retirado e as células ressuspensas em solução de lise de leucócitos (solução B: 10 mM de tris-HCl, pH-7,5; 5 mM de NaCl; 2 mM de EDTA, pH8,0). Foram adicionados SDS a 20% (duodecil sulfato de sódio) e proteinase K (2 mg de proteinase K / ml de SDS a 2%) e manteve-se a 37°C durante a noite. Foi acrescentado NaCl a 6 M e a amostra foi centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos. Foi adicionado etanol 100% e o DNA foi removido, submetido à ação de etanol 70% e ressuspensado em TE (10 mM de tris-HCl pH 8,0 e 1 mM de EDTA).

B) A técnica utilizada para a extração de DNA tumoral foi realizada seccionando-se uma amostra em fragmentos e transferindo-a para um tubo de centrífuga. Foi adicionado tampão de extração (100 mM de Tris pH 8,0; 50 mM de EDTA pH 8,0 e 500 mM de NaCl) e promovida a homogeneização. Foram adicionados SDS 20% e proteinase K em concentração final de 100 µg/ml. O frasco foi incubado a 37°C durante algumas horas. Foram transferidos 500 µl da solução para tubos de microcentrífuga e foi adicionada mistura contendo fenol (equilibrado com 0,1 M de Tris-HCL pH 8,0), clorofórmio e álcool isoamílico. Após centrifugação a 12000 rpm por 10 min. e transferência do sobrenadante, foi adicionado clorofórmio e realizada nova centrifugação. Este procedimento foi repetido. Foram adicionados acetato de amônio 7,5 M e etanol absoluto, para posterior centrifugação. O sobrenadante foi descartado, foi adicionado etanol 70% e o DNA foi ressuspensado em tampão TE (100 mM de Tris pH 8,0; 1 mM de EDTA).

### 3.4 - Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Neste trabalho, a técnica de PCR foi utilizada para a detecção das variantes alélicas polimórficas dos genes *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* e nas análises de perdas de heterozigose em 3p.

#### 3.4.1-Análise de presença/ausência em homozigose dos genes *GSTM1* e *GSTT1*

A reação de co-amplificação em cadeia foi realizada baseada no protocolo de PCR *Multiplex* de ABDEL-RAHMAN et al. (1996), modificado, nas seguintes condições:

- tampão da enzima (20 mM de tris-HCl pH 8,4; 50 mM de KCl);
- 2 mM de MgCl<sub>2</sub>;
- 100 ng/μl de cada iniciador
- 1,25 U de Taq DNA polimerase
- 2 mM de dNTPs
- 100ng de DNA genômico total;
- água ultra-pura estéril para completar o volume final.

Os iniciadores para o gene *CYP1A1* (Tabela 2) amplificam um fragmento não polimórfico de 312 pb, usado como controle interno da reação. Os fragmentos de 215 e 480 pb foram observados, respectivamente, nos indivíduos *GSTM1* e *GSTT1* positivos.



A ausência de amplificação *GSTM1* (215 pb) ou *GSTT1* (480 pb), na presença de controle interno, indicou os respectivos genótipos nulos para cada gene, ou para ambos (Figura 1).

Os fragmentos foram amplificados no termociclador PTC-100 (MJ *Research, Inc*) nas condições apresentadas na Tabela 2, e submetidos à eletroforese (3V/ml).

Os produtos foram visualizados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídeo (10mg/ml) e 5 µl de tampão (15 ml de ficol, 20 ml de H<sub>2</sub>O e 0,0125 g de azul de bromofenol), para a visualização da corrida.

Foi utilizado um DNA padrão de 50 ou 100 pb diluído (10 µl de marcador de DNA, 70 µl de TE, 20 µl de tampão da amostra) para a verificação do tamanho dos produtos amplificados.

### **3.4.2-Análise do polimorfismo 380IT>C do gene *CYP1A1***

A reação de PCR foi realizada baseada no protocolo de CARSTENSEN et al. (1993), modificado:

- 20 pMol dos iniciadores
- 25 mM de dNTPs
- 2,5 U de Taq DNA polimerase
- tampão de PCR (200 mM de Tris-HCL, pH 8,0; 500 mM de HCL 10X concentrado)
- 50 mM de MgCl<sub>2</sub>
- 100 ng de DNA genômico total;

- água estéril para completar o volume final.

A reação de clivagem com a enzima de restrição *MspI* foi realizada misturando-se 10 µl do produto de PCR, 1 U de enzima e tampão. Água ultra-pura estéril foi utilizada para completar o volume final.

Os fragmentos foram amplificados nas condições apresentadas na Tabela II e em seguida permaneceram a 37°C durante cerca de 12 horas. Os fragmentos clivados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3.0% e visualizados de acordo com o descrito para os genes *GSTM1* e *GSTT1*.

Os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela II) originam um produto de amplificação de 340 pb referente ao genótipo homozigoto T/T, o qual não sofre ação da enzima de restrição *MspI*, originando uma única banda de 340 pb. O genótipo homozigoto C/C possui sítios para a enzima de restrição em ambos os alelos, gerando duas bandas de 200 pb e 140 pb. O genótipo heterozigoto T/C corresponde às três bandas de 340, 200 e 140 pb, onde apenas um dos alelos é clivado (CARSTENSEN et al., 1993) (Figura 2).

A Tabela 2 apresenta os iniciadores e as condições de amplificação para os polimorfismos dos genes candidatos de suscetibilidade. A Tabela 3 apresenta os marcadores microssatélites selecionados e suas respectivas regiões genômicas.

### 3.4.3-Análise de perda de heterozigose (LOH)

Amostras pareadas de DNA normal e tumoral foram investigadas para sete marcadores microssatélites mapeados no braço curto do cromossomo 3 (3p) (Tabela 3 e Figura 3) obtidos do "Genome Database - GDB" (<http://www.gdb.org>).

Inicialmente, cada microssatélite foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com um par de oligonucleotídeos específicos (Tabela III), nas seguintes condições:

10 µl de volume de reação contendo:

- 1) 160 ng de DNA molde
- 2) 5 µm de cada iniciador
- 3) 1250 µm de cada DNTP
- 4) 1 µl de tampão de reação
- 5) 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>
- 6) 1U de DNA Taq polimerase
- 7) Água para completar o volume final

As reações de PCR foram realizadas isoladamente ou através de PCR-*Multiplex* utilizando-se iniciadores marcados com os agentes fluorescentes HEX (D3S1286, D3S1263), FAM (D3S1274, D3S1581, D3S1300) e NED (D3S1079, D3S1307) em ciclos de 96 C° por 5 min; 30 ciclos de 96 C° por 20 seg, 55-57 C° (dependendo do marcador) por 30 seg e 72 C° por 40 seg; 72 C° por 20 min.

Cerca de 2µl do produto de PCR foram acrescentados a uma solução MIX (0,25µl do marcador de peso molecular; 0,5µl de Blue Dextran e 1,0µl de formamida).

Os produtos da PCR fluorescente foram analisados em gel desnaturante de uréia-poliacrilamida, numa mistura contendo: uréia, temed, persulfato de amônio, TBE e *Long Ranger (Applied Biosystems)*, utilizando o seqüenciador automático MegaBACE 1000. As condições de corrida foram: injeção a 3KV por 80 segundos e corrida a 8KV por 80-100 minutos.

Após a eletroforese na presença do marcador padrão ET-ROX 400 (*Amershan Biosciences*), os produtos de PCR foram detectados e analisados pelo *Software Fragment Profiler 2.1 (Amershan Biosciences)*. Os marcadores que se mostraram informativos para cada paciente foram avaliados quanto à presença ou ausência de LOH no tecido tumoral. As amostras cujos marcadores apresentaram-se homozigotos no sangue periférico foram consideradas não informativas para aquele marcador. A LOH foi determinada matematicamente utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{LOH} = \frac{\frac{\text{Altura do pico do alelo normal 2}}{\text{Altura do pico do alelo normal 1}}}{\frac{\text{Altura do pico do alelo tumoral 2}}{\text{Altura do pico do alelo tumoral 1}}}$$

Sendo o alelo 1 aquele que possui menor tamanho em pares de bases, e o alelo 2 aquele que possui maior tamanho em pares de bases, um valor de  $\text{LOH} \leq 0,6$  indica que a amostra tumoral apresenta significativa perda do alelo de maior tamanho, enquanto que um valor de  $\text{LOH} \geq 1,6$  indica que a amostra tumoral apresenta perda do alelo de menor tamanho.

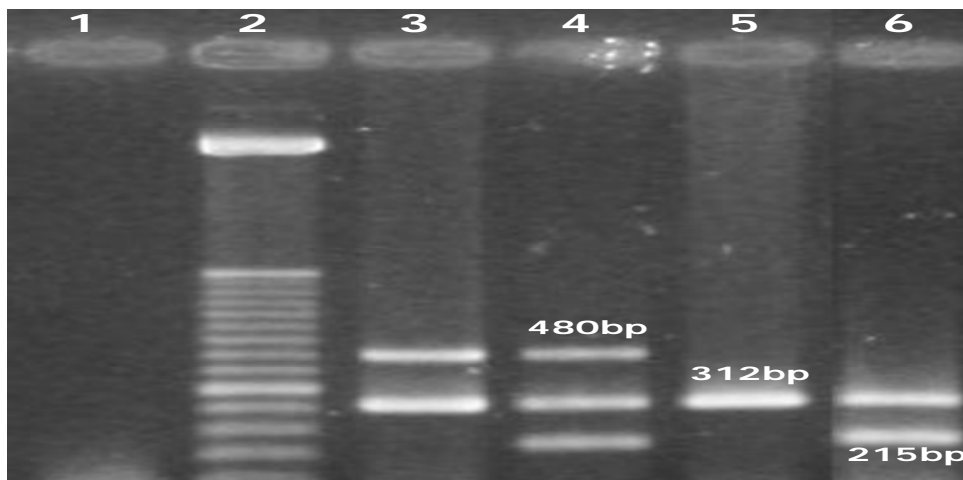
Resultados duvidosos levaram a repetição ou exclusão das amostras. Todos os cálculos de perdas de heterozigose foram confirmados utilizando-se adicionalmente os valores das áreas dos picos dos alelos como parâmetro adicional em novo cálculo, como se segue:

$$\text{LOH} = \frac{\frac{\text{Área do alelo tumoral 1}}{\text{Área do alelo tumoral 2}}}{\frac{\text{Área do alelo normal 1}}{\text{Área do alelo normal 2}}}$$

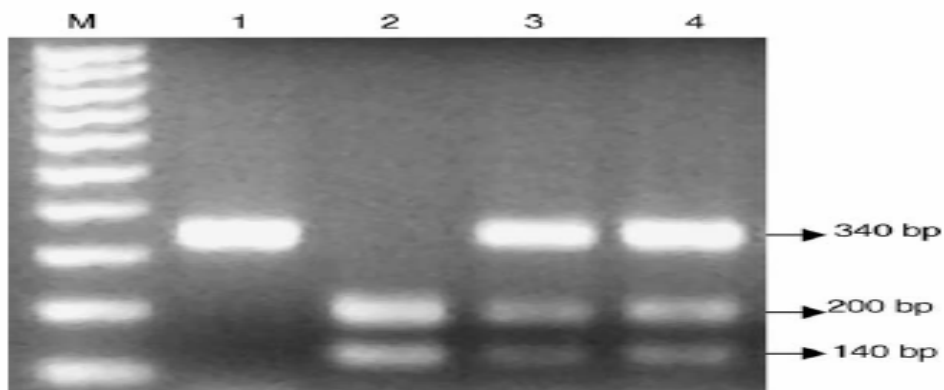
Foram consideradas como tendo LOH apenas as amostras com valores inclusivos em ambos os cálculos realizados (Figura 4).

**Tabela 2 - Iniciadores e condições de amplificação para os genes candidatos de suscetibilidade *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1***

Gene	Iniciadores	Condições da reação
<i>CYP1A1</i> (380IT>C)	5'TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT3' 5'CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT3'	94°C - 5min; 30 ciclos(94°C-1 min, 56°C-1 min, 72°C-1 min e 30seg) 72°C-5 min
	<b><i>GSTM1:</i></b> 5'GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC3' e 5'GTTGGGCTAAATATACGGTGG3'	
<i>GSTM1 e GSTT1</i>	<b><i>CYP1A1:</i></b> 5'GAACTGCCACTTCAGCTGTCT3' e 5'CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC3'	94°C-5 min; 30 ciclos (94°C-1 min, 59°C-1 min, 72°C-1 min) 72°C-5 min
	<b><i>GSTT1:</i></b> 5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC3'e 5'TCACCGGATCATGGCCAGCA3'	
Enzima de restrição	Seqüência de clivagem	Condições de reação
<i>MspI</i>	5'- C↓CGG- 3' 3'- GGC↑C- 5'	37°C por 12 horas



**Figura 1.** Perfis de PCR para os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*. 1: controle interno; 2: padrão de DNA de 50pb; 3: *GSTT1* positivo; 4: genótipos positivos; 5: genótipos nulos; 6: *GSTM1* positivo.

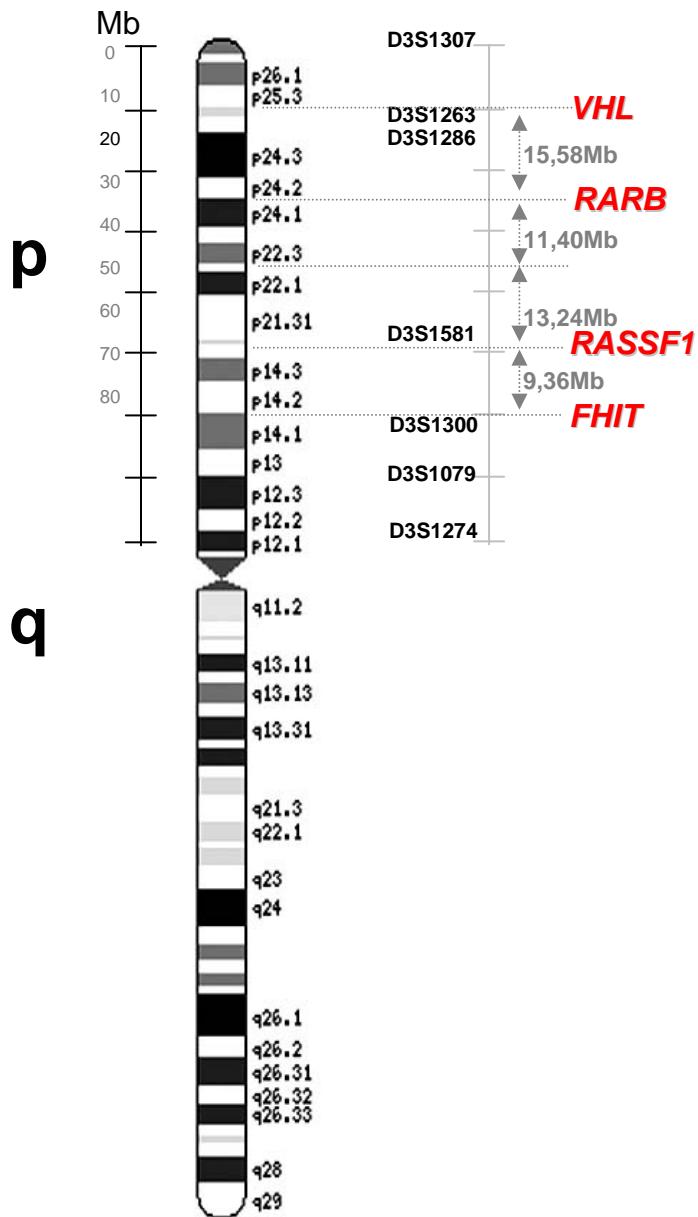


**Figura 2.** Perfis de PCR para o polimorfismo *380T>C* do gene *CYP1A1*. M: padrão de DNA de 100pb 1: homocigoto T/T; 2: homocigoto C/C; 3 e 4: heterocigotos T/C.

**Tabela 3. Localização dos marcadores microssatélites selecionados para a análise de LOH no braço curto do cromossomo 3 (3p)**

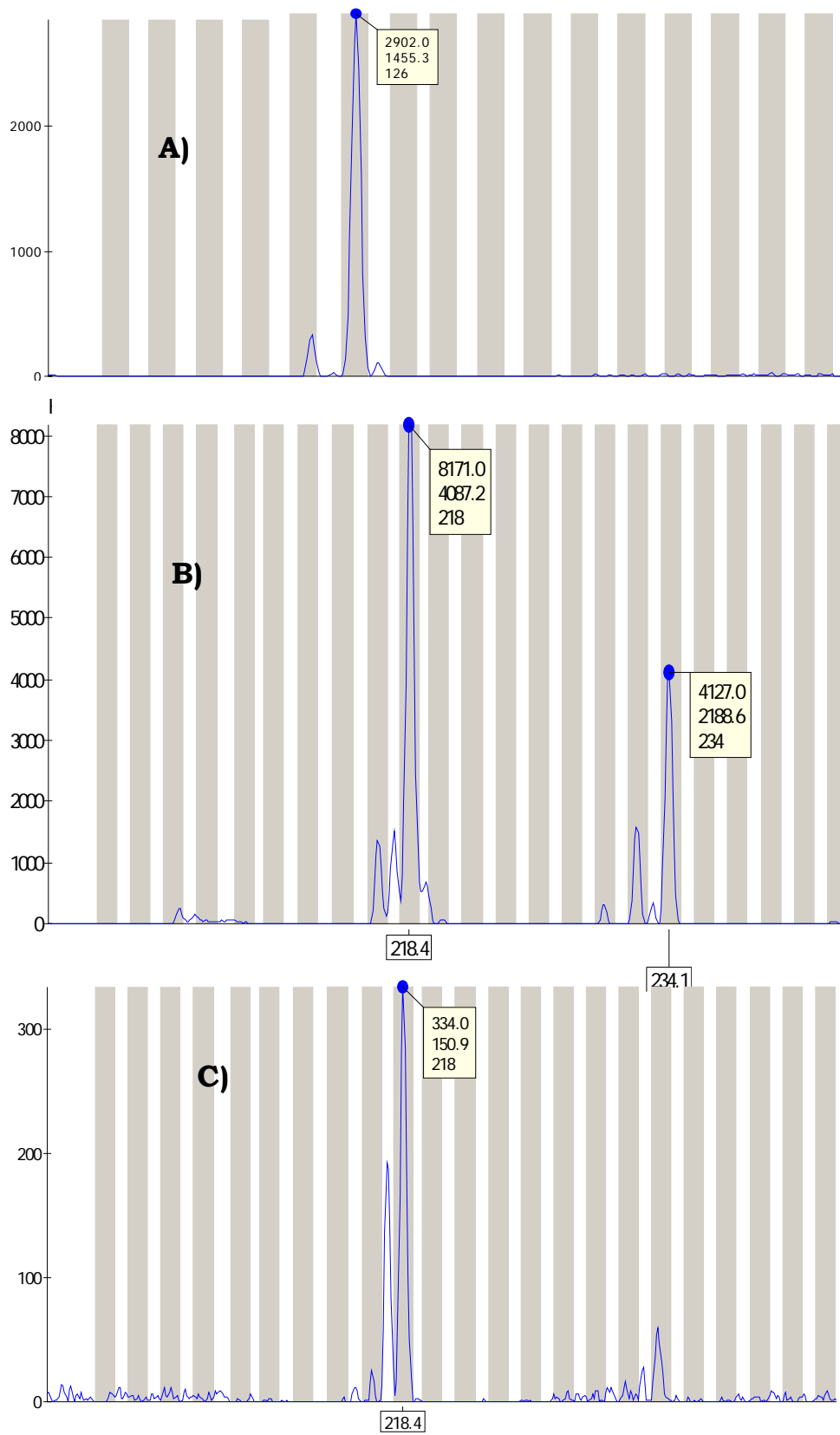
<b>Marcador</b>	<b>Localização</b>	<b>Nucleotídeos</b>
<b>1. D3S1307</b>	3p26.3	1324951-1325104
<b>2. D3S1263</b>	3p25.3	11492252-11492482
<b>3. D3S1286</b>	3p24.3	15794212-15794450
<b>4. D3S1581</b>	3p21.31	48572314-48572405
<b>5. D3S1300</b>	3p14.2	60484947-60485189
<b>6. D3S1079</b>	3p13	70450236-70450369
<b>7. D3S1274</b>	3p12.3	78953899-78954026





## Cromossomo 3

Figura 3. Posições relativas dos marcadores microssatélites mapeados ao longo do braço curto do cromossomo 3 (3p) utilizados nos ensaios de LOH.



**Figura 4.** Exemplo de perfil dos alelos do marcador D3S1274. A) paciente homocigoto no sangue; B) e C) paciente heterocigoto no sangue e com LOH no tumor, respectivamente.

### 3.5-Análise estatística dos dados

O teste  $t$  de Student foi utilizado para comparar as médias de idade entre pacientes e controles e o teste do Qui-Quadrado de homogeneidade para verificar a distribuição dos sexos entre os grupos, na verificação da adequação do pareamento.

As frequências genóticas observadas para o gene *CYP1A1* foram comparadas com as esperadas, de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg, conforme BEIGUELMAN, 1988.

Para o gene *CYP1A1*, no qual os três genótipos foram identificados, a significância estatística das diferenças das frequências genóticas entre pacientes e controles foi estimada a partir de uma tabela de contingência 3X2 demonstrada a seguir:

<b>Genótipos</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Controles</b>
<b>T/T</b>	<b>A</b>	<b>D</b>
<b>T/C</b>	<b>B</b>	<b>E</b>
<b>C/C</b>	<b>C</b>	<b>F</b>

A OR (razão de chances ou *Odds Ratios*) foi calculada como abaixo descrito, sendo A, B, C, D, E e F as frequências absolutas obtidas:

OR T/T= 1,0 (adotado como referência)

OR T/C= (bXd)/(aXe)

OR C/C= (cXd)/(aXf)

Para os genes *GSTM1* e *GSTT1*, nos quais os heterozigotos não foram identificados, a significância estatística das diferenças das frequências genóticas

entre pacientes e controles foi estimada a partir de uma tabela de contingência 2X2 demonstrada a seguir:

	<b>Pacientes</b>	<b>Controles</b>
<b>Positivo para o fator pesquisado (ausência do gene)</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
<b>Negativo para o fator pesquisado (presença do gene)</b>	<b>C</b>	<b>D</b>

A OR (razão de chances ou *Odds Ratios*) foi calculada como abaixo descrito, sendo A, B, C e D as frequências absolutas obtidas:

$$OR = \frac{A \times D}{B \times C}$$

A análise conjunta de genótipos considerados de risco foi realizada através de tabelas de contingência 2X2 considerando-se combinações genotípicas de fase I e II (T/C+C/C e *GSTM1* e/ou *GSTT1* nulos) e apenas de fase II (*GSTM1* e *GSTT1* nulos).

O intervalo de confiança de 95% foi obtido pelo programa DPP Braille Biomédica ([www.braile.com.br](http://www.braile.com.br)).

As frequências de perdas de heterozigose foram obtidas por contagem direta, tanto para cada marcador isoladamente quanto para a análise conjunta.

O teste do Qui-Quadrado de homogeneidade foi utilizado na comparação entre os parâmetros histopatológicos (invasão de linfonodos regionais e grau de diferenciação do tumor) e clínico (óbito) tanto para os diferentes genótipos dos genes envolvidos na metabolização como para os marcadores microsatélites. O teste foi realizado em tabelas de contingência 2X2, para se obter o valor de P.

Foi realizada análise da variância para comparar as médias dos tamanhos dos tumores com os resultados obtidos dos genes candidatos de suscetibilidade e das perdas de heterozigose nos marcadores microssatélites.

Os testes *t* de Student, do Qui-Quadrado e a análise da variância foram realizados de acordo com as fórmulas apresentadas por BEILGUELMAN, 1988.

O valor de P (a 0,05) foi determinado pelo teste exato de Fisher com o auxílio do programa RXC (MILLER, 1997).

#### 4. RESULTADOS

A maior parte da amostra foi constituída de indivíduos tabagistas, sendo 85 (94,4%) no grupo dos pacientes e 71 no grupo dos controles (87,6%). Os indivíduos ex-fumantes foram considerados como fumantes de acordo com o tempo de abandono do hábito tabagista (até 10 anos). Entre os pacientes, observamos que 40 (43,9%) tinham o hábito de consumir cigarro de palha, tabaco em cachimbo ou mascar fumo, associados ou não ao cigarro comum. O consumo de cigarro de palha foi, entre estes, o hábito mais prevalente, estando presente em 37 dos 40 pacientes (92,5%), sendo os outros três (7,5%) consumidores exclusivamente de tabaco em cachimbo. Com relação ao etilismo, 70 pacientes (76,9%) se consideraram consumidores freqüentes de bebidas alcoólicas, sendo 33 (36,3%) consumidores de destilados, seis (6,6%) de não-destilados e 31 (34%) de ambos os tipos de bebidas alcoólicas (destiladas e não destiladas). Trinta e seis pacientes (39,6%) se declararam como consumidores de alimentos ou bebidas muito quentes, especialmente de chimarrão e café. Além disso, 37 (40,6%) declararam história de câncer na família, sendo os tipos mais prevalentes os de cabeça e pescoço e os relacionados ao trato digestivo inferior.

O teste *t* de Student realizado para a comparação das médias de idade dos pacientes e dos controles demonstrou que a diferença não foi estatisticamente significativa ( $t=0,023$ ;  $P>0,90$ ), indicando que o pareamento por idade foi adequado.

A freqüência de homens e mulheres também foi homoganeamente distribuída entre os grupos de pacientes e controles, indicando que o pareamento por sexo foi adequado ( $\chi^2=3,72$ ;  $P>0,05$ ).

#### 4.1. Frequências genotípicas dos genes *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1*

As genotipagens de *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* foram obtidas de todos os 91 pacientes e 81 controles da amostra.

Para o gene *CYP1A1*, foram observadas as frequências de 60,4% (n=55) e 65,4% (n=53) de homozigotos T/T; 29,7% (n=27) e 28,4% (n=23) de heterozigotos T/C; 9,9% (n=9) e 6,2% (n=5) de homozigotos C/C, em pacientes e controles, respectivamente (Tabelas 4 e 5). As frequências genotípicas observadas para este gene mostraram-se de acordo com as esperadas pelo Teorema de Hardy-Weinberg, indicando que as amostras analisadas foram retiradas de populações em equilíbrio (pacientes:  $\chi^2_{1} = 3,69$ ;  $P > 0,05$ ; controles:  $\chi^2_{1} = 0,9$ ;  $P > 0,30$ ).

Para o gene *GSTM1* foram observadas as frequências de 39,6% (n=36) e 51,8% (n=42) do genótipo nulo, entre pacientes e controles, respectivamente.

Para o gene *GSTT1* foram observadas as frequências de 33% (n=30) e 28,4% (n=23) do genótipo nulo, entre pacientes e controles, respectivamente.

##### 4.1.2. Estudo de associação

A comparação das frequências obtidas nos dois grupos indicou ausência de associação positiva ou negativa com a suscetibilidade ao câncer bucal quando cada um dos genótipos foi analisado isoladamente ou em conjunto, como indicado na Tabela 4.

Para a análise em conjunto foram agrupados os indivíduos que possuíam deficiência em ambas as fases do metabolismo de xenobióticos: genótipos T/C e C/C

para o gene *CYP1A1* em combinação com o genótipo nulo para os genes *GSTM1* ou *GSTT1* (dois genótipos considerados de risco), ou ambos os genes da fase II nulos (três genótipos considerados de risco). Foram ainda considerados os indivíduos com deficiência apenas na fase II da biotransformação, ou seja, aqueles *GSTM1* e *GSTT1* nulos (dois genótipos considerados de risco).

Dentre os pacientes com deficiência nas fases I e II foram encontrados 16,5% (n=15) dos indivíduos com 2 genótipos considerados de risco e 5,5% (n=5) dos indivíduos com 3 genótipos considerados de risco. Dentre os controles foram observados 17,3% (n=14) e 6,2% (n=5) de indivíduos com 2 e 3 genótipos considerados de risco, respectivamente. Dentre os indivíduos com a deleção em ambos os genes estudados da fase II, foram encontrados 14,3% (n=13) de indivíduos dentre os pacientes e 17,3% (n=14) entre os controles.



**Tabela 4. Número de indivíduos com e sem genótipos considerados de risco e respectivas ORs e intervalos de confiança 95% para os três genes candidatos analisados**

	Pacientes		Controles		OR	IC 95%
	GR	GNR	GR	GNR		
<i>CYP1A1 T/C</i>	27	55	23	53	1,13	0,58-2,22
<i>CYP1A1 C/C</i>	9	55	5	53	1,73	0,55-5,51
<i>CYP1A1 (T/C + C/C)</i>	36	55	28	53	1,24	0,67-2,31
<i>GSTM1</i>	36	55	42	39	0,61	0,33-1,11
<i>GSTT1</i>	30	61	23	58	1,24	0,65-2,38
<b>2 genótipos*</b>	15	76	14	67	0,94	0,42-2,10
<b>3 genótipos*</b>	5	86	5	76	0,88	0,25-3,17
<i>GSTM1/GSTT1**</i>	13	78	14	67	0,80	0,35-1,82

Legenda: GR: genótipo considerado de risco; GNR: genótipo não considerado de risco; \* Fases I e II; \*\* Fase II.

### 4.1.3 Análise dos parâmetros histopatológicos e clínico

Os diferentes genótipos foram correlacionados aos parâmetros histopatológicos (tamanho do tumor, invasão de linfonodos regionais e grau de diferenciação do tumor) e ao parâmetro clínico (ocorrência ou não de óbito), selecionados de acordo com a disponibilidade das informações presentes nos prontuários dos centros de coleta.

Para o grau de diferenciação do tumor, considerou-se os pacientes com graus II (moderadamente diferenciados) e III (pouco diferenciados), uma vez que apenas três indivíduos apresentaram tumores de grau I (bem diferenciados), sendo excluídos da análise. Não foi possível a realização da análise estatística para o parâmetro presença ou ausência de metástases à distância, uma vez que estas ocorreram em apenas três pacientes.

O teste do Qui-Quadrado de homogeneidade não demonstrou diferenças significativas quando o total de pacientes com genótipos considerados de risco foi comparado com aqueles sem genótipos considerados de risco, para nenhum dos parâmetros analisados: invasão de linfonodos regionais -  $\chi^2_1 = 1,21$ ;  $P > 0,20$ ; grau de diferenciação tumoral -  $\chi^2_1 = 0,80$ ;  $P > 0,50$  e ocorrência de óbito -  $\chi^2_1 = 0,008$ ;  $P > 0,95$  (Tabelas de 5 a 7). Também não se observou diferença estatisticamente significativa quando a mesma comparação foi feita para cada gene isoladamente com relação à invasão de linfonodos regionais e óbito (Tabelas 5 e 7). Entretanto, o parâmetro grau de diferenciação tumoral se mostrou estatisticamente significativo para o gene *GSTT1* (Tabela 6).

**Tabela 5. Distribuição dos pacientes com genótipos considerados de risco com presença ou ausência de envolvimento de linfonodos regionais**

	Total		CYPIA1		GSTMI		GSTT1	
	Com risco	Sem risco	T/T	T/C e C/C	+	-	+	-
Com ILR	55	80	27	18	24	21	29	16
Sem ILR	28	56	15	13	20	8	21	7
<b>Qui quadrado</b>	$\chi^2_1=1,21$ ; P>0,20		$\chi^2_1=0,28$ ; P>0,50		$\chi^2_1=2,34$ ; P>0,10		$\chi^2_1=0,89$ ; P>0,30	

ILR=invasão de linfonodos regionais.

**Tabela 6. Distribuição dos pacientes com genótipos considerados de risco com graus II e III de diferenciação tumoral**

	Total		CYPIA1		GSTMI		GSTT1	
	Com risco	Sem risco	T/T	T/C e C/C	+	-	+	-
Grau II	50	67	27	12	21	18	19	20
Grau III	26	46	12	12	14	10	20	4
<b>Qui quadrado</b>	$\chi^2_1=0,80$ ; P>0,50		$\chi^2_1=2,3$ ; P>0,10		$\chi^2_1=0,11$ ; P>0,70		$\chi^2_1=7,54$ ; P<0,01	

**Tabela 7. Distribuição dos pacientes com genótipos considerados de risco com ocorrência ou não de óbitos**

	Total		CYPIA1		GSTMI		GSTT1	
	Com risco	Sem risco	T/T	T/C e C/C	+	-	+	-
Com óbito	40	62	19	15	22	12	21	13
Sem óbito	51	81	25	19	25	19	31	13
<b>Qui quadrado</b>	$\chi^2_1=0,008$ ; P>0,95		$\chi^2_1=0,006$ ; P>0,90		$\chi^2_1=0,50$ ; P>0,30		$\chi^2_1=0,63$ ; P>0,30	

As médias dos tamanhos dos tumores dos pacientes com e sem genótipos considerados de risco foram comparadas pela análise da variância. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 9 conforme os dados da Tabela 8. O teste de

Bartlett indicou homogeneidade entre as variâncias analisadas ( $\chi^2_{15}$ corr.=3,66; P>0,50).

**Tabela 8. Médias (em cm) dos tamanhos dos tumores dos pacientes com e sem genótipos considerados de risco**

<i>CYP1A1</i>				<i>GSTM1</i>				<i>GSTT1</i>			
GR		GNR		GR		GNR		GR		GNR	
N	média ±DP	N	média ±DP	N	média ±DP	N	média ±DP	N	média ±DP	N	média ±DP
50	3,40±1,55	26	3,39±1,57	45	3,43±1,72	31	3,34±1,24	47	3,29±1,52	29	3,61±1,60

**Tabela 9. Análise de variância dos dados apresentados na Tabela 8**

Variação	G.L.	SQ	S <sup>2</sup> x	F	G.L.	P
Entre GR e GNR	1	0,26	0,26	0,11	1;222	P>0,05
Entre marcadores	2	0,01	0,005	0,002	2;222	P>0,05
Interação	2	1,64	0,82	0,34	2;222	P>0,05
E. T. G.	5	1,91	0,38	0,16	5;222	P>0,05
Resíduo	222	535,94	2,41			
<b>Total</b>	<b>227</b>	<b>537,85</b>				

Legenda: GR= com genótipo de risco; GNR= sem genótipo de risco; ETG: entre todos os grupos.

## 4.2 Marcadores microssatélites polimórficos em 3p

Foram analisados sete marcadores microssatélites em 3p (D3S1286, D3S1263, D3S1079, D3S1300, D3S1274, D3S1307 e D3S1581) (Tabela 3) em amostras de DNA tumoral e de sangue periférico de 78 dos 91 pacientes.

O número de pacientes analisados variou entre os marcadores microssatélites em decorrência de ausência de amplificação pela PCR de alguns marcadores e da escassez de DNA tumoral para a realização de todas as reações.

Foram realizadas repetições de todas as reações de PCR que apresentaram resultados duvidosos e das amostras que não mostraram sinal de fluorescência satisfatório para a realização dos cálculos de LOH. As amostras de DNA tumorais números 5, 50 e 56 não amplificaram para nenhum dos sete marcadores microssatélites e três pacientes foram homozigotos em todos os locos amplificados. Assim, nos cálculos de LOH para locos combinados considerou-se uma amostra final de 72 pares de DNA, sangüíneo e tumoral.

Em todos os locos analisados foram encontradas perdas de heterozigose, variando de 37,1% para o marcador D3S1263 a 55,2% para o marcador D3S1286. Dos sete marcadores analisados, seis (D3S1286, D3S1079, D3S1300, D3S1274, D3S1307 e D3S1581) mostraram freqüências de LOH próximas a 50% (Tabela 10).

A análise da freqüência de LOH em locos combinados também mostrou uma alta freqüência de perda alélica, sendo: 57 pacientes (79,1%) tiveram LOH em pelo menos um dos locos; 35 pacientes (48,6%) em pelo menos 2 dos locos; 26 pacientes (36,1%) em pelo menos 3 dos locos e 17 pacientes (23,6%) em 4 ou mais dos locos.

Foi realizada uma análise para verificação da ocorrência de LOH simultânea entre os marcadores microssatélites de localização mais próxima no mapa físico, com o objetivo de definir a existência de regiões mínimas de deleção. Quando se avaliou de forma conjunta os microssatélites D3S1263 e D3D1286, obteve-se uma frequência de LOH de 78,8%, definindo-se uma região de 4,3 Mb. Outra região mínima foi obtida pela análise conjunta dos marcadores microssatélites D3S1300 e D3S1079, onde se obteve 74,2% de perda, numa região de 10 Mb. Foram ainda avaliados simultaneamente os marcadores D3S1307/D3S1263/D3S1286 e D3S1300/D3S1079/D3S1274, sendo obtidas frequências de LOH iguais a 62,2% e 64,1%, respectivamente.

As frequências de LOH foram avaliadas também em relação aos diferentes sítios anatômicos dos tumores e observou-se que: dos 23 pacientes com tumores exclusivamente de língua que puderam ser avaliados, 18 deles (78,3%) apresentaram perda em pelo menos um dos locos analisados e 9 (39,1%) em mais de um loco; dentre os 16 pacientes com tumores exclusivamente de assoalho bucal, 14 (87,5%) apresentaram LOH em pelo menos um dos locos e 8 (50%) em mais de um loco; dentre os 5 pacientes com tumores de orofaringe, 3 (60%) apresentaram LOH em pelo menos um dos locos e 2 (40%) em mais de um loco; dentre os 8 pacientes com tumores exclusivamente de mucosa (sem especificação), 5 (62,5%) apresentaram LOH em pelo menos um dos locos e 4 (50%) em mais de um loco; dos 7 pacientes com tumores exclusivamente de palato, 4 (57,1%) apresentaram LOH em pelo menos um dos locos e 3 (42,9%) apresentaram LOH em mais de um loco e dos 6 pacientes com

tumores exclusivamente de trígono, todos (100%) apresentaram LOH em mais de um dos locos analisados.

**Tabela 10. Frequências de heterozigose e das perdas alélicas obtidas nos sete marcadores microssatélites em 3p**

<b>Marcador microssatélite em 3p</b>	<b>Pacientes analisados (N)</b>	<b>Heterozigose (%) (heterozigotos/total de casos)</b>	<b>LOHs (%) LOH/casos informativos</b>
<b>1. D3S1307</b>	54	75,9 (41/54)	48,8 (20/41)
<b>2. D3S1263</b>	58	60,3 (35/58)	37,1 (13/35)
<b>3. D3S1286</b>	63	92 (58/63)	55,2 (32/58)
<b>4. D3S1581</b>	57	75,4 (43/57)	48,8 (21/43)
<b>5. D3S1300</b>	58	82,7 (48/58)	50 (24/48)
<b>6. D3S1079</b>	67	52,2 (35/67)	48,6 (17/35)
<b>7. D3S1274</b>	72	55,5 (40/72)	55 (22/40)

Legenda: LOHs: perdas de heterozigose.



#### 4.2.1 Análise dos parâmetros histopatológicos e clínico

Foi realizada a análise entre os parâmetros histopatológicos (tamanho do tumor, invasão de linfonodos regionais e grau de diferenciação tumoral) e clínico (óbito) dos pacientes e a LOH nos marcadores microssatélites. Foram incluídos somente os pacientes que possuíam a informação referente ao parâmetro em questão, o que determinou uma redução do tamanho da amostra (Tabelas 11, 13, 14 e 15).

A Tabela 11 apresenta as médias dos tamanhos dos tumores dos pacientes com e sem LOH para os sete marcadores analisados. A análise da variância, aplicada às informações desta tabela, não demonstrou diferenças estatisticamente significativas (Tabela 12). O teste de Bartlett, para avaliar a homogeneidade das variâncias, apresentou um valor não significativo, igual a:  $\chi^2_{(13)\text{corr.}}=3,75; P>0,95$ .

**Tabela 11. Médias dos tamanhos dos tumores e número de pacientes com e sem LOH para os sete marcadores microssatélites em 3p**

Marcador	Médias e desvios		Número de pacientes	
	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH
	média ± DP	média ± DP		
<b>D3S1286</b>	3,22 ± 1,51	3,65 ± 1,70	28	22
<b>D3S1263</b>	3,77 ± 1,54	3,62 ± 1,90	11	21
<b>D3S1079</b>	3,01 ± 1,58	3,94 ± 1,80	15	18
<b>D3S1300</b>	3,68 ± 1,68	3,54 ± 1,83	20	21
<b>D3S1274</b>	3,70 ± 1,47	2,92 ± 1,28	18	13
<b>D3S1307</b>	3,38 ± 1,69	4,12 ± 1,78	15	20
<b>D3S1581</b>	3,67 ± 1,73	3,50 ± 1,75	20	18

Legenda: LOH: perda de heterozigose.

**Tabela 12. Análise da variância para a comparação das médias dos tamanhos dos tumores dos pacientes com e sem LOH nos sete marcadores microssatélites em 3p**

Varição	G.L.	SQ	S <sup>2</sup> X	F	G.L.	P
Entre com e sem LOH	1	1,96	1,96	0,69	1; 246	P>0,05
Entre marcadores	6	4,83	0,81	0,29	6; 246	P>0,05
Interação	6	17,39	2,89	1,02	6; 246	P>0,05
E.T.G.	13	24,18	1,86	0,65	13; 246	P>0,05
Resíduo	246	699,52	2,84			
total	259	723,70				

Legenda: LOH: perda de heterozigose; ETG: entre todos os grupos.

O número de pacientes com e sem LOH que tinham grau II ou III de diferenciação tumoral e que foram a óbito apresentou-se homogeneamente distribuído tanto quando cada marcador foi analisado isoladamente (Tabelas 13 e 14), como quando os resultados foram analisados em conjunto (grau de diferenciação tumoral:  $\chi^2_{1}=0,17$ ; P>0,50 e óbito:  $\chi^2_{1}=0,08$ ; P>0,70).

**Tabela 13. Número de pacientes com e sem LOH e com graus II e III de diferenciação tumoral nos sete marcadores analisados e resultados do teste do  $\chi^2$  de homogeneidade**

	D3S1286		D3S1263		D3S1079		D3S1300		D3S1274		D3S1307		D3S1581	
	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH
<b>Grau II</b>	16	11	6	7	7	6	9	10	11	8	10	7	8	10
<b>Grau III</b>	9	5	4	6	7	4	8	5	5	4	5	7	8	5
<b>Qui quadrado</b>	$\chi^2_{1}=0,09$ P>0,70		$\chi^2_{1}=0,08$ P>0,70		$\chi^2_{1}=0,23$ P>0,50		$\chi^2_{1}=0,60$ P>0,30		$\chi^2_{1}=0,01$ P>0,90		$\chi^2_{1}=0,81$ P>0,30		$\chi^2_{1}=0,87$ P>0,30	

Legenda: LOH: perda de heterozigose

**Tabela 14. Número de pacientes com e sem LOH e com e sem ocorrência de óbito nos sete marcadores analisados e resultados do teste do  $\chi^2$  de homogeneidade**

	<b>D3S1286</b>		<b>D3S1263</b>		<b>D3S1079</b>		<b>D3S1300</b>		<b>D3S1274</b>		<b>D3S1307</b>		<b>D3S1581</b>	
	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH
<b>Com óbito</b>	14	10	6	10	7	8	9	10	9	8	9	8	9	8
<b>Sem óbito</b>	15	13	5	12	10	10	13	11	11	7	8	12	11	12
<b>Qui quadrado</b>	$\chi^2_{1}=0,11;$ P>0,70		$\chi^2_{1}=0,23;$ P>0,50		$\chi^2_{1}=0,04$ P>0,80		$\chi^2_{1}=0,19;$ P>0,50		$\chi^2_{1}=0,23;$ P>0,50		$\chi^2_{1}=0,61;$ P>0,30		$\chi^2_{1}=0,10;$ P>0,70	

Legenda: LOH: perda de heterozigose

A mesma análise para o parâmetro invasão de linfonodos regionais se mostrou estatisticamente significativa para dois (D3S1263 e D3S1307) dos sete marcadores analisados (Tabela 15).

**Tabela 15. Número de pacientes com e sem LOH e com e sem invasão de linfonodos regionais nos sete marcadores analisados e resultados do teste do  $\chi^2$  de homogeneidade**

	<b>D3S1286</b>		<b>D3S1263</b>		<b>D3S1079</b>		<b>D3S1300</b>		<b>D3S1274</b>		<b>D3S1307</b>		<b>D3S1581</b>	
	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH
<b>Com ILR</b>	19	10	10	7	11	7	11	9	13	7	12	7	10	11
<b>Sem ILR</b>	8	11	1	13	5	9	9	10	5	6	3	11	6	8
<b>Qui quadrado</b>	$\chi^2_{1}=2,54;$ P>0,10		$\chi^2_{1}=8,94;$ P<0,01		$\chi^2_{1}=2,02;$ P>0,10		$\chi^2_{1}=0,06;$ P>0,80		$\chi^2_{1}=1,08;$ P>0,20		$\chi^2_{1}=5,64;$ P<0,05		$\chi^2_{1}=0,07$ P>0,70	

Legenda: ILR: invasão de linfonodos regionais; LOH: perda de heterozigose.

A análise conjunta dos resultados obtidos para este parâmetro em cada marcador também apresentou um valor significativo de  $\chi^2_{1}=14,6$ ; P<0,001, indicando que o número de pacientes com e sem LOH e com e sem invasão de linfonodos regionais não se distribuem igualmente.

## 5. DISCUSSÃO

Os carcinomas de cabeça e pescoço constituem um grupo de doenças heterogêneas com complexas anormalidades moleculares. Podem ter origem de lesões pré-malignas por um processo de expansão clonal devido ao acúmulo de alterações genéticas. Estas alterações resultam na inativação de genes supressores de tumor e na ativação de proto-oncogenes (PEREZ-ORDOÑEZ et al., 2006).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), dentre os carcinomas de cabeça e pescoço, os de boca são considerados os mais freqüentes, com cerca de 390 mil novos casos por ano (STEWART et al., 2003). A designação comum de “câncer de boca” refere-se a uma categoria abrangente de localização de neoplasias com diferentes etiologias e perfis histológicos, embora a grande maioria dos tumores seja do tipo carcinoma de células escamosas. Sua etiologia é multifatorial, integrando fatores endógenos, como a suscetibilidade genética, e fatores exógenos ambientais e comportamentais, como o hábito tabagista e etilista, de cuja integração pode resultar o agravamento da doença (BIAZEVIC et al., 2006).

Neste estudo, foram analisados 91 pacientes portadores de carcinomas bucais, sendo que a maior parte da amostra foi composta por indivíduos consumidores de tabaco, aproximadamente 90%, muitos dos quais associado ao etilismo. Entre os tabagistas, observamos um grande número de pacientes consumidores de cigarro de palha e alguns de tabaco em cachimbo ou fumo de mascar, associado ou não ao cigarro comum. Conforme já descrito na Introdução deste trabalho, o tabaco é considerado, isoladamente, o principal fator de risco para o desenvolvimento deste

tumor (ZAKRZEWSKA, 1999; SCULLY e PORTER, 2000). O grande número de pacientes consumidores de cigarro de palha diferencia nossa amostra da de outros autores. É provável que este fato se deva aos aspectos culturais, uma vez que estes indivíduos habitam áreas rurais do estado do Paraná. Não discutimos este dado em relação um maior ou menor risco dentro do grupo dos tabagistas, pois não obtivemos esta informação em grande parte do grupo controle, ficando apenas como registro para futuras investigações, assim como as informações que se seguem, sobre etilismo, consumo de bebidas quentes e história familiar.

Cerca de 80% dos pacientes se declararam consumidores freqüentes de bebidas alcoólicas destiladas (especialmente aguardente e vodka), ou não–destiladas (onde a cerveja foi o tipo prevalente). Dados da literatura ressaltam a importância do álcool como fator de risco no desenvolvimento de neoplasias do trato aéreo-digestivo superior não apenas como fator independente, mas como efeito de interação com o tabaco. Acredita-se que esta interação seja a causa do Brasil ter uma incidência comparável a da Índia, país que apresenta a maior incidência mundial deste tipo de câncer (HAMADA et al., 1991; SCHLECHT et al., 1999).

Cerca de 40% dos pacientes se classificaram como consumidores de alimentos ou bebidas muito quentes, especialmente chimarrão e café. Os dados da literatura sobre o envolvimento da ingestão de bebidas e alimentos quentes no desenvolvimento do câncer de boca são controversos, com alguns autores descrevendo este hábito como um fator de risco adjuvante (FRANCO et al., 1989; CASTELLSAGUE et al., 2000) e outros demonstrando ausência de associação (McLAUGHLIN et al., 1988).

Aproximadamente 40% dos pacientes tinham história de câncer na família, sendo os tipos mais prevalentes os de cabeça e pescoço ou relacionados ao trato digestivo inferior. Estudos epidemiológicos sugerem a história familiar como um fator de risco para cânceres de cabeça e pescoço, com uma discreta associação, o que parece indicar uma relação com ambiente comum de exposição ambiental a cigarro e álcool (GOLDSTEIN et al., 1994 apud ZAKRZEWSKA, 1999; NAGPAL e DAS, 2003).

Segundo VERSCHUUR et al. (1999) e PITMAN et al. (2000), carcinomas escamosos de cabeça e pescoço afetando indivíduos jovens e mulheres sem fatores de risco conhecidos têm apresentado aumento de incidência, especialmente na região bucal. Parecem existir diferenças clínicas e histopatológicas nestes tumores, o que sugere a existência de uma entidade biológica distinta. Na amostra deste estudo os pacientes mais jovens possuíam entre 38 e 40 anos de idade ao diagnóstico, e eram todos pertencentes ao sexo masculino e fumantes, o que nos impossibilitou de realizar uma discussão sobre incidência e etiologia de tumores bucais em pacientes mais jovens.

Existem fortes evidências da associação do vírus HPV, especialmente dos tipos 16 e 18, com o desenvolvimento de carcinomas bucais. Os tumores oriundos da exposição ao HPV parecem possuir características clínicas e histopatológicas diferentes, e se constituírem numa entidade biológica distinta. Apesar de ainda não ser consenso, parece que tumores HPV positivos ocorrem em pacientes mais jovens, sem história de uso de tabaco e com história de prática de sexo oral e de número elevado de parceiros sexuais (PEREZ-ORDOÑEZ et al., 2006). Neste trabalho, quando foi possível o questionamento sobre prática de sexo oral, todos os pacientes responderam

não possuírem tal hábito. Entretanto, como não foi realizada análise para tipagem de HPV nos pacientes desta amostra, não foi possível uma discussão sobre correlação entre exposição a este vírus e o desenvolvimento de carcinomas bucais.

### **5.1. Genes candidatos de suscetibilidade ao câncer**

Segundo OLSHAN et al. (2000) os CCECP se constituem em um modelo ideal para estudar interações entre genótipo e exposição ambiental. Enzimas envolvidas na metabolização de xenobióticos, tanto na ativação (Fase I) quanto na detoxificação (Fase II) têm recebido recentemente grande atenção como possíveis fatores de suscetibilidade individual a uma variedade de neoplasias.

Variantes alélicas polimórficas dos genes que codificam estas enzimas podem alterar a expressão ou a função enzimática, levando a um aumento ou a uma diminuição na ativação e detoxificação de carcinógenos. Tais enzimas fazem parte de superfamílias que possuem um importante papel na metabolização de um grande número de compostos, como os encontrados na dieta e na fumaça do cigarro, atuando, conseqüentemente, na manutenção da integridade genômica (GEISLER e OLSHAN, 2001). Segundo BARTSCH (2000), desde que muitos compostos requerem ativação metabólica antes de se ligarem ao DNA, é provável que variações individuais no metabolismo influenciem na formação de aductos no material genético, podendo levar a um processo carcinogênico.

Diversos estudos têm demonstrado associação entre variantes alélicas polimórficas em genes do metabolismo e exposição ambiental no risco de desenvolver

câncer de pulmão, bexiga, cavidade bucal, dentre outros, principalmente em indivíduos fumantes (AU et al., 2001).

LAZARUS et al. (1998) sugerem que a ocorrência de mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor em cânceres bucais estaria associada à exposição ambiental a carcinógenos específicos, na presença de determinadas variantes alélicas em genes responsáveis pela metabolização de xenobióticos. Aquelas que têm sido mais freqüentemente associadas ao desenvolvimento destes tumores incluem as pertencentes às famílias do Citocromo P-450, como o gene *CYP1A1*, e das Glutathiona S-transferases, como os genes *GSTM1* e *GSTT1*.

Neste trabalho foram estudados os genótipos de *CYP1A1* (polimorfismo 3801T>C), *GSTM1* e *GSTT1* (polimorfismo de presença ou ausência dos genes) em 91 pacientes com carcinomas bucais e em 81 controles. A comparação das freqüências obtidas entre os dois grupos indicou ausência de associação positiva ou negativa com a suscetibilidade ao câncer bucal, como indicado na Tabela 4.

O gene *CYP1A1* codifica uma enzima chave do metabolismo de carcinógenos considerada um potencial marcador de suscetibilidade a vários tipos de cânceres, especialmente por estar envolvida com a biotransformação de PAHs, como o benzo(a)pireno, um potente carcinógeno presente na fumaça do cigarro (VINEIS et al., 2004).

Todos os estudos de associação envolvendo o gene *CYP1A1*, descritos a seguir, incluindo o presente trabalho, adotam como genótipo considerado de risco o que contém, em heterozigose ou homozigose, os alelos *CYP1A1\*2A* ou *CYP1A1\*2B*, que



são comparados em relação à frequência do genótipo homozigoto para o alelo *CYP1A1\*1A* ou *CYP1A1\*1B*.

SATO et al. (1999) encontraram associação entre este gene (polimorfismo *380T>C*) e o desenvolvimento do câncer bucal (OR=2,3; IC95%=1,1-4,7), o que difere do observado por MATTHIAS et al. (1998) e MARQUES et al. (2006) que, assim como os dados deste trabalho, não correlacionaram o gene *CYP1A1* ao câncer bucal, apesar dos genótipos considerados de risco terem sido mais frequentes no grupo dos pacientes em relação ao dos controles (Tabela 4).

HASHIBE et al. (2003), SUGIMURA et al. (2006) e LEICHSENDRING et al. (2006), analisando outro polimorfismo presente em diferente posição deste mesmo gene (*2455A>G*), também não encontraram associação entre o gene *CYP1A1* e o câncer bucal, diferindo dos resultados encontrados por SATO et al. (2000), que obtiveram um risco elevado (OR=4,19; IC95%=1,59-11,1).

Genes pertencentes à família das Glutationas promovem a conjugação de inúmeros compostos potencialmente carcinogênicos, sendo que a deleção em homozigose de *GSTM1* e *GSTT1* pode conferir suscetibilidade aumentada ao câncer (CASCORBI, 2006). Diversos autores descrevem associações positivas entre variantes alélicas pertencentes à família das Glutationa S-transferases e a suscetibilidade ao câncer de boca (JOURENKOVA-MIRONOVA et al., 1999; BUCH et al., 2002; DRUMMOND et al., 2004). JHAVAR et al. (2004) encontraram um risco elevado (OR=3,7; IC95%=1,14-11,99) entre os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* e o desenvolvimento de múltiplos neoplasmas de boca e faringe, ressaltando a

importância da identificação de variantes alélicas do metabolismo em indivíduos com risco aumentado de desenvolver tumores secundários.

GATTÁS et al., (2006), num estudo de populações brasileiras, concluíram que o genótipo *GSTM1* nulo aumenta o risco de desenvolver câncer de cabeça e pescoço de um modo geral (OR=2,2; IC95%=1,24-3,79), bucal (OR=2,8; IC95%=1,28-5,98) e também de neoplasia de faringe (OR=2,2; IC95%=1,08-4,63). DRUMMOND et al. (2004) também encontraram associação entre *GSTM1* e câncer bucal (OR=2,53; IC95%=1,22-5,24), e obtiveram um risco ainda mais elevado quando correlacionaram a deleção do gene com um sítio tumoral específico (assoalho bucal) (OR=3,67; IC95%=1,11-12,11).

Contrariamente, alguns trabalhos não demonstraram associação entre a ausência deste gene e o câncer de boca (OLSHAN et al., 2000; HANH et al., 2002; HASHIBE et al., 2003; SUGIMURA et al., 2006). Nossos dados estão de acordo com os descritos por estes autores, uma vez que além de não encontrarmos associação positiva entre o genótipo nulo de *GSTM1* e o câncer bucal, observamos uma clara prevalência deste entre o grupo dos controles quando comparado ao dos pacientes (Tabela 4). Isto pode ser reflexo da alta frequência do alelo nulo nas populações, que varia de cerca de 40% a 60%, sendo a mais alta frequência observada dentre os caucasóides, que constituíram a maior parte desta amostra. Por exemplo, em estudo realizado por nosso grupo, LOSI-GUEMBAROVSKI et al. (2002), observamos uma frequência de 47,9% de indivíduos com genótipo *GSTM1* nulo em amostra de caucasóides do Sul do Brasil (n=142). Porém, os dados do presente trabalho talvez reflitam a real ausência de associação entre *GSTM1* nulo, isoladamente, e o

desenvolvimento de CCE bucais. Nossos dados corroboram ainda os de GAUDET et al. (2004), que também obtiveram uma frequência inferior do genótipo nulo para *GSTM1* dentre pacientes (OR=0,88; IC95%=0,50-1,50) quando comparados a controles.

Neste estudo também não encontramos associação positiva entre o genótipo nulo do gene *GSTT1* e o desenvolvimento de carcinomas bucais, apesar de o genótipo nulo ter sido mais freqüente dentre os pacientes (Tabela 4). Nossos dados corroboram os encontrados por MATTHIAS et al. (1998), OLSHAN et al. (2000), BUCH et al. (2002) e SUGIMURA et al. (2006) que também obtiveram ausência de associação entre este polimorfismo e o câncer de boca. Segundo este último autor, poucos trabalhos por ele revisados na literatura demonstraram risco aumentado entre o câncer bucal e o genótipo nulo de *GSTT1*, sendo que os seis trabalhos que obtiveram êxito em demonstrar associação relatam riscos relativamente baixos, com valores de ORs que variam de 1,4 a 2,6.

GAUDET et al. (2004) não associaram o genótipo *GSTT1* nulo com o desenvolvimento de CCECP de um modo geral, incluindo na amostra cânceres de boca, faringe e laringe. GAJECKA et al. (2005) também não encontraram associação entre *GSTT1* nulo quando estudaram pacientes portadores exclusivamente de tumores malignos de laringe. Já DEAKIN et al. (1996) apesar de não encontrarem associação a tumores de boca, pulmão e estômago, associaram o genótipo nulo de *GSTT1* ao desenvolvimento de câncer coloretal, ressaltando que o produto protéico codificado por esta variante pode ser importante na detoxificação de xenobióticos em porções específicas do intestino.

NACCARATI et al. (2006) encontraram associações entre danos genéticos do tipo quebras de fita simples no DNA e a presença de polimorfismos em genes que codificam para enzimas envolvidas no reparo e na metabolização de drogas. Segundo os autores, seus resultados mais consistentes foram obtidos a partir da combinação de genótipos, ressaltando a importância de estudos de interações genótípicas na suscetibilidade individual aos processos genotóxico e carcinogênico.

Os genótipos dos três genes candidatos foram combinados para novas análises. Foram considerados portadores de genótipos de risco aqueles pacientes hetero ou homozigotos para o alelo *CYP1A1*\*2A em combinação com o genótipo nulo para *GSTM1* e/ou *GSTT1*. O cálculo da OR mostrou ausência de associação positiva ou negativa para todas as combinações. Foram ainda considerados como portadores de genótipo de risco aqueles indivíduos que possuíam deleções dos genes *GSTM1* e *GSTT1* conjuntamente. O estudo de associação também indicou ausência de significância estatística (Tabela 4).

GATTÁS et al. (2006) afirmam que a associação de genótipos considerados de risco para *CYP1A1* e *GSTM1* nulo aumenta o risco para carcinomas de cabeça e pescoço (OR=2,4; IC95%=1,13-5,10). Outros trabalhos encontraram resultados semelhantes quando analisaram combinações de genótipos (OLSHAN et al., 2000; GAJECKA et al., 2005; MARQUES et al., 2006). HASHIBE et al. (2003) em uma análise que incluiu diversos trabalhos, encontraram associação elevada com câncer bucal quando múltiplos locos GSTs foram agrupados.

SATO et al. (2000) também relatam associação entre uma combinação dos genótipos *CYP1A1* (hetero ou homozigotos para *CYP1A1*\*2B) e *GSTM1* nulo em

tumores malignos bucais (OR=10,2; IC95%=2,70-38,52), principalmente em baixas doses de exposição ao tabaco. NAIR et al. (1999), demonstraram associação entre a combinação dos genótipos nulos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e o desenvolvimento de leucoplasias, consideradas lesões bucais pré-malignas, sugerindo que a presença destes genótipos influencia na evolução para um fenótipo maligno.

Neste trabalho, as combinações genotípicas também não se mostraram associadas ao desenvolvimento do câncer bucal (Tabela 4). Outras combinações, incluindo um maior número de genes, como os envolvidos no reparo do DNA, poderão mostrar associações positivas ou negativas.

Os genótipos estudados foram correlacionados a três parâmetros histopatológicos (tamanho do tumor, invasão de linfonodos regionais e grau de diferenciação tumoral) e um clínico (óbito). Os resultados das análises dos genes candidatos não mostraram significância estatística com relação aos parâmetros analisados exceto o resultado da análise do gene *GSTT1* que apresentou significância para grau de diferenciação do tumor (Tabela 6). O que observamos nos dados desta análise é que a significância se deveu ao baixo número de indivíduos com tumores grau III e com genótipo *GSTT1* nulo (n=4) em relação aos com *GSTT1* positivos (n=20), ou seja, o contrário da nossa hipótese, o que nos levaria a uma interpretação de que na presença do gene o paciente tivesse uma maior suscetibilidade a graus mais avançados da doença. Consideramos, portanto, que este resultado é devido principalmente a um efeito amostral e não a uma participação do genótipo em análise. Esta sugestão foi corroborada quando a análise foi realizada na amostra com tamanho mais consistente. Nesta situação, observamos que as distribuições se mostraram

homogeneamente distribuídas entre pacientes que possuíam ou não as variantes em questão, quando foi realizada uma análise conjunta com todos os genótipos considerados de risco comparados aos mesmos parâmetros (Tabelas de 5 a 9).

Os resultados contraditórios descritos na literatura, com associações positivas e negativas em relação ao câncer bucal, incluindo nossos dados, podem ser reflexo de vários fatores. Segundo HASHIBE et al. (2003) o processo de metabolização de xenobióticos é complexo, envolvendo muitos compostos e um grande número de enzimas. A família das Glutathionas, por exemplo, possui uma ampla variedade de substratos, de modo que a ação enzimática pode variar em diferentes localizações anatômicas. Estas variáveis podem refletir nos resultados controversos da literatura, desde que, conforme exposto na justificativa deste trabalho, a maioria dos autores utiliza amostras de CCECP de diferentes localizações anatômicas e histologia. Sendo assim, uma avaliação de múltiplos genes, além do papel da exposição ambiental, se faz necessária para uma melhor compreensão da relação entre genes envolvidos na metabolização de xenobióticos e o desenvolvimento de tumores malignos de cabeça e pescoço, como os de boca.

De um modo geral, os resultados contraditórios podem ocorrer devido aos fatores biológicos citados acima, à exposição a diferentes fatores ambientais e também a fatores metodológicos (erros do tipo I e II), que ocorrem em amostras de tamanhos reduzidos (DUNNING et al., 1999; LOCHMUELLER et al., 2003; PHAROAH et al., 2004). Com referência a este último fator, segundo PHAROAH et al. (2004), uma amostra de 1000 pacientes e 1000 controles, seria necessária para a detecção de um alelo de suscetibilidade com frequência de 0,20 e conferindo um risco

relativo de apenas 1,5. Sabe-se que a obtenção de uma amostra de tamanho ideal é praticamente inviável para um único grupo de pesquisa, especialmente quando ainda não se dispõe de um banco de DNA previamente constituído, como foi o caso deste trabalho. Apesar desta amostra (n=91) não apresentar o número sugerido, se constitui num grupo bastante homogêneo, por ser originada de um único sítio anatômico (boca) e de um tipo histológico exclusivo (o carcinoma de células escamosas), o que torna os resultados encontrados mais consistentes.

As diferenças de distribuição das freqüências dos genótipos em relação aos grupos étnicos são bem descritas na literatura (revisados em MACIEL, 2007), e não está claro até o momento, se dados de uma população podem ser extrapolados para outra. Este é um fator relevante, especialmente quando se estuda uma amostra retirada de uma população altamente miscigenada como a brasileira, pois o pareamento inadequado entre pacientes e grupo controle, pode originar associações falso-positivas ou falso-negativas (LIN et al., 1994; SHASTRY, 2006). Alguns autores descreveram associações positivas para determinados genótipos e câncer quando analisaram amostras compostas de indivíduos de um mesmo grupo étnico (TAIOLI et al., 1995, 1998). Como na nossa amostra, os afro-descendentes (n=11) e asiáticos (n=1) representavam, respectivamente, somente 12,1% e 1,1% dos indivíduos, não foi possível avaliar cada grupo separadamente.

Com base na amostra deste trabalho podemos concluir que as variantes alélicas dos genes candidatos de suscetibilidade *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* não influenciam o desenvolvimento de carcinomas bucais, quando os genes são analisados isoladamente ou em conjunto. Estes genes parecem também não influenciar no prognóstico destes

tumores, por não se mostrarem correlacionados a parâmetros histopatológicos e clínicos associados a estágios mais avançados da doença.

## 5.2 Marcadores microssatélites polimórficos em 3p

Diversos estudos têm considerado a região 3p como uma região genômica candidata a conter genes supressores tumorais relevantes em diversos tipos de câncer, incluindo os de cabeça e pescoço. Isto se deve às altas frequências de perdas de segmentos genômicos encontradas em análises de citogenética clássica, hibridação genômica comparativa (CGH), CGH-arrays (JIN et al., 2006; SPARANO et al., 2006) e os vários estudos sobre perda de heterozigose (LOH), revisados por PEREZ-ORDOÑEZ et al. (2006), que constataram a presença de LOH em 3p em 60 a 70% dos carcinomas escamosos de cabeça e pescoço.

Sub-regiões em 3p foram classificadas como “regiões mínimas de deleção” por concentrarem grande parte das perdas genômicas, tornando-se candidatas de serem portadoras de genes relevantes e alvo preferencial da pesquisa por genes ainda não mapeados ou cuja participação na carcinogênese ainda não é conhecida. O significado prognóstico destas sub-regiões ainda não é bem definido, com exceção de 3p14, associado com risco aumentado de progressão de lesões pré-malignas para malignas (ROSIN et al., 2000).

OHTA et al. (1996) definem três destas sub-regiões: 3p14, 3p21 e 3p25 onde estão localizados, respectivamente, os genes supressores *FHIT* (*fragile histidine triad gene*), *RASSF1A* (*Ras association domain family*) e *VHL* (*von Hippel-Lindau*). Além destes,



o gene *RARB* (*retinoic acid receptor beta*), localizado em 3p24 foi também caracterizado como candidato a supressor tumoral (YANG et al., 2002). GARNIS et al. (2003), utilizando arranjo cromossômico de alta resolução (CGH *array*) demonstraram múltiplos e recorrentes segmentos com alterações no número de cópias em 3p especialmente na região do gene *FHIT*, além de novos segmentos em 3p22, 3p24 e 3p26. Segundo PEREZ-ORDOÑEZ et al. (2006), existe muita controvérsia em relação aos genes presentes na região cromossômica 3p e suas possíveis funções na carcinogênese de cabeça e pescoço, de modo que novos estudos serão relevantes para um melhor delineamento da participação desta região na carcinogênese bucal.

Em muitos estudos que analisam LOH em tumores malignos de cabeça e pescoço, os diferentes sítios anatômicos não são distinguidos. Entretanto, sabe-se que o comportamento biológico varia entre os diferentes tipos tumorais (como boca, faringe e laringe), sugerindo propriedades intrínsecas distintas. Segundo REIS et al. (2002), isto se reflete no padrão de crescimento do tumor, comportamento clínico e prognóstico, de modo que os diferentes sítios anatômicos não devem ser considerados como entidade única. Por isto, no presente trabalho, foram analisadas amostras de pacientes portadores exclusivamente de carcinomas primários de células escamosas bucal, utilizando-se sete marcadores microssatélites em 3p (D3S1307, D3S1263, D3S1286, D3S1581, D3S1300, D3S1079 e D3S1274). Estes marcadores encontram-se mapeados em sub-regiões específicas (3p12.3, 3p13, 3p14.2, 3p21.31, 3p24.3, 3p25.3 e 3p26.3 - Tabela 3) que, como acima citado, são candidatas a conterem genes supressores tumorais.

YAMAMOTO et al. (2003) encontraram alta taxa de LOH em 3p21 (23,8%) em câncer bucal, porém inferior à observada neste estudo, que foi igual a 48,8% (marcador D3S1581- 3p21.31). Estes autores e ARAI et al. (2001), estes últimos avaliando exclusivamente câncer de língua, analisaram um marcador microssatélite (D3S1079 – 3p13), e encontraram uma frequência de LOH de 20% e 14,3%, respectivamente. No presente trabalho, este marcador mostrou uma alta taxa de LOH (48,6%), considerando-se todas as amostras. Outro marcador avaliado em nossa amostra, D3S1274, mapeado em 3p12.3, apresentou 55% de LOH, a mais alta frequência de perda observada na nossa amostra. DASGUPTA et al. (2002) avaliaram 57 amostras de CCECP sendo 38 destas de cavidade bucal e investigaram 15 marcadores microssatélites em 3p observando altas frequências de perda, 37-42% em 3p21 (D3S3719, D3S1289, D3S1611) e 34-38% em 3p12-13 (D3S3634, D3S1276, D3S1284).

KANNAN et al. (2001) não encontraram LOH em 3p numa amostra de pacientes indianos analisando o marcador microssatélite D3S1067, localizado em 3p21-3p14. Os autores sugerem que, divergências nas frequências de LOH obtidas em populações de regiões distintas, podem ser reflexo do estilo de vida, ressaltando que o tipo e o modo de ação dos carcinógenos pode variar de acordo com os hábitos, como consumo de fumo de mascar ou cigarro de palha, característicos de subgrupos étnicos específicos.

LERMAN e MINNA (2000) identificaram que a região 3p21 pode conter genes supressores relacionados ao desenvolvimento de cânceres de pulmão, incluindo o gene *RASSF1*, que codifica duas isoformas protéicas, denominadas *RASSF1A* e *RASSF1C*.

SHIVAKUMAR et al. (2002) afirmam que *RASSF1* encontra-se epigeneticamente inativado em vários tecidos sólidos humanos. A perda de expressão por metilação da região promotora e a inibição da formação de tumores em cultura pela recuperação de sua expressão, têm dado suporte à função de supressor tumoral para este gene. O mesmo parece atuar como regulador negativo da proliferação celular através da inibição da progressão da fase G1 para a fase S (SHIVAKUMAR et al., 2002) e também da mitose, pela inibição do complexo promotor da anáfase (APC) (SONG et al., 2004). Considerando que o gene *RASSF1* encontra-se mapeado em 3p21.3, e a alta taxa de LOH observada nesta sub-região no presente trabalho (48,8% - D3S1581-3p21.31), pode-se sugerir que a perda alélica é um dos mecanismos de inativação deste gene, e que o mesmo se encontra associado ao desenvolvimento de tumores malignos da cavidade bucal. Nossos dados corroboram os de HOGG et al. (2002), que afirmam que o gene *RASSF1* parece se comportar como um supressor tumoral clássico, uma vez que os autores observaram tanto perdas alélicas (em 3p21) quanto metilação da região promotora do mesmo quando avaliaram 48 amostras de tumores malignos primários de cabeça e pescoço.

YOO et al. (2004) analisaram LOH em diversas regiões genômicas em pacientes portadores de tumores malignos de laringe. Os autores encontraram uma elevada frequência de perda em 3p14 e relacionaram as LOHs à evolução do processo tumoral. A frequência de LOH descrita na nossa amostra (50%) é também considerada alta, porém, não foi possível no presente estudo relacionar a frequência de LOH à evolução dos carcinomas bucais, uma vez que foram analisados apenas tumores malignos. O marcador microssatélite D3S1300 analisado neste trabalho em 3p14.2, é

intragênico ao supressor tumoral *FHIT* e dados da literatura sugerem que este gene pode ser inativado por deleção somática em muitos tipos de cânceres, incluindo os de cabeça e pescoço (MAO et al., 1996b).

O gene *FHIT* foi identificado em 3p14.2 por OHTA et al. (1996), e foi denominado “*fragile histidine triad*”. Estes autores estudando o sítio frágil *FRA3B*, uma região de 200 a 300 Kb, comumente deletada em homozigose em diversos tipos de câncer, identificaram o gene *FHIT*, composto por 10 éxons distribuídos em pelo menos 550 Kb, sendo que o éxon 5 está dentro da região *FRA3B*. Transcritos alterados de *FHIT* foram identificados em aproximadamente 50% das linhagens celulares de cânceres de esôfago, estômago e cólon (OHTA et al., 1996).

SOZZI et al. (1996) observaram LOH em marcadores microssatélites próximos e internos ao gene *FHIT* e sugeriram que sua inativação ocorre através de perda somática de um alelo e alteração da expressão do alelo remanescente. Posteriormente, estes autores concluíram que a perda da função deste gene leva a um estímulo da síntese do DNA e da proliferação celular, confirmando sua função supressora tumoral. Afirmaram ainda que quebras no sítio frágil nele contido podem ser decorrentes de exposição a agentes ambientais. Isto foi subsequente confirmado por STEIN et al. (2002) que demonstraram que a exposição ativa ao tabaco aumenta a expressão de sítios frágeis cromossômicos. Este fato pode indicar um papel relevante para este gene no desenvolvimento de cânceres ligados à exposição ao cigarro, como os bucais.

BARNES et al. (1996) descreveram que a proteína FHIT é uma hidrolase de 147 aminoácidos cujos substratos preferenciais, AP3A (*diadenosine 5-prime,5-triple*

*prime-P(1),P(3)-triphosphate*), e AP4A possuem várias funções intracelulares, incluindo a regulação na replicação do DNA e sinalização da resposta ao estresse. Os resíduos conservados de histidina são necessários para a atividade enzimática.

VIRGILIO et al. (1996) e MORIKAWA et al. (2000) concluíram, em experimentos independentes, que a perda da função do gene *FHIT* pode ser importante no desenvolvimento e na progressão de tumores malignos de cabeça e pescoço e de intestino, confirmando sua atuação como um gene supressor tumoral.

Segundo LEE et al. (2001), a função exata do gene *FHIT* como supressor ainda permanece indefinida, uma vez que não se conhece como este gene media a indução à apoptose e altera a proliferação celular. A alta taxa de LOH observada na nossa amostra (50%) para o marcador microssatélite intragênico de *FHIT* (D3S1300 – 3p14.2) reforça a hipótese de que a inativação deste gene por perda somática seja um dos passos envolvidos no desenvolvimento de tumores malignos de boca. Nossos dados corroboram os de MAO et al. (1996b) que observaram LOH na região cromossômica de *FHIT* e também que sua expressão encontra-se freqüentemente alterada em tumores malignos de cabeça e pescoço. Ainda, van HEERDEN et al. (1999) e LEE et al. (2001), demonstraram perda da expressão de *FHIT* em neoplasias bucais e especificamente de língua, respectivamente, por análise de imunohistoquímica. LEE et al. (2001) afirmam que *FHIT* deve ser considerado um marcador independente na determinação do prognóstico e da terapêutica destes tumores, ao observarem uma correlação entre perda de sua expressão e diminuição do tempo livre da doença.

ARAI et al. (2001) sugerem a existência de genes supressores tumorais localizados em 3p25 envolvidos na tumorigênese de língua. Os autores encontraram freqüências de LOHs inferiores às descritas neste trabalho (37,2%), com valores que variaram de zero a 21,4%, para os diferentes marcadores estudados. Em trabalhos mais recentes ARAI et al. (2002) e YAMAMOTO et al. (2003) encontraram uma taxa de LOH em 3p25 de 32,4%, quando analisaram o marcador D3S1007. NG et al. (2000) não observaram LOH significativa em 3p24-25 em cânceres de cabeça e pescoço de pacientes chineses, sendo que a taxa de perda foi ainda mais baixa para as neoplasias bucais (11,8%), quando comparadas àquelas de hipofaringe e laringe (53,8%). Assim, nossos resultados estão de acordo com os de ARAI et al. (2001 e 2002) e YAMAMOTO et al. (2003), por também serem sugestivos da existência de genes envolvidos com a tumorigênese bucal localizados em 3p25.

Em 3p24 está mapeado o gene supressor tumoral *RARB*, pertencente à família dos receptores nucleares do ácido retinóico, juntamente com os receptores alfa (*RARA*) e gama (*RARG*). Estudos realizados por de THE et al. (1987) sugeriram que o produto deste gene poderia ser uma proteína reguladora que quando inadequadamente expressa, estaria correlacionada ao desenvolvimento de hepatocarcinomas. LOTAN et al. (1995) observaram que a expressão do gene *RARB* é seletivamente perdida em lesões orais pré-malignas, mas que pode ser recuperada com tratamento e que isto pode possuir uma relevância clínica. Baseando-se na alta taxa de LOH (55,2%) observada em 3p24.3, neste trabalho, pela análise do marcador D3S1286, podemos sugerir que o gene *RARB* pode ser considerado como um candidato a supressor tumoral envolvido no desenvolvimento de tumores bucais malignos.

KAYAHARA et al. (2001) afirmam que os resultados por eles encontrados sugerem a existência de um gene supressor tumoral entre 3p25-26 com uma função relevante na carcinogênese e no potencial invasivo de tumores malignos da cavidade bucal. Os dados obtidos nesta amostra corroboram os destes autores, uma vez que também observamos alta frequência de perda em 3p25 (37,1%), e também em 3p26.3 (48,8%), pela análise do marcador D3S1307. Assim, também admitimos que a região localizada entre 3p25-26 possa conter gene(s) relacionado(s) ao câncer bucal. O gene *VHL* é um supressor tumoral responsável pela síndrome de von Hippel-Lindau, uma doença hereditária de predisposição a uma variedade de tumores malignos e benignos. Uma mutação germinativa neste gene é a base para o desenvolvimento desta síndrome. A proteína codificada pelo gene *VHL* faz parte de um complexo protéico envolvido na ubiquitinação e degradação de um fator de transcrição que possui um papel relevante na regulação da expressão gênica pelo oxigênio. Mutações neste gene juntamente com LOH na região que o contém são também encontradas em 70-80% dos tumores renais esporádicos e em outros cânceres como hemangioblastomas (BARRY e KREK, 2004). YEH et al. (2003) observaram alterações do padrão de metilação do gene *VHL* quando analisaram 48 amostras de carcinomas escamosos bucais e sugeriram que este gene pode possuir um papel relevante durante o desenvolvimento deste tipo de tumor. Desta forma, nossos dados corroboram os destes autores e permitem sugerir, em função da alta taxa de LOH observada na região onde o gene *VHL* encontra-se mapeado, que este pode ser mais um candidato a ter uma função relevante na carcinogênese bucal.

UZAWA et al. (1998) sugerem que a região 3p possa conter genes supressores tumorais envolvidos no desenvolvimento de carcinomas bucais, ressaltando que os

genes candidatos *FHIT*, *VHL* e *RARB* podem ter um papel significativo neste processo. PARTRIDGE et al. (1999), por sua vez, não observaram alterações nas seqüências onde se encontram mapeados os genes candidatos *VHL* e *FHIT*, pela análise de marcadores microssatélites e RFLPs em 48 amostras de tumores bucais primários. Esta discordância determina cautela quando se analisa os resultados obtidos em estudos de LOH. Entretanto, no presente trabalho, em vista da alta freqüência de perda observada nas sub-regiões onde se encontram mapeados os genes *RASSF1*, *FHIT* e *VHL*, podemos pressupor uma função para estes supressores tumorais na etiologia da carcinogênese bucal.

WU et al. (1994), PARTRIDGE et al. (1996) e KAYAHARA et al. (2001) observaram, respectivamente, que 52%, 71% e 72% dos pacientes analisados, apresentavam LOH em dois ou mais dos microssatélites analisados em 3p. Na análise do presente trabalho, encontrou-se a seguinte distribuição: 57 pacientes (79,1%) apresentaram LOH em pelo menos um dos 7 locos analisados; 35 pacientes (48,6%) em pelo menos dois; 26 pacientes (36,1%) em pelo menos três e 17 pacientes (23,6%) em quatro ou mais dos locos analisados. Assim, nossos dados estão de acordo com os descritos por outros autores já citados, e em conjunto, indicam a importância da região cromossômica 3p nos tumores malignos da cavidade bucal.

Com o objetivo de verificar a existência de uma região mínima de deleção, foi analisada a ocorrência de LOH simultânea entre os marcadores microssatélites mais próximos segundo a posição do mapa físico (Tabela 3 e Figura 3). Quando se avaliou de forma conjunta os microssatélites D3S1263 (p25.3-p25.2) e D3S1286 (p24.3), foi obtida uma freqüência simultânea de LOH igual a 78,8%, delimitando uma região de



4,3 Mb. Outra região mínima de deleção foi obtida pela análise conjunta dos marcadores microssatélites D3S1300 (p14.2) e D3S1079 (p13), onde se obteve LOH em 74,2%, delimitando uma região de 10 Mb. Foram ainda avaliados simultaneamente os marcadores D3S1307/D3S1263/D3S1286 e D3S1300/D3S1079/D3S1274, sendo obtidas frequências de LOH iguais a 62,2% e 64,1%, respectivamente. Em conjunto, estes dados reforçam a importância dos genes *VHL* e *FHIT* nos tumores malignos bucais. A delimitação destas regiões também sugere que novos genes localizados entre 3p12.3 e 3p14.2 e entre 3p24.3 e 3p26.3 possam exercer uma função relevante na carcinogênese bucal e, portanto, de importância para estudos futuros.

Quando as frequências de LOH foram avaliadas em relação aos diferentes sítios anatômicos dos carcinomas, observou-se uma elevada taxa de perda principalmente nos tumores de língua (78,3%), assoalho (87,5%) e trígono retromolar (100%). A estratificação da amostra em diferentes localizações anatômicas juntamente com a ausência de amplificação de alguns DNAs tumorais levou a uma redução do tamanho da amostra, dificultando uma estreita correlação entre a presença de LOH em 3p e o desenvolvimento de sub-tipos específicos de tumores malignos de boca. Entretanto, nossos dados podem ser considerados sugestivos de que perdas somáticas nesta região poderiam estar mais efetivamente relacionadas a determinados subgrupos tumorais, especialmente de língua, assoalho e trígono.

Os resultados da análise dos parâmetros histopatológicos (tamanho do tumor, invasão de linfonodos regionais e grau de diferenciação tumoral) e clínico (ocorrência ou não de óbito) dos pacientes em função dos marcadores microssatélites encontram-se nas Tabelas de 11 a 15. A análise da variância para a comparação entre as médias

dos tamanhos dos tumores dos pacientes com e sem LOH para os sete marcadores microssatélites não demonstrou diferenças estatisticamente significativas (Tabela 12). O número de pacientes com e sem LOH com grau II e III de diferenciação tumoral e que foram a óbito se apresentou homogeneamente distribuído de acordo com o teste do Qui-Quadrado, tanto quando cada marcador foi analisado isoladamente, como quando os resultados foram considerados em conjunto. Não foi possível uma comparação entre tumores de grau I (bem diferenciados) e grau III (pouco diferenciados), devido ao pequeno tamanho amostral dos primeiros (n=4). Comparando nossos dados com outros da literatura, observamos que ARAI et al. (2001) não detectaram diferenças entre a frequência de LOH e parâmetros clínicos e histopatológicos de pacientes portadores de cânceres de língua, como metástase em linfonodo regional e padrão de diferenciação tumoral, numa amostra de 16 indivíduos. Já PARTRIDGE et al. (1996) analisando 48 pacientes portadores de carcinomas escamosos primários e marcadores localizados nas mesmas regiões estudadas neste trabalho, encontraram uma associação significativa entre LOH, sobrevida e tempo livre da doença nos pacientes em estágio inicial da doença. Os resultados obtidos neste trabalho com relação ao tamanho do tumor, grau de diferenciação tumoral e ocorrência de óbito também são sugestivos de que a inativação de genes supressores de tumor em 3p seja um evento inicial na carcinogênese de boca.

Entretanto, a mesma análise para o parâmetro invasão de linfonodos regionais se mostrou estatisticamente significativa para dois (D3S1263 e D3S1307:  $\chi^2_1=8,94$ ;  $P<0,01$  e  $\chi^2_1= 5,64$ ;  $P<0,05$ , respectivamente) dos sete marcadores analisados (Tabela 15). A análise conjunta dos resultados obtidos para este mesmo parâmetro, apresentou

um valor de Qui-Quadrado altamente significativo ( $\chi^2_1 = 14,6$ ;  $P < 0,001$ ), indicando que o número de pacientes com e sem LOH e com e sem invasão de linfonodos regionais não se distribuem igualmente. Isto pode indicar que a inativação de genes localizados principalmente entre 3p25.3 e 3p26.3, pode ser um evento mais tardio no processo de tumorigênese e que estes genes podem estar relacionados a um pior prognóstico. Estes achados devem ser confirmados para um melhor esclarecimento da importância deste candidato a supressor tumoral na carcinogênese de boca, especialmente devido ao pequeno tamanho da amostra disponível para esta análise.

Como já citado, para que fossem realizadas as análises entre os parâmetros histopatológicos e clínico dos pacientes houve uma redução do tamanho da amostra devido à falta de algumas informações, e, assim, tanto a ausência de significância estatística para três dos parâmetros analisados, quanto à presença de significância para invasão de linfonodos regionais, podem ter sido influenciadas pela diminuição de poder estatístico, o que determina cautela na avaliação dos resultados apresentados, mas, sem dúvida, os mesmos devem ser reavaliados em amostras mais consistentes pela relevância que podem representar. É importante salientar que, em outro trabalho realizado com a mesma amostra (PROPST, 2007), pesquisando LOH em 9p, o mesmo parâmetro foi também o único a apresentar diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2_1 = 4,121$ ;  $P < 0,05$ ), o que reforça a necessidade deste parâmetro ser analisado mais consistentemente.

Com base em nossos resultados sugerimos que a região cromossômica 3p está envolvida com o desenvolvimento de tumores malignos da cavidade bucal e que todas as sub-regiões estudadas, por terem apresentado frequências elevadas de LOH quando

comparadas a outros estudos descritos na literatura, podem conter genes supressores tumorais ainda desconhecidos, envolvidos na etiologia e na progressão desta neoplasia. Além disso, em função da alta taxa de LOH, próxima ou superior a 50%, nas sub-regiões 3p14, 3p21, 3p24 e 3p25, sugerimos que os genes *FHIT*, *RASSF1*, *RARB* e *VHL* são candidatos a supressores tumorais relacionados aos carcinomas bucais.

## 6. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

### 1. Com relação aos genes envolvidos na metabolização de xenobióticos:

- as variantes alélicas dos genes candidatos de suscetibilidade *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* isoladamente não influenciaram o desenvolvimento dos carcinomas bucais;

- as combinações genotípicas também não se mostraram associadas ao desenvolvimento dos carcinomas bucais, quando foram consideradas combinações de genes de fase I e de fase II (*CYP1A1* e *GSTM1*e/ou *GSTT1*) e apenas de fase II (*GSTM1* e *GSTT1*);

- não há indicações de que estas variantes alélicas influenciem o prognóstico desta neoplasia, por não se mostrarem relacionadas a parâmetros de estágios mais avançados do processo tumoral como: tamanho do tumor, invasão de linfonodos regionais, diferenciação tumoral e ocorrência ou não de óbito nos pacientes.

### 2. Com relação aos marcadores microssatélites mapeados em 3p:

- nossos resultados sugerem que a região cromossômica 3p está envolvida com o desenvolvimento de carcinomas da cavidade bucal;

- todas as sub-regiões estudadas, por terem apresentado frequências elevadas de LOH, podem conter genes supressores de tumor ainda desconhecidos envolvidos na etiologia desta neoplasia;

- em função das frequências de LOH próximas ou superiores a 50%, nas sub-regiões 3p14, 3p21, 3p24 e 3p25, sugerimos que os genes *FHIT*, *RASSF1*, *RARB* e *VHL* mapeados nestas regiões, são candidatos a supressores tumorais relacionados ao desenvolvimento de tumores malignos da cavidade bucal;

- as análises entre os parâmetros clínico-histopatológicos dos pacientes e os marcadores microssatélites, sugerem que as regiões 3p25 e 3p26 contenham genes envolvidos na progressão da doença, porém estes dados necessitam de corroboração em análises com amostras de tamanho mais consistente.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, S.Z.; EL-ZEIN, R.A.; ANWAR, W.A.; AU, W.W. A multiplex PCR procedures for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. **Cancer Letters**, 107: 229-233, 1996.

ANDO, Y.; IWASE H, ICHIHARA S, TOYOSHIMA S, NAKAMURA T, YAMASHITA H, TOYAMA T, OMOTO Y, KARAMATSU S, MITSUYAMA S, FUJII Y, KOBAYASHI S. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. **Cancer Letters**,156:207-14, 2000.

ANDREOTTI, M.; RODRIGUES, A.N.; CARDOSO, L.M.N.; FIGUEIREDO, R.A.O.; ELUF-NETO, J.; WÜNSCH-FILHO, V. Ocupação e câncer da cavidade oral e orofaringe. **Cadernos de Saúde Pública**, 22: 543-552, 2006.

ANTTILLA, S.; HIETANEN, E.; VAINIO, H.; CAMUS, A-M.; GELBOIN, H.V.; PARK, S.S.; HEIKKILÄ, L.; KARJALAINEN, A.; BARTSCH, H. Smoking and peripheral type of cancer are related to high levels of pulmonary cytochrome P450 in lung cancer patients. **International Journal of Cancer**, 47: 681-685, 1991.

ARAI, K.; SHIBAHARA, T.; YAMAMOTO, N.; YAKUSHIJI, T.; TANAKA, C.; NOMA, H. Frequent allelic loss/imbalance on the short arm of chromossome 3 in tongue cancer. **Bulletin of Tokyo Dental College**, 42:151-157, 2001.

ARAI, K.; SHIBAHARA, T.; YAMAMOTO, N.; NOMA, H. The presence of candidate tumor suppressor gene loci at chromosome 3p for oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**, 38:763-771, 2002.

ARRUDA, V.R.; GRIGNOLI, C.E.; GONÇALVES, M.C.; SOARES, M.C.; MENEZES, R.; SAAD, S.T.; COSTA, F.F. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? **Clinical Genetics**, 54:210-214, 1998.

AU, W.W.; OH, H.Y.; GRADY, J.; SALAMA, S.A.; HEO, M.Y. Usefulness of genetic susceptibility and biomarkers for evaluation of environmental health risk. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 37:215-225, 2001.

AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. **Mutation Research**, 464:65-76, 2000.

BALDWIN, C.; GARNIS, C.; ZHANG, L.; ROSIN, M.; LAM, W.L. Multiple microalterations detected at high frequency in oral cancer. **Cancer Research**, 65:7561-7567, 2005.

BARNES, L.D.; GARRISON, P.N.; SIPRASHVILI, Z.; GURANOWSKI, A.; ROBINSON, A.K.; INGRAN, S.W.; CROCE, C.M.; OHTA, M.; HUEBNER, K. FHIT, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5'''-P1, P3-triphosphate hydrolase. **Biochemistry**, 35: 11529-11535, 1996.

BARRY, R.E.; KREK, W. The von Hippel-Lindau tumour suppressor: a multi-faceted inhibitor of tumourigenesis. **Trends in Molecular Medicine**, 10: 466-472, 2004.

BARTSCH, H. Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. **Mutation Research**, 462:255-279, 2000.

BEDER, L.B. GUNDUZ, M. OUCHIDA, M.; FUKUSHIMA, K.; GUNDUZ, E.; ITO, S.; SAKAI, A.; NAGAI, N.; NISHIZAKI, K.; SHIMIZU, K. Genome-wide analysis on loss of heterozygosity in head and neck squamous cell carcinomas. **Laboratory Investigation**, 83:99-105, 2003.

BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1988.

BIAZEVIC, M.G.H.; CASTELLANOS, R.A.; ANTUNES, J.L.F.; MICHEL-CROSATO, E. Tendências de mortalidade por câncer de boca e orofaringe no Município de São Paulo, Brasil, 1980/2002. **Cadernos de Saúde Pública**, 22: 2105-2114, 2006.



BOYLE, P.; MACFARLANE, G.J.; ZHENG, T.; MAISONNEUVE, P.; EVSTIFEEVA, T.; SCULLY, C. Recent advances in epidemiology of head and neck cancer. **Current Opinion in Oncology**, 4: 471-477, 1992.

BUCH, C.S.; NOTANI, P.N.; BHISEY, R.A. Polymorphism at GSTM1, GSTM3 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer in an Indian population. **Carcinogenesis**, 23:803-807, 2002.

BUETLER, T.M.; EATON, D.L. Glutathione S-transferase: amino acid sequence comparison, classification and phylogenetic relationship. **Environmental Carcinogenesis Ecotoxicology**, 10:181-203, 1992.

CALIFANO, J.; VAN DER RIET, P.; WESTRA, W.; NAWROZ, H.; CLAYMAN, G.; PIANTADOSI, S.; CORIO, R.; LEE, D.; GREENBERG, B.; KOCH, W.; SIDRANSKY, D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer Research**, 56: 2488-2492, 1996.

CANEVARI, R.A.; ROGATTO, S.R. Câncer de Cabeça e Pescoço. IN: Casali, J.C.; Ferreira, C.G. (Org.). **Oncologia Molecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

CARRANO, A.V.; NATARAJAN, A.T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research**, 204:381, 1988.

CARSTENSEN, U.; ALEXANDRIE, A. K.; HÖGSTEDT, B.; RANNUG, A. BRATT, I.; HAGMAR, L. B- and T- lymphocyte micronuclei in chimney sweeps with respect to genetic polymorphism for CYP1A1 and GSTT1 (class Mu). **Mutation Research**, 289:187-195, 1993.

CARVALHO, A.L.; SINGH, B.; SPIRO, R.H.; KOWALSKI, L.P.; SHAH, J.P. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nations. **Head & Neck**, 26:31-38, 2004.

CASCORBI, I. Genetic basis of toxic reactions to drugs and chemicals. **Toxicology Letters**, 162: 16-28, 2006.

CASTELLSAGUE, X.; MONOZ, N.; DE STEFANI, E.; VICTORIA, C.G.; CASTELLETTO, R.; ROLON, P.A. Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. **International Journal of Cancer**, 88: 658-664, 2000.

CAVENEY, W.K.; WHITE, R.L. The genetic basis of cancer. An accumulation of genetic defects can apparently cause normal cells to become cancerous and cancerous cells to become increasingly dangerous. **Scientific American**, 272: 72-9, 1995.

CHANG, F.; SYRJANEN, S.; SYRJANEN, K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. **Journal of Clinical Oncology**, 13:1009-1022, 1995.

CLAIJ, N.; RIELE, H. Microsatellite instability in human cancer: a prognostic marker for chemotherapy? **Experimental Cell Research**, 246:1-10, 1999.

CLARK, A. Oral cancer prevention and early detection. **Nursing Standard**, 13:43-47, 1999.

CONFORTI, N.D.T. Suscetibilidade Genética ao Câncer. In: Ferreira, C.G.; Rocha, J.C. (org.) **Oncologia Molecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 295-305, 2004.

COOPER, G. M. **Elements of human cancer**. 1.ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1994.

DAMM, N.; BOUQUOT, A. **Patologia Oral e Maxilofacial**. In: Patologia Epitelial., 287-296, 1998.

DASGUPTA, S.; MUKHERJEE, N.; ROY, S.; SENGUPTA, A.; ROYCHOWDHURY, S.; PANDA, C.K. Mapping of the candidate tumor suppressor genes loci on human chromosome 3 in head and neck squamous cell carcinoma of an Indian patient population. **Oral Oncology**, 38:6-15, 2002.

de THE, H.; MARCHIO, A.; TIOLLAIS, P.; DEJEAN, A. A novel steroid thyroid hormone receptor-related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma. **Nature**, 330: 667-670, 1987.

DEAKIN, M.; ELDER, J.; HENDRICKSE, C.; PECKHAM, D.; BALDWIN, D.; PANTIN, C.; WILD, N.; LEOPARD, P.; BELL, D.A.; JONES, P.; DUNCAN, H.; BRANNIGAN, K.; ALLDERSEA, J.; FRYERS, A.; CSTRANGE, R. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. **Carcinogenesis**, 17: 881-884, 1996.

DRUMMOND, S.N.; MARCO, L.; NORONHA, J.C.N.; GOMEZ, R.S. GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, 40: 52-55, 2004.

DUNNING, A.M.; HEALEY, C.S.; PHAROAH, P.D.P.; TEARE, M.D.; PONDER, B.A.J.; EASTON, D.F. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 8:843-854, 1999.

ESHLEMAN, J.R.; LANG, E.Z.; BOWERFIND, G.K.; PARSONS, R.; VOGELSTEIN, B.; WILLSON, J.K.; VEIGL, M.L.; SEDWICK, W.D.; MARKOWITZ, S.D. Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. **Oncogene**, 10 :33-7, 1995.

EL-NAGGAR, A.K.; MAO, L.; STAERKEL, G.; COOMBES, M.M.; TUCKER, S.L.; LUNA, M.A.; CLAYMAN, G.L.; LIPPMAN, S.; GOEPFERT, H. Genetic heterogeneity in saliva from patients with oral squamous carcinomas: implications in molecular diagnosis and screening. **Journal of Molecular Diagnostics**, 3:164-70, 2001.

FEARON, E.R. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. **Science**, 278:1043-1050, 1997.

FONTANA, W.; PEYROTTE, I.; ROSSI, C.; LEBLANC-TALENT, P.; ETTORE, F.; NAMER; BUSSIÈRE, F. Study of sequence of CYP1A1 gene polymorphisms and

glutathione S-transferase mu 1 gene in primary breast cancers: an update with an additional 114 cases. **Mutation Research**, 403:45-53, 1998.

FRANCO, E.L.; KOWALSKI, L.P.; OLIVEIRA, B.V.; CURADO, M.P.; PEREIRA, R.N.; SILVA, M.E.; FAVA, A.S.; TORLONI, H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case control study. **International Journal of Cancer**, 43: 992-1000, 1989.

GAJECKA, M.; RYDZANICZ, M.; JASKULA-SZTUL, R.; KUJAWSKI, M.; SZYFTER, W.; SZYFTER, K. CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, NAT2, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms or their combinations are associated with the increased risk of the laryngeal squamous cell carcinoma. **Mutation Research**, 574:112-123, 2005.

GARNIS, C.; BALDWIN, C.; ZHANG, L.; ROSIN, M.P.; LAM, W.L. Use of complete coverage array comparative genomic hybridization to define copy number alterations on chromosome 3p in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Research**, 63: 8582-8585, 2003.

GASPAR, P.; MOREIRA, J.; KVITKO, K.; TORRER, M.; MOREIRA, A.; WIEMER, T. *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, and *TP53* polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? **Genetics and Molecular Biology**, 27: 133-138, 2004.

GATTÁS, G.J.F. Associação de genes polimórficos de metabolização de xenobióticos e câncer de boca e de laringe. **Mutagênese**, (Suppl.) p.47, 2001.

GATTÁS, G.J.F.; WÜNSCH, V.F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, 17: 467- 480, 2001.

GATTAS, G.J.; de CARVALHO, M.B.; SIRAUQUE, M.S.; CURIONI, O.A.; KOHLER, P.; ELUF-NETO, J.; WUNSCH-FILHO, V. Genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 associated with head and neck cancer. **Head & Neck**, 28:819-826, 2006.

GAUDET, M.M.; OLSHAN, A.F.; POOLE, C.; WEISSLER, M.C.; WATSON, M.; BELL, D.A. Diet, GSTM1 and GSTT1 and head and neck cancer. **Carcinogenesis**, 25: 735-740, 2004.

GEISLER, S.A.; OLSHAN, A.F. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **American Journal of Epidemiology**, 154:95-105, 2001.

GOTO, I.; YONEDA, S.; YAMAMOYO, M.; KAWAJIRI, K. Prognostic significance of germ line polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes in patients with non-small cell lung cancer. **Cancer Research**, 56:3725-3730, 1996.

GRONAU, S.; KOENIG-GREGER, D.; JERG, M.; RIECHELMANN, H. GSTM1 enzyme concentration and enzyme activity in correlation to the genotype of detoxification enzymes in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Oral Disease**, 9:62-67, 2003.

GRUPTA, P.C.; MURTI, P.R.; BHOSLE, R.B.; MEHTA, F.S.; PINDBORG, J.J. Effect of cessation of tobacco use on the incidence of oral mucosal lesions in a 10yr follow-up study of 12,212 users. **Oral Disease**, 1:54-58, 1995.

GUO, Z.; YAMAGUCHI, K.; SANCHEZ-CESPEDES, M.; WESTRA, W.H.; KOCH, W.M.; SIDRANSKY, D. Allelic losses in oral test-directed biopsies of patients with prior upper aerodigestive tract malignancy. **Clinical Cancer Research**, 7:1963-1968, 2001.

HAHN, M.; HAGEDORN, G.; KUHLISCH, E.; SCHACKERT, H.K.; ECKELT, U. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity cancer. **Oral Oncology**, 38:486-490, 2002.

HAMADA, G.S.; BOS, A.J.; KASUGA, H.; HIRAYAMA, T. Comparative epidemiology of oral cancer in Brazil and India. **Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, 16:63-72, 1991.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100: 57-100, 2000.

HASHIBE, M.; BRENNAN P.; STRANGE, R.C.; BHISEY, R.; CASCORBI, I.; LAZARUS, P.; OPHUIS, M.B.O.; BENHAMOU, S.; FOULKES, W.D.; KATOH, T.; COUTELLE, C.; ROMKES, M.; GASPARI, L.; TAIOLI, E.; BOFFETTA, P. Meta- and pooled analyses of *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, and *CYP1A1* genotypes and risk of head and neck cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 12: 1509-1517, 2003.

HATAGIMA, A. Polimorfismos genéticos e metabolismo dos desreguladores endócrinos na suscetibilidade ao câncer. **Cadernos de Saúde Pública**, 18: 357-377, 2002.

HAYASHI, S.I.; WATANABE, J.; NAKACHI, K.; KAWAJIRI, K. PCR detection of an A/G polymorphism within exon 7 of the CYP1A1 gene. **Nucleic Acids Research**, 19:4797, 1991.

HAYASHI, S-I.; WATANABE, J.; NAKACHI, K.; KAWAJIRI, K. Genetic linkage of lung cancer associated *MspI* polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the cytochrome P4501A1 gene. **Journal of Biochemistry**, 110:407-411, 1991.

HAYES, J.D.; PULFORD, D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 30: 445-600, 1995.

HAWAJIRI, K.; NAKACHI, K.; IMAI, K.; WATANABE, J.; HAYASHI, S. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 14:77-87, 1993.

HIRVONEN, A.; HUSGAFVEL-PURSIANEN, K.; KARJALAINEN, A.; ANTTILLA, S.; VAINIO, H. Point mutation *MspI* and Ile-Val polymorphisms closely linked in the CYP1A1 gene: lack of association with susceptibility to lung cancer in a Finnish study population. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 2:485-489, 1992.

HOEIJMAKERS, H.J.J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, 411: 366-374, 2001.

HOGG, R.P.; HONORIO, S.; MARTINEZ, A.; AGATHANGGELOU, A.; DALLOU, A.; FULLWOOD, P.; WEICHSELBAUM, R.; KUO, M.J.; MAHER, E.R.; LATIF, F. Frequent 3p allele loss and epigenetic inactivation of the RASSF1A tumor suppressor gene from region 3p21.3 in head and neck squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer**, 38: 1561-1563, 2002.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro (disponível em <http://www.inca.gov.br>).

INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. **Mutation Research**, 482:11-19, 2001.

IRISH, J.C.; BERNSTEIN, A. Oncogenes in head and neck cancer. **Laryngoscope**, 103:42-52, 1993.

JEFFRIES, S.; FOULKES, W.D. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncology**, 37:115-126, 2001.

JHAVAR, S.; SARIN, R.; MULHERKAR, R.; BENNER, A.; AGARWAL, J.P.; DINSHAW, K. Glutathione S-transferase M1 or T1 null genotype as a risk factor for developing multiple primary neoplasms in the upper aero-digestive tract, in Indian males using tobacco. **Oral Oncology**, 40:84-91, 2004.

JIN, C.; JIN, Y.; WENNERBERG, J.; ANNERTZ, K.; ENOKSSON, J.; MERTENS, F. Cytogenetic abnormalities in 106 oral squamous cell carcinomas. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, 164: 44-53, 2006.

JOHNSON, N.W., ed. **Oral cancer: detections of patients and lesions at risk**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

JOHNSON, N.W.; WARNAKULASURIYA, X.A. Epidemiology and etiology of oral cancer in the United Kingdom. **Community Dental Health**, 10:1330, 1993.

JOURENKOVA-MIRANOVA, N.; VOHO, A.; BOUCHARDY, C. Glutathione S-transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 genotypes and the risk of smoking-related oral and pharyngeal cancers. **International Journal of Cancer**, 1999.

KADLUBAR, F.F. Concluding remarks: symposium on Genetic Susceptibility to Environmental Toxicants. **Mutation Research**, 482:111-113, 2001.

KANNAN, S.; YOKOZAKI, H.; JAYASREE, K.; SEBASTIAN, P.; MATHEWS, A.; ABRAHAM, E.K.; NAIR, M.K.; TAHARA, E. Infrequent loss of heterozygosity of the major tumour suppressor genes in Indian oral cancers. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, 30: 414-418, 2001.

KAYAHARA, H.; YAMAGATA, H.; TANIOKA, H.; MIKI, T.; HAMAKAWA, H. Frequent loss of heterozygosity at 3p25-p26 is associated with invasive oral squamous cell carcinoma. **Journal of Human Genetics**, 46: 335-341, 2001.

KEMP, C.J. Comparative hepatocellular cancer genetics. **American Journal of Pathology**, 159: 975-977, 1999.

KIHARA, M.; KIHARA, M.; KASUMAZA, N. Risk of smoking for squamous and small cell carcinomas of the lung modulated by combinations of *CYP1A1* and *GSTM1* gene polymorphisms in a Japanese population. **Carcinogenesis**, 16: 2331-2336, 1995.

KNUDSON, A.G. Hereditary cancer, oncogenes and anti-oncogenes. **Cancer Research**, 45:1437-1443, 1985.

KOCH, W.J.; HAWES, B.E.; ALLEN, L.F.; LEFKOWITZ, R.J. Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 91: 12706-10, 1994.



KOWALSKI, L.P. Carcinoma de boca: epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Acta AWHO**, 10: 128-134, 1991.

LAZARUS, P.; SHEIKH, S.N.; REN, Q.; SCHANTZ, S.P.; STERN, J.C.; RICHIE, J.P.; JR; PARK, J.Y. P53, but not P16 mutations in oral squamous cell carcinomas are associated with specific CYP1A1 and GSTM1 polymorphic genotypes and patient tobacco use. **Carcinogenesis**, 19: 509-514, 1998.

LAZARUS, P.; PARK, J.Y. Metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer. **Oral Oncology**, 36: 421-431, 2000.

LEE, S.H.; KIM, W.H.; KIM, H.K.; WOO, K.M.; NAM, H.S.; KIM, H.S.; KIM, J.G.; CHO, M.H. Altered expression of the fragile histidine triad gene in primary gastric adenocarcinomas. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 284: 850-855, 2001.

LEE, J.I.; SORIA, J.; HASSAN, K.; LIU, D.; TANG, X.; EL-NAGGAR, A.; HONG, W.K.; MAO, L. Loss of Fhit expression is a predictor of poor outcome in tongue cancer. **Cancer Research**, 61: 837-841, 2001.

LEICHSENTRING, A.; LOSI-GUEMBAROVSKI, R.; MACIEL, M.E.; LOSI-GUEMBAROVSKI, A.; OLIVEIRA, B.W.; RAMOS, G.; CAVALCANTI, T.C.S.; BICALHO, M.G.; CAVALLI, I.J.; CÓLUS, I.M.S.; RIBEIRO, E.M.S.F. *CYP1A1* and *GSTP1* polymorphisms in an oral cancer case-control study. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 39: 1569-1574, 2006.

LERMAN, M.I.; MINNA, J.D. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. **Cancer Research**, 60:6116-33, 2000.

LICHTENSTEIN, P.; HOLM, N.V.; VERKASALO, P.K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer: analysis of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. **New England Journal of Medicine**, 343:78-85, 2000.

LIN, H.J.; HAN, C.Y.; BERNSTEIN, D.A.; HSIAO, W.; LIN, B.K.; HARDY, S. Ethnic distribution of the glutathione transferase Mu 1 (GSTM1) null genotype in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility. **Carcinogenesis**, 15: 1077-1081, 1994.

LIPPMAN, S.; HONG, W.K. Molecular markers of the risk of oral cancer. **New England Journal of Medicine**, 344:1323-1326, 2001.

LOCHMUELLER, K.E.; PEARCE, C.L.; PIKE, M.; LANDER, E.S.; HIRSCHHORN, J.N. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. **Nature Genetics**, 33:177-182, 2003.

LOSI-GUEMBAROVSKI, R.; D'ARCE, L. P. G.; CÓLUS, I.M.S. Glutathione S-transferase Mu (*GSTM1*) null genotype in relation to gender, age and smoking status in a healthy Brazilian population.. **Genetics and Molecular Biology**, 25: 357 - 360, 2002.

LOTAN, R.; XU, X.C.; LIPPMAN, S.M.; RO, J.Y.; LEE, J.S.; LEE, J.J.; HONG, W.K. Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. **New England Journal of Medicine**, 332: 1405-1410, 1995.

LOTHE, R.A. Microsatellite instability in human solid tumors. **Molecular Medicine Today**, 61-68, 1997.

MACIEL, M.E. **Genes do biometabolismo: Aspectos populacionais em euro-descendentes e afro-descendentes do sul do Brasil**. Curitiba, 2007. 112p. Dissertação de Mestrado. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MAO, L.; LEE, J.S.; FAN, Y.H. Frequent microsatellite alterations at chromosome 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. **Nature Medicine**, 2:682-685, 1996.

MAO, L.; FAN, Y.H.; LOTAN, R. Frequent abnormalities of FHIT, a candidate tumor suppressor gene, in head and neck cancer cell lines. **Cancer Research**, 56: 5128-5131, 1996.

MARQUES, C.F.; KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R.J.; BOFFETTA, P.; BRENNAN, P.; HATAGIMA, A. Influence of CYP1A1, CYP2E1, GSTM3 and NAT2 genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: results from a case-control study in Rio de Janeiro. **Oral Oncology**, 42: 632-637, 2006.

MATTHIAS, C.; BOCKMUHL, V.; JAHNKE, V.; HARRIES, L.W.; WOLF, C.R.; JONES, P.W.; ALLDERSEA, J.; WORRAL, S.F.; HAND, P.; FRYER, A.A.; STRANGE, R.C. The glutathione S-transferase GSTP1 polymorphism: effects on susceptibility to oral/pharyngeal and laryngeal carcinomas. **Pharmacogenetics**, 8:1-6, 1998.

McDONNELL, W.M.; SCHEIMAN, J.M.; TRABER, P.G. Induction of cytochrome p4501A genes (CYP1A) by omeprazole in the human alimentary tract. **Gastroenterology**, 103:1509-1516, 1992.

McLAUGHLIN, J.K.; GRIDLEY, G.; BLOCK, G.; WINN, D.M.; PRESTON-MARTIN, S.; SCHOENBERG, J.B.; GREENBERG, R.S.; STEMHAGEN, R.S.; AUSTIN, D.F.; ERSHOW, A.G. *et al.* Dietary factors in oral and pharyngeal cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, 80: 1237-1243, 1988.

McMAHON, S.; CHEN, A.Y. Head and neck cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, 22:21-24, 2003.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. **Nucleic Acids Research**, 16:1215, 1988.

MORIKAWA, H.; NAKAGAWA, Y.; HASHIMOTO, K.; NIKI, M.; EGASHIRA, Y.; HIRATA, I.; KATSU, K.; AKAO, Y. Frequent altered expression of fragile histidine triad protein in human colorectal adenomas. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 278: 205-210, 2000.

NACCARATI, A.; SOUCEK, P.; STETINA, R.; HAUFROID, V.; KUMAR, R.; VODICKOVA, L.; TRTKOVA, K.; DUSINSKA, M.; HEMMINKI, K.; VODICKA, P. Genetic polymorphisms and possible gene–gene interactions in metabolic and DNA repair genes: Effects on DNA damage. **Mutation Research**, 593: 22–31, 2006.

NAGPAL, J.K.; DAS, B.R. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. **Oral Oncology**, 39:213-221, 2003.

NAIR, U.J.; JAGADEESAN, N.; MATHEW, B.; BARTSCH, H. Glutathione *S* transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for oral leukoplakia in ethnic Indian betel quid/tobacco chewers. **Carcinogenesis**, 20: 743-748, 1999.

NEBERT, D.W.; MCKINNON, R.A.; PUGA, A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. **DNA Cell Biology**, 15:273-280, 1996.

NG, I.O.L.; XIAO, L.; LAM, K.Y.; YUEN, P.W.; NG, M. Microsatellite alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck - clustering of loss of heterozygosity in a distinct subset. **Oral Oncology**, 36: 484-490, 2000.

NORPPA, H. Genetic susceptibility, biomarker responses, and cancer. **Mutation Research**, 544:339-348, 2003.

NUMASAWA, H.; YAMAMOTO, N.; KATAKURA, A.; SHIBAHARA, T. Loss of heterozygosity and microsatellite instability on chromosome 2q in human oral squamous cell carcinoma. **Bulletin of Tokyo Dental College**, 46:17-25, 2005.

NUNN, J.; NAGINI, S.; RISK, J.M.; PRIME, W.; MALONEY, P.; LILOGLOU, T.; JONES, A.S.; ROGERS, S.R.; GOSNEY, J.R.; WOOLGAR, J.; FIELD, J.K. Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci, hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 and hMSH3, in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncology**, 39:115-129, 2003.

OLSHAN, A.F.; WEISSLER, M.C.; WATSON, M.A.; BELL, D.A. GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 9:185-191, 2000.

OLSHAN, A.F.; LI, R.; PANKOW, J.S.; BRAY, M.; TYROLER, H.A.; CHAMBLESS, L.E.; BOERWINKLE, E.; PITTMAN, G.S.; BELL, D.A. Risk of atherosclerosis: interaction of smoking and glutathione-S-transferase genes. **Epidemiology**, 14: 321–327, 2003.

OHTA, M.; INOUE, H.; COTTICELLI, M.G.; KASTURY, K.; BAFFA, R.; PALAZZO, J.; SIPRASHVILI, Z.; MORI, M.; McCUE, P.; DRUCK, P.; CROCE, C.M.; HUEBNER, K. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. **Cell**, 84:587-597, 1996.

PARKIN, D.M.; PISANI, P.; FERLAY, J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. **International Journal of Cancer**, 54: 594-606, 1993.

PARKIN, D.M.; BRAY, F.I.; DEVESA, S.S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Journal of Cancer**, 37: 54-66, 2001.

PARMIGIANI, R.B.; CAMARGO, A.A. O genoma Humano e o Câncer. In: . Ferreira, C.G.; Rocha, J.C. (org.). **Oncologia Molecular**. São Paulo: Editora Atheneu, , 3-11. 2004.

PARTRIDGE, M.; EMILION, G.; LANGDON, J.D. LOH at 3p correlates with a poor survival in oral squamous cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, 73:366-371, 1996.

PARTRIDGE, M.; EMILION, G.; PATEROMICHELAKIS, S.; PHILLIPS, E.; LANGDON, J.D. Location of candidate tumor suppressor genes loci at chromosomes 3p, 8p e 9p for oral squamous cell carcinomas. **International Journal of Cancer**, 83: 318-325, 1999.

PERERA, F.P. Environment and cancer: Who are susceptible? **Science**, 278:1068-1073, 1997.

PEREZ-ORDOÑEZ, B.; BEAUCHEMIN, M.; JORDAN, R.C.K. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Journal of Clinical Pathology**, 59: 445-453, 2006.

PERSSON, I.; JOHANSSON, T.; BERGLING, H.; MARJA-LIISA, D.; SEIDEGAD, J.; INGELMAN-SUNDNBERG, M. Genetic polymorphism of cytochrome p450 2E1: regulation and toxicological significance. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, 7:25-36, 1995.

PERUCHO, M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. **Biological Chemistry**, 377: 675-84, 1996.

PHAROAH, P.D.; DUNNING, A.M.; PONDER, B.A.; EASTON, D.F. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. **Nature Reviews of Cancer**, 11:850-860, 2004.

PISANI, P.; BRAY, F.; PARKIN, D.M. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. **International Journal of Cancer**, 97:72-81, 2002.

PITMAN, K.T.; JOHNSON, J.T.; WAGNER, R.L. Cancer of the tongue in patients less than forty. **Head & Neck**, 22: 297-302, 2000.

PROPST, G.B. **Análise de perda de heterozigose na região 9p em portadores de tumores malignos da cavidade bucal**. Curitiba, 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

RAI, R.; KULKARNIB, V.; SARANATHB, D. Genome wide instability scanning in chewing-tobacco associated oral cancer using inter simple sequence repeat PCR. **Oral Oncology**, 40: 1033–1039, 2004.

RAIMONDI, S.; BOFFETTA, P.; ANTTILA, S.; BROCKMOLLER, J.; BUTKIEWICZ, D.; CASCORBI, I.; CLAPPER, M.L.; DRAGANI, T.A.; GARTE, S.; GSUR, A.; HAIDINGER, G.; HIRVONEN, A.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; KALINA, I.; LAN, Q.; LEONI, V.P.; MARCHAND, L.L.; LONDON, S.J.; NERI, M.; POVEY, A.C.; RANNUG, A.; RESZKA, E.; RYBERG, D.; RISCH, A.; ROMKES, M.; RUANO-RAVINA, A.; SCHOKET, B.; SPINOLA, M.; SUGIMURA, H.; WU, X.; TAIOLI, E. Metabolic gene polymorphisms and lung cancer risk in non-smokers. An update of the GSEC study. **Mutation Research**, 2005.

RANNUG, A.; ALEXANDRIE, A-K.; PERSSON, I.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic polymorphism of cytochromes p450 1A1, 2D6 and 2E1: regulation and toxicological significance. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, 37:25-36, 1995.

RAJANBABU, R.; PATARCA, R. DNA replication and cancer. **Critical Review Oncology**, 10: 275-91, 1999.

REIS, P.P.; POLI-FREDERICO, R.C.; SANTOS, R.M.; NISHIMOTO, I.N.; KOWALSKI, L.P.; ROGATTO, S.R. Distinct regions of loss of heterozygosity on 22q at different sites of head and neck squamous cell carcinomas. **Medical Science Monitor**, 8:89-94, 2002.

RODRIGUEZ, T.; ALTIERI, A.; CHATENOLD, L.; GALLUS, S.; BOSETTI, C.; NEGRI, E.; FRANCESCHI, S.; LEVI, F.; TALAMINI, R.; VECCHIA, C.L. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. **Oral Oncology**, 40: 207-213, 2004.

RODRIGUEZ-MONGE, E.J.; SHIN, D.M.; LIPPMAN, S.M. Head and Neck Cancer. **Medical Oncology: A Comprehensive Review**, 1997. PRR, Inc.

ROSSI, B.M.; PINHO, M. Mutação, Câncer, Oncogenes e Genes Supressores de Tumor: Um Equilíbrio. In: **Genética e Biologia Molecular para o Cirurgião**. Marina ISBN. São Paulo, 1999.

ROSIN, M.P.; CHENG, X.; POH, C. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. **Clinical Cancer Research**, 6: 357-362, 2000.

ROWLEY, H.; JONES, A.; SPANDIDOS, D.; FIELD, J. Definition of a tumor suppressor gene locus on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma of the head and neck by means of microsatellite markers. **Archives of Otolaryngology- Head & Neck Surgery**, 122:497-501, 1996.

SATO, M.; SATO, T.; IZUMO, T.; AMAGASA, T. Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. **Carcinogenesis**, 20:1927-1931, 1999.

SATO, M.; SATO, T.; IZUMOB, T.; AMAGASA, T. Genetically high susceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined genotyping of CYP1A1 and GSTM1 genes. **Oral Oncology**, 36: 267-271, 2000.

SCHLECHT, N.F.; FRANCO, E.L.; PINTOS, J.; NEGASSA, A.; KOWALSKI, L.P.; OLIVEIRA, B.V. Interaction between tobacco and alcohol consumption and the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. **American Journal of Epidemiology**, 150: 1129-37, 1999.

SCULLY, C.; PORTER, S. Oral Cancer. **British Medical Journal**, 321:97-100, 2000.

SCULLY, C.; FIELD, J.K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncology**, 36:256-263, 2000.

SEM, S. Aneuploidy and cancer. **Current Opinion in Oncology**, 12:82-88, 2000.

SHASTRY, B.S. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. **Pharmacogenomics**, 6: 16-21, 2006.

SHIVAKUMAR, L.; MINNA, J.; SAKAMAKI, T.; PESTELL, R.; WHITE, M.A. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. **Molecular Cell Biology**, 22: 4309-18, 2002.



SHRIVER, S.P.; SHRIVER, M.D.; TIRPAK, D.L.; BLOCK, L.M.; HUNT, J.D.; FERRELL, R.E.; SIEGFRIED, J.M. Trinucleotide repeat length variation in the human ribosomal protein L14 gene (RPL14): localization to 3p21.3 and loss of heterozygosity in lung and oral cancers. **Mutation Research**, 406:9-23, 1998.

SMART, C.R. Screening for cancer of the aerodigestive tract. **Cancer Supplement**, 72:1060-1065, 1993.

SONG, M.S.; SONG, S.J.; AVAD, N.G.; CHANG, J.S.; LEE, J.H.; HONG, H.K.; LEE, H.; CHOI, N.; KIM, J.; KIM, H.; KIM, J.W.; CHOI, E.J.; KIRSCHNER, M.W.; LIM, D.S. The tumor suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. **Nature Cell Biology**, 6: 129-137, 2004.

SOZZI, G.; VERONESE, M.L.; NEGRINI, M.; BAFFA, R.; COTTICELLI, M.G.; INOUE, H.; TORNIELLI, S.; PILOTTI, S.; De GREGORIO, L.; PASTORINO, U.; PIEROTTI, M.A.; OHTA, M.; HUEBNER, K.; CROCE, C.M. The FHIT gene in 3p14.2 is abnormal in lung cancer. **Cell**, 85: 17-26, 1996.

SPARANO, A.; QUESNELLE, K.M.; KUMAR, M.S.; WANG, Y.; SYLVESTER, A.J.; FELDMAN, M.; SEWELL, D.A.; WEINSTEIN, G.S.; BROSE, M.S. Genomic-wide profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. **Laryngoscope**, 116: 735-741, 2006.

SPEICHER, M.R. Microsatellite Instability in Human Cancer. **Oncology Research**, 7:267-275, 1995.

STEWART, B.W.; KLEIHUES, P., editors. **World cancer report**. Lyon: IARC Press, 2003.

STEIN, C.K.; GLOVER, T.W.; PALMER, J.L.; GLISSON, B.S. Direct correlation between FRA3B expression and cigarette smoking. **Genes Chromosomes Cancer**, 34: 333-340, 2002.

SUDBO, J.; KILDAL, W.; RISBERG, B.; KOPPANG, H.S.; DANIELSEN, H.E.; REITH, A. DNA content as a prognostic marker in patients with oral leucoplakia. **New England Journal of Medicine**, 344:1270-1278, 2001.

SUGIMURA, T.; KUMINOTO, H.; TOHNAI, I.; FUKUI, T.; MATSUO, K.; TSURUSAKO, S.; MITSUDO, K.; UEDA, M.; TAJIMA, K.; ISHIZAKI, K. Gene environment interaction involved in oral carcinogenesis: molecular epidemiological study for metabolic and DNA repair gene polymorphisms. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 35:11-18, 2006.

TABOR, M.P.; BRAKENHOFF, R.H.; VAN HOUTEN, V.M.M.; KUMMER, J.A.; SNEL, M.H.J.; SNIJDERS, P.J.F.; SNOW, G.B.; LEEMANS, C.R.; BRAAKHUIS, B.J.M. Persistence of Genetically Altered Fields in Head and Neck Cancer Patients: Biological and Clinical Implications. **Clinical and Cancer Research**, 7:1523-1532, 2001.

TAIOLI, E.; TRACHMAN, J.; CHEN, X.; GARTE, S.J. A CYP1A1 restriction fragment length polymorphism is associated with breast cancer in African-American women. **Cancer Research**, 55: 3757-3758, 1995.

TAIOLI, E.; FORD, J.; TRACHMAN, J.; LI, Y.; DEMOPOULOS, R.; GARTE, S. Lung cancer risk and CYP1A1 genotype in African Americans. **Carcinogenesis**, 19: 813-817, 1998.

UICC and AJCC CLASSIFICATION. **Manual for staging of cancers**, 3rd ed.: G.B. Lippincott, 1988.

UZAWA, N.; YOHISDA, M.A.; HOSOE, S.; OSHIMURA, M.; AMAGASA, T.; IKEUCHI, T. Functional evidence for involvement of multiple putative tumor suppressor genes on the short arm of chromosome 3 in human oral squamous cell carcinogenesis. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, 107:125-131, 1998.

VANDERLEI, F.A.B.; PEREIRA, F.C.; HOJAIJ, F.C.; NISHIO, S. Importância do exame da cavidade oral no diagnóstico precoce de tumores de boca. **Revista Brasileira de Medicina**, 77:101-112, 1998.

van der RIET, P.; NAWRAZ, H.; HRUBAN, R.H. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. **Cancer Research**, 54: 1156-1158, 1994.

van HEERDEN, W.F.P.; SWART, T.J.P.; van HEERDEN, M.B.; van RENSBURG, E.J.; ENGELBRECHT, S.; DREYER, L.; HUEBNER, K. Immunohistochemical evaluation of Fhit protein expression in oral squamous cell carcinomas. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 28: 433-437, 1999.

VERMA, R.S.; TRIANTAFILLOU, N.G. Oncogenetic map of human genome. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, 100:88-90, 1998.

VERSCHUUR, H.P. IRISH, J.C.; O'SULLIVAN, B. A matched control study of treatment outcome in young patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Laryngoscope**, 109: 249-258, 1999.

VINEIS, P.; VEGLIA, F.; ANTTILA, S.; BENHAMOU, S.; CLAPPER, M.L.; DOLZAN, V.; RYBERG, D.; HIRVONEN, A.; KREMERS, P.; LE MARCHAND, L.; PASTORELLI, R.; RANNUG, A.; ROMKES, M.; SCHOKET, B.; STRANGE, R.C.; GARTE, S.; TAIOLI, E. CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and lung cancer: a pooled analysis of gene-gene interactions. **Biomarkers**, 9: 298-305, 2004.

VIRGILIO, L.; SHUSTER, M.; GOLLIN, S.M.; VERONESE, M.L.; OHTA, M.; HUEBNER, K.; CROCE, C.M. FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 93: 9770-9775, 1996.

VOGEL, F.; MOTULSKY, A.G. Somatic mutation, cancer and aging. In VOGEL, F.; MOTULSKY, A.G. (eds): **Human Genetics: Problems and Approaches**. Springer Verlag, 431-456, 1997.

ZAKRZEWSKA, J.M. Fortnightly review: Oral cancer. **British Medical Journal**, 318:1051-1054, 1999.

YAMAMOTO, Y.; VIRMANI, A.K.; WISTUBA, I.I.; MCINTIRE, D.; VUITCH, F.; ALBORES-SAAVEDRA, J.; GAZDAR, A.F. Loss of heterozygosity and microsatellite alterations in p53 and RB genes in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. **Human Pathology**, 27:1204-10, 1996.

YAMAMOTO, N.; NOMA, H.; SHIBAHARA, T. Allelic Imbalance on the Long Arm of Chromosome 21 in Human Oral Squamous Cell Carcinoma: Relationship Between Allelic Imbalances (LOH and MSI) and Clinicopathologic Features. **Bulletin of Tokyo Dental College**, 42:211-223, 2001.

YAMAMOTO, N.; MIZOE, J.; NUMASAWA, H.; TSUJII, H.; SHIBAHARA, T.; NOMA, H. Allelic loss on chromosomes 2q, 3p and 21q: possibly a poor prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, 39: 795-805, 2003.

YANG, A. KAGHAD, M. CAPUT, D. MCKEON F. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. **Trends in Genetics**, 18:90-95, 2002.

YEH, K.T.; CHANG, J.G.; LIN, T.H.; WANG, Y.F.; TIEN, N.; CHANG, J.Y.; CHEN, J.C.; SHIH, M.C. Epigenetic changes of tumor suppressor genes, P15, P16, VHL and P53 in oral cancer. **Oncology Reports**, 10: 659-663, 2003.

YOO, W.J.; CHO, S.H.; LEE, Y.S.; PARK, G.S.; KIM, M.S.; KIM, B.K.; PARK, W.S.; LEE, J.Y.; KANG, C.S. Loss of Heterozygosity on Chromosomes 3p, 8p, 9p and 17p in the Progression of Squamous Cell Carcinoma of the Larynx. **Journal of Korean and Medical Science**, 19:345-351, 2004.

WALKER, C.L. Cancer susceptibility genes and molecular carcinogenesis. American Association for Cancer Research Special Conference: Cancer Susceptibility Genes and Molecular Carcinogenesis. **Molecular Medicine Today**, 2:364-365, 1996.

WARNAKULASURIYA, S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer. **Journal of Pathology**, 190:407-409, 2000.

WEINBERG, R.A. Tumor suppressor genes. **Science**, 245:1138-1145, 1991.

WIDERSTEN, M.; PEARSON, W.R.; ENGSTROM, A.; MANNERVIK, B. Heterologous expression of the allelic variant Mu-class glutathione transferases m and y. **Biochemical Journal**, 276:519-524, 1991.

WOOSTER, R.; CLETON-JANSER, A.M.; COLLINS, N.; MANGION, J.; CORNELIS, R.S.; COOPER, C.S.; GUSTERSON, B.A.; PONDER, B.A.J.; von DEIMLING, A.; WIESTLER, O.D.; CORNELISSE, C.J.; DEVILEE, P.; STRATTON, M.R. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. **Nature Genetics**, 6:152-156, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Classification of Diseases for Oncology**, 2nd., Geneva: World Health Organization, 1990.

WORRAL, S.; CORRIGAN, M.; HIGH, A. Susceptibility and outcome in oral cancer; preliminary data showing an association with polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6. **Pharmacogenetics**, 1998.

WU, C.L.; SLOAN, P.; READ, A.P.; HARRIS, R.; THAKKER, N. Deletion mapping on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Cancer Research**, 54:6484-6488, 1994.

WÜNSCH, V.F.; ZAGO, M.A. Modern cancer epidemiological research: genetic polymorphisms and environment. **Revista de Saúde Pública**, 39: 490-497, 2005.

WÜNSCH-FILHO, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. **Oral Oncology**, 38:737-746, 2002.

WÜNSCH-FILHO, V.; CAMARGO, E.A. The burden of mouth cancer in Latin America and the Caribbean: epidemiologic issues. **Seminars in Oncology**, 28: 158-168, 2001.

## **8. APÊNDICES**

**Variáveis sócio-demográficas dos pacientes portadores de carcinomas bucais e resultados obtidos para os genes candidatos de suscetibilidade**

<b>Código</b>	<b>Sexo</b>	<b>Etnia</b>	<b>Idade</b>	<b>Tabagismo</b>	<b>CYP1A1</b>	<b>GSTM1</b>	<b>GSTT1</b>
1.	M	E	66	SIM	T/C	+	-
2.	M	E	47	SIM	T/T	+	+
3.	M	E	46	SIM	T/T	+	+
4.	M	AD	83	SIM	T/C	-	+
5.	M	AD	61	SIM	T/T	+	-
6.	M	E	50	SIM	T/T	+	+
7.	M	E	66	SIM	T/T	-	+
8.	M	E	38	SIM	T/C	-	+
9.	M	E	62	SIM	T/T	+	+
10.	M	E	49	SIM	T/T	+	+
11.	M	E	73	SIM	T/T	+	+
12.	F	E	67	SIM	T/T	-	+
13.	M	E	41	SIM	T/C	+	+
14.	M	E	66	SIM	T/C	+	+
15.	M	E	73	SIM	T/T	-	+
16.	M	E	57	SIM	T/T	-	+
17.	M	E	42	SIM	T/T	-	+
18.	M	AD	42	SIM	T/C	+	+
19.	M	AD	73	SIM	T/T	+	+
20.	M	E	50	SIM	T/T	+	+
21.	M	E	70	SIM	T/C	+	+
22.	M	E	39	SIM	T/C	+	+
23.	M	E	53	SIM	T/T	+	+
24.	M	E	65	SIM	T/C	-	+
25.	M	E	75	SIM	C/C	-	-
26.	M	E	52	SIM	C/C	+	+
27.	M	E	67	SIM	C/C	+	+
28.	M	E	45	SIM	C/C	-	-
29.	M	E	40	SIM	T/T	-	-
30.	F	E	60	SIM	T/T	-	+
31.	M	E	53	SIM	T/C	+	+
32.	M	E	55	SIM	T/T	+	-
33.	M	E	66	SIM	T/T	+	+
34.	M	E	63	SIM	T/C	+	+
35.	M	E	63	SIM	T/C	+	+
36.	M	E	47	SIM	T/T	+	+
37.	M	E	49	SIM	C/C	+	-
38.	M	E	47	SIM	T/C	+	-
39.	M	E	58	SIM	T/T	-	-
40.	M	E	73	SIM	T/T	+	+
41.	M	E	65	SIM	T/C	-	-
42.	M	E	52	SIM	T/C	-	+
43.	F	E	52	NÃO	T/T	+	-
44.	M	E	50	SIM	T/T	-	+
45.	M	E	78	SIM	T/T	+	-
46.	M	E	75	SIM	T/T	+	-
47.	M	E	49	SIM	C/C	-	+
48.	M	E	58	SIM	T/T	-	-
49.	F	E	61	SIM	T/T	-	-
50.	M	E	67	SIM	T/T	+	-

51.	M	E	47	SIM	T/C	+	+
52.	M	E	43	SIM	T/T	-	+
53.	M	E	48	SIM	T/T	-	-
54.	M	E	65	SIM	T/C	+	+
55.	M	E	53	SIM	T/T	-	+
56.	F	E	68	SIM	T/T	+	+
57.	M	E	71	SIM	T/C	+	-
58.	M	E	50	SIM	T/T	+	+
59.	M	E	63	SIM	C/C	+	-
60.	F	AD	58	NÃO	T/C	+	-
61.	M	E	62	SIM	T/T	-	+
62.	F	E	80	NÃO	T/T	+	+
63.	M	E	56	SIM	T/T	-	+
64.	M	E	70	SIM	T/T	+	-
65.	F	A	73	NÃO	T/T	-	+
66.	M	E	68	SIM	T/T	+	+
67.	M	E	57	NÃO	T/T	-	+
68.	M	AD	66	SIM	C/C	+	+
69.	M	E	55	SIM	T/T	+	+
70.	F	AD	60	SIM	T/T	+	+
71.	F	AD	50	SIM	T/C	+	-
72.	M	E	58	SIM	T/T	+	+
73.	M	AD	52	SIM	T/T	+	-
74.	M	E	67	SIM	T/T	+	+
75.	F	E	59	SIM	T/C	+	+
76.	M	E	61	SIM	T/T	-	+
77.	M	E	65	SIM	T/T	-	-
78.	M	AD	64	SIM	C/C	+	-
79.	M	E	65	SIM	T/C	+	+
80.	M	E	56	SIM	T/C	+	+
81.	M	E	57	SIM	T/T	-	+
82.	M	E	76	SIM	T/T	-	+
83.	M	E	48	SIM	T/C	-	+
84.	M	E	52	SIM	T/T	+	+
85.	M	E	60	SIM	T/T	+	+
86.	M	E	63	SIM	T/T	-	-
87.	F	E	42	SIM	T/C	-	-
88.	M	E	40	SIM	T/T	-	-
89.	M	E	65	SIM	T/T	+	-
90.	M	E	54	NÃO	T/C	-	+
91.	M	AD	69	SIM	T/C	-	-

Legenda: M=masculino, F=feminino; E=Euro-descendente; AD=Afro-descendente; A= descendente de asiático; +: gene presente; -: gene ausente.



**Variáveis sócio-demográficas dos indivíduos-controle e resultados obtidos para os genes candidatos de suscetibilidade**

<b>Código</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>Tabagismo</b>	<b>CYP1A1</b>	<b>GSTM1</b>	<b>GSTT1</b>
1.	M	62	E	NÃO	T/T	-	+
2.	M	57	E	NÃO	T/T	-	+
3.	M	55	E	SIM	T/C	-	+
4.	F	56	E	SIM	T/T	-	+
5.	M	58	E	SIM	T/T	-	+
6.	M	53	E	SIM	T/T	-	+
7.	M	37	E	SIM	T/C	-	+
8.	F	41	E	SIM	T/C	-	+
9.	F	50	E	NÃO	T/T	+	+
10.	F	56	E	NÃO	T/T	+	+
11.	M	36	E	SIM	T/T	+	-
12.	M	49	E	SIM	T/T	+	+
13.	F	58	E	SIM	T/T	+	+
14.	M	50	E	SIM	T/T	-	+
15.	M	61	E	SIM	T/T	+	+
16.	F	60	AD	SIM	T/T	-	+
17.	M	53	E	SIM	T/C	+	+
18.	M	53	E	NÃO	T/T	+	+
19.	M	42	E	SIM	T/T	+	+
20.	M	39	E	SIM	T/T	+	-
21.	M	47	E	SIM	T/T	+	-
22.	F	57	E	SIM	C/C	-	-
23.	F	52	E	NÃO	T/C	-	+
24.	M	42	E	SIM	T/T	-	-
25.	F	54	AD	NÃO	C/C	+	-
26.	F	77	E	NÃO	T/T	+	+
27.	M	63	AD	SIM	T/T	-	-
28.	M	46	AD	SIM	T/T	+	+
29.	M	52	AD	SIM	T/T	+	+
30.	M	71	E	SIM	T/T	-	+
31.	F	68	E	SIM	T/C	+	+
32.	M	68	AD	SIM	T/T	+	+
33.	M	56	AD	SIM	T/T	-	+
34.	M	68	AD	SIM	C/C	-	+
35.	M	68	E	SIM	T/T	+	+
36.	M	82	AD	SIM	T/T	+	+
37.	M	62	E	SIM	C/C	+	+
38.	M	55	E	SIM	T/C	-	+
39.	M	51	E	SIM	T/C	+	+
40.	M	54	E	SIM	T/T	+	+
41.	F	68	A	NÃO	T/T	+	-
42.	M	54	E	SIM	T/T	+	-
43.	F	56	E	SIM	T/C	+	+
44.	F	52	AD	SIM	T/C	+	-
45.	M	60	AD	SIM	T/C	-	+
46.	F	52	AD	SIM	T/T	-	-
47.	M	53	E	SIM	T/C	-	+
48.	M	65	E	SIM	T/T	-	-
49.	M	60	E	SIM	T/C	+	+
50.	M	61	E	SIM	T/C	-	+

51.	M	59	E	SIM	T/T	-	-
52.	M	64	E	SIM	T/C	+	-
53.	M	64	E	SIM	T/C	-	-
54.	M	61	E	SIM	T/T	-	+
55.	M	78	E	SIM	T/T	+	+
56.	F	72	E	SIM	T/T	-	-
57.	M	70	E	SIM	C/C	+	-
58.	M	59	E	SIM	T/C	-	-
59.	M	60	E	SIM	T/C	+	+
60.	M	63	E	SIM	T/C	-	-
61.	M	52	E	SIM	T/T	-	+
62.	M	53	E	SIM	T/C	-	-
63.	M	56	E	SIM	T/T	-	-
64.	M	80	E	SIM	T/C	+	+
65.	M	57	E	SIM	T/T	-	-
66.	M	61	E	SIM	T/T	+	+
67.	F	70	E	SIM	T/T	+	+
68.	M	69	E	SIM	T/T	-	-
69.	F	67	E	SIM	T/T	-	+
70.	M	43	E	SIM	T/T	-	+
71.	M	46	E	SIM	T/C	+	+
72.	M	77	E	SIM	T/T	+	+
73.	M	76	E	SIM	T/T	+	+
74.	M	70	E	SIM	T/T	-	+
75.	F	54	E	SIM	T/T	-	+
76.	M	52	E	SIM	T/T	+	+
77.	F	61	E	SIM	T/T	-	+
78.	M	60	E	NÃO	T/T	-	+
79.	M	53	E	SIM	T/T	-	+
80.	M	68	E	SIM	T/T	+	+
81.	M	70	E	SIM	T/C	-	+

Legenda: M=masculino, F=feminino; E=Euro-descendente; AD=afro-descendente; A= descendente de asiático; +: gene presente; -: gene ausente.

**Distribuição de homozigotos, heterozigotos, LOHs e casos não amplificados nos sete marcadores microsatélites analisados nos tumores dos pacientes portadores de carcinomas bucais**

Amostras	D3S1307	D3S1263	D3S1286	D3S1581	D3S1300	D3S1079	D3S1274
1.	HOMO	LOH	LOH	HOMO	LOH	LOH	LOH
2.	-	LOH	LOH	-	HET	LOH	LOH
3.	HET	HOMO	HET	HET	LOH	HET	HET
4.	LOH	HET	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH
5.	-	-	-	-	-	-	-
6.	HET	HET	HOMO	LOH	HET	HET	HET
7.	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	HOMO	LOH
8.	LOH	LOH	LOH	HET	HET	HET	HOMO
9.	HOMO	HET	HET	HET	HET	HET	HOMO
10.	HOMO	LOH	LOH	HOMO	LOH	HOMO	HOMO
11.	HOMO	HOMO	LOH	LOH	LOH	LOH	HOMO
12.	-	HET	LOH	LOH	HET	HET	HOMO
13.	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH
14.	HET	HET	HET	HOMO	-	HET	LOH
15.	-	HOMO	HET	HET	HET	HET	HET
16.	HOMO	HET	HET	HET	LOH	HOMO	HET
17.	HET	LOH	LOH	LOH	HET	HOMO	HET
18.	HET	HET	LOH	HET	HET	HET	HOMO
19.	HET	-	HET	-	LOH	HET	HOMO
20.	LOH	HOMO	LOH	LOH	-	LOH	HOMO
21.	HET	HOMO	LOH	HET	LOH	LOH	HET
22.	HET	HET	HET	-	HET	HET	HOMO
23.	HET	HET	HET	HOMO	HET	HOMO	HOMO
24.	LOH	-	HOMO	LOH	LOH	LOH	LOH
25.	HET	HET	HET	LOH	HET	HOMO	HOMO
26.	HET	HET	HET	HET	HET	HET	HOMO
27.	LOH	LOH	LOH	LOH	HOMO	LOH	HOMO
28.	LOH	HOMO	HET	LOH	HOMO	HOMO	HOMO
29.	HET	HET	HET	HET	HOMO	HOMO	HOMO
30.	HET	HET	HET	LOH	LOH	HET	HOMO
31.	HET	HET	HET	HET	HET	HOMO	HOMO
32.	HET	HET	HOMO	HOMO	LOH	HET	LOH
33.	LOH	HET	LOH	HET	LOH	LOH	LOH
34.	HET	HET	HET	HOMO	HET	HOMO	HET

---

35.	HOMO	HOMO	HET	HET	LOH	HET	HOMO
36.	LOH	HET	LOH	HET	HET	HET	LOH
37.	LOH	HOMO	LOH	HOMO	HET	HOMO	HET
38.	LOH	HOMO	LOH	HET	HET	HOMO	LOH
39.	-	HOMO	LOH	-	LOH	LOH	HOMO
40.	LOH	LOH	LOH	HET	LOH	HOMO	LOH
41.	HOMO	HOMO	HET	LOH	-	-	HET
42.	-	HOMO	-	-	-	HOMO	HET
43.	LOH	HOMO	LOH	-	HET	HOMO	HET
44.	-	-	HET	LOH	-	HOMO	HOMO
45.	HET	HOMO	HET	HET	HOMO	LOH	HET
46.	HET	HOMO	LOH	HET	LOH	LOH	LOH
47.	HET	HOMO	HET	HOMO	HET	HOMO	HET
48.	LOH	-	HET	HET	-	HOMO	LOH
49.	LOH	HOMO	LOH	-	LOH	HET	LOH
50.	-	-	-	-	-	-	-
51.	LOH	LOH	LOH	HET	LOH	HOMO	LOH
52.	-	-	-	-	-	-	LOH
53.	HOMO	HOMO	LOH	LOH	HOMO	HOMO	HOMO
54.	-	-	-	-	HOMO	HOMO	LOH
55.	HOMO	HET	HET	HOMO	HET	HOMO	HET
56.	-	-	-	-	-	-	-
57.	HOMO	-	LOH	HOMO	HET	HET	HET
58.	-	HOMO	LOH	HOMO	HOMO	LOH	HOMO
59.	-	HET	LOH	LOH	LOH	LOH	HOMO
60.	-	HOMO	-	-	-	-	LOH
61.	HOMO	HET	HET	HET	HET	HOMO	HET
62.	HET	LOH	LOH	LOH	HET	HOMO	HOMO
63.	HET	-	-	HOMO	HOMO	HOMO	HOMO
64.	HOMO	-	-	LOH	-	-	HOMO
65.	LOH	HOMO	LOH	HOMO	LOH	HOMO	LOH
66.	-	HOMO	HOMO	-	HOMO	-	HOMO
67.	LOH	LOH	HET	LOH	LOH	HOMO	LOH
68.	-	-	HET	-	-	-	HOMO
69.	-	-	-	-	LOH	HET	HET
70.	-	-	LOH	HET	-	-	-
71.	-	-	-	HOMO	-	HOMO	-

---

72.	-	-	HOMO	HET	-	-	LOH
73.	LOH	HOMO	HET	-	HET	HOMO	HET
74.	-	-	-	-	-	HOMO	HOMO
75.	-	HET	-	LOH	-	HOMO	HOMO
76.	HOMO	HET	-	-	-	LOH	HOMO
77.	-	-	-	-	HOMO	HOMO	-
78.	-	LOH	LOH	-	-	LOH	HOMO
<b>N total:</b>	<b>N=54</b>	<b>N=58</b>	<b>N=63</b>	<b>N=57</b>	<b>N=58</b>	<b>N=67</b>	<b>N=72</b>

Legenda: HOMO= homozigoto; HET=heterozigoto; LOH= perda de heterozigose; - = ausência de resultado.

## **9. ANEXOS**

## INFORMAÇÕES AO DOADOR

### Nome do estudo: “Investigação genético-molecular de tumores da cavidade bucal”.

#### 1. Justificativa e objetivos da pesquisa:

Este estudo tem como principal objetivo estudar algumas características genéticas encontradas em tumores da cavidade oral. Esta pesquisa é muito importante, pois acreditamos que haja uma correlação entre estas características genéticas que desejamos estudar e o desenvolvimento das lesões (malignas ou benignas).

O que se chama de “características genéticas”, compreendem basicamente o estudo de genes que metabolizam agentes tóxicos das células que normalmente podem estar presentes em locais de trabalho, como defensivos agrícolas, raios-X, metais pesados, etc..., além de alterações genéticas em seqüências específicas do nosso genoma (microssatélites).

#### 2. Procedimentos a serem utilizados:

Serão recrutados cerca de 100 pacientes portadores de lesões na cavidade bucal, os quais serão submetidos aos seguintes procedimentos:

- a) Os doadores responderão a um questionário padrão referente ao seu grupo étnico, estilo de vida, idade, local de nascimento, hábito tabagista, história familiar de câncer etc... Nesta etapa eles poderão fazer todas as perguntas que acharem necessárias para um perfeito esclarecimento de todas as suas dúvidas.
- b) Um profissional da área de saúde, devidamente treinado, colherá de cada voluntário cerca de 10 ml de sangue (punção venosa) com seringa plástica descartável, bem como uma amostra do tecido tumoral através de biópsia.
- c) O sangue e o tecido tumoral serão levados ao Laboratório de Genética e Mutagênese da UEL e serão devidamente processados para extração do DNA e análise genética molecular.
- d) Os resultados serão analisados e correlacionados com hábito de vida, idade, história familiar de câncer e outros fatores da vida de cada doador.
- e) O término deste estudo está previsto para aproximadamente 48 meses.

#### 3. Desconforto e Riscos:

Durante a colheita do sangue e do tecido lesionado o doador poderá sentir desconfortos, ou uma ligeira dor decorrente da picada da agulha no braço ou na região oral, ou ainda, dependendo do estado emocional da pessoa, sentir pânico ao ver seu próprio sangue ou mesmo uma fobia pela agulha da seringa. Às vezes podem ocorrer sentimentos de desconfiança por parte do doador em relação ao profissional que está retirando o sangue. Quanto aos riscos de se doar sangue, estes são desprezíveis, pois todo o material utilizado será descartável, eliminando qualquer possibilidade de contaminação por esta via.

#### 4. Benefícios esperados:

Os benefícios com relação a este estudo se constituirão em informar ao médico oncologista responsável os resultados obtidos nesta pesquisa e suas implicações ao paciente. O médico, por sua vez, ficará encarregado de passar as informações pertinentes ao paciente. Além disso,

os dados obtidos nesta pesquisa poderão ser divulgados em eventos e periódicos que poderão contribuir para um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos com tais lesões.

5. Informações adicionais a respeito deste estudo:

O sangue periférico e o tecido serão coletados com seringas e agulhas estéreis e descartáveis e serão processados nas dependências da UEL/UFPR, em ambiente esterilizado e por profissionais especializados. No entanto, existem diferenças entre as células dos indivíduos em responder aos procedimentos técnicos utilizados e, portanto, em alguns casos, há a necessidade de se repetir a colheita do material. Caso isto aconteça, o doador poderá ser chamado para uma nova doação de sangue.

6. Confiabilidade do estudo:

Os doadores em hipótese alguma terão sua identidade divulgada para outras pessoas ou entidades, além daquelas que participam efetivamente do estudo. Também serão mantidas em sigilo todas as informações obtidas e que estejam relacionadas com a privacidade do doador.

7. Acesso às informações obtidas:

Os pesquisadores e a Comissão de Ética que aprovaram este estudo, se comprometem a fornecer aos doadores todas as informações que venham a ser obtidas durante a pesquisa.



## TERMO DE CONSENTIMENTO

**Nome do estudo: “Investigação genético-molecular de tumores da cavidade bucal”.**

### CONSENTIMENTO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial (exame de sangue). E, entendo que os riscos de minha participação nesta pesquisa são mínimos.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar neste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual ou futuro.

Eu, \_\_\_\_\_, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo com a profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “Informações ao doador” , necessário para a minha compreensão do estudo.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus ou profa. Dra. Enilze Ribeiro, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

Profas. Dras. Ilce Mara de Syllos Cólus ou Enilze M.S.F. Ribeiro

## QUESTIONÁRIO PESSOAL

Por favor, leia as questões seguintes cuidadosamente e responda-as da forma mais completa e precisa possível. A informação que você der não será associada a seu nome em nenhum documento público, e será conhecida somente dos principais pesquisadores deste estudo. As informações que você der podem ter influência direta na interpretação dos nossos resultados, portanto, pedimos que coopere gentilmente, fornecendo informações corretas. Obrigado pelo interesse.

1- Nome: \_\_\_\_\_

último                                  primeiro                                  do meio

2- A ser preenchido pelo pesquisador:

Código: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Esta folha deve ser destacada do restante do questionário e preenchida pelo pesquisador. Somente o código será usado como identificação para as páginas subsequentes. Se for necessário espaço adicional para complementar a sua resposta, escreva no verso da página e identifique a parte restante da questão com seu respectivo número.

**HISTÓRIA PESSOAL**

- 1- Registro hospitalar: \_\_\_\_\_
- 2- Sexo: ( ) masculino ( ) feminino
- 3- A qual grande grupo étnico você pertence ?  
 Negro ( )    Caucasiano ( )    Asiático ( )    Indígena ( )    Outros ( )
- Idade: a) 0-20 anos.    b) 20 –50 anos.    c) mais que 50 anos.
- Local de nascimento: Paraná ? ( ) sim ( ) não
- Se não: Que região brasileira ? Norte ( ) Sul ( ) Nordeste ( ) Centro-Oeste ( )  
 Sudeste ( )
- Número de filhos: (i.e. não se incluem aí filhos adotados): a)0 b) 1 c) 2 d) + de 2
- 6- Sua moradia era na zona rural ou urbana? ( ) Rural ( ) Urbana
- 7- Quanto tempo viveu neste local? \_\_\_\_\_ anos \_\_\_\_\_ meses
- 8- No local onde morou por mais tempo qual era o tipo de moradia?  
 ( ) casa ( ) apartamento ( ) barraco ( ) cortiço ( ) outra
- 9- A residência onde mora é servida por água encanada? ( ) sim ( ) não
- 10- Qual o seu grau de instrução?  
 ( ) analfabeto ( ) 1º grau incompleto ( ) 1º grau completo ( ) 2º grau incompleto  
 ( ) 2º grau completo ( ) técnico ( ) profissional ( ) superior
- 11- Qual sua religião? a) ( ) Católico b) ( ) Protestante c) ( ) Outras

**Histórico de moradia**

- 12- Qual era o tipo de construção onde você morou mais tempo?  
 ( ) alvenaria ( ) madeira ( ) barro ( ) mista
- 13- Que tipo de cobertura tinha essa moradia? ( ) telha barro comum ( ) laje  
 ( ) folha de zinco ( ) brasilit-eternit ( ) sapé ( ) outro (qual?) \_\_\_\_\_
- 14- Você poderia me contar se morou a menos de 1 Km de uma destas indústrias por mais de 1 ano? Se sim, por quanto tempo? \_\_\_\_\_
- |                               |                 |
|-------------------------------|-----------------|
| Indústria têxtil ou tecelagem | ( ) sim ( ) não |
| Processamento de madeira      | ( ) sim ( ) não |
| Papel ou celulose             | ( ) sim ( ) não |
| Fábrica de sapatos ou curtume | ( ) sim ( ) não |
| Metalúrgica (cromo/níquel)    | ( ) sim ( ) não |
| Usina de açúcar ou álcool     | ( ) sim ( ) não |

- Plástico ou borracha ( ) sim ( ) não
- Refinaria de petróleo ( ) sim ( ) não

### Histórico de exposição relacionado ou não ao trabalho

15- Você já se expôs a alguma destas substâncias abaixo em seu trabalho?

Se SIM, por quanto tempo e há quanto tempo foi: \_\_\_\_\_

- Derivados de petróleo ( )sim ( )não  
(querosene, gasolina, solventes,...)
- Tintas/ corantes ( )sim ( )não
- Indústrias têxteis ou tecelagem ( ) sim ( ) não
- Praguicidas / Herbicidas ( )sim ( )não
- Radiação ( )sim ( )não
- Metais pesados (Pb, Ni, Cr,...) ( )sim ( )não
- Processamento de madeira ( )sim ( )não
- Papel ou celulose ( )sim ( )não
- Mineração ( )sim ( ) não
- Fábrica de sapatos ou curtume ( )sim ( )não
- Metalúrgica ( )sim ( )não
- Usina de açúcar ou álcool ( )sim ( )não
- Plástico ou borracha ( )sim ( )não
- Outras substâncias químicas: ( )sim ( )não

16- Se SIM para a pergunta acima: Você utilizava equipamentos de proteção individual para trabalhar com essas substâncias químicas? ( máscaras, luvas, óculos,...)

- a) ( )sim b) ( )não

### Histórico Tabagista

17- Você fuma atualmente? ( )sim ( )não

18- Se NÃO, mas já fumou, há quanto tempo parou de fumar?

- a) ( ) 0-5 anos b) ( ) 5-10 anos c) ( ) >10

19- Quanto você fuma/fumava por dia ? ( )menos de ½ maço  
( )de meio a 1 maço

( ) mais de um maço

(quantos: \_\_\_\_\_)

20- Você costuma/costumava fumar charutos? ( ) sim ( ) não

21- Você costuma/costumava fumar cachimbo? ( ) sim ( ) não

22- Você costuma/costumava fumar cigarro de palha? ( ) sim ( ) não

23- Você costuma/costumava mascar fumo? ( ) sim ( ) não

24- Você convive/conviveu em seu trabalho ou em casa com pessoas que fumam?

a) ( ) sim b) ( ) não

### Histórico de Etilismo

25- Você consome/consumiu bebidas alcólicas com frequência? ( ) sim ( ) não

26- Se já parou, há quanto tempo parou de consumir esta bebida?

a) ( ) 0-5 anos. b) ( ) 5 –10 anos. c) ( ) mais 10 anos.

27- Que tipo de bebida alcóolica você costuma/ costumava consumir ?

a) ( ) Destiladas b) ( ) Não-Destilada c) ( ) Outra

28- Quanto você costuma/ costumava beber por semana?

( ) no máximo um copo ( ) de 2 a 5 copos ( ) de 6 a 10 ( ) de 11 a 30 ( ) mais de 30

29- Durante a sua vida, já consumiu ou consome alguma bebida diariamente por mais de 6 meses continuamente?

a) ( ) Sim b) ( ) Não

### Histórico de Saúde

30- Há cerca de um ano você tem se automedicado com, por exemplo, aspirinas, antiácidos, antihistamínicos, sedativos, ou outras drogas? ( ) sim ( ) não ( ) não sabe

31- Você toma vitaminas freqüentemente ou tem tomado nos últimos seis meses?

( ) sim ( ) não ( ) não sabe

32- Você já operou da garganta (amígdalas)? ( ) sim ( ) não

33- Você se submeteu a algum Raio-X de cabeça e pescoço recentemente ?

( )sim ( )não

34- Se SIM, quantos? a) ( )Menos de 10 b) ( )Mais de 10

35- Você já teve as seguintes doenças?

( ) Bronquite asmática ( ) Pressão alta ( ) Diabetes ( ) Tuberculose ( ) Câncer

(localização do tumor\_\_\_\_\_)

36- Em casos de câncer na família, qual era o parentesco?

( ) Pai ( ) Mãe ( ) Irmão ( ) Filho ( ) Tio ( ) Primo ( ) Outro

37- Qual era a localização do tumor?

( ) Boca/garganta ( ) Pulmão ( ) Estômago ( ) Intestino ( ) Ginecológico ( ) Mama

( ) Outro (qual?) \_\_\_\_\_

38- Você já teve alguma moléstia venérea?

a) ( )sim b) ( )não

### Histórico de Saúde Dentária

39- Você usa/usou dentadura ou aparelho móvel? ( ) sim ( ) não

40- (Se sim) há quanto tempo? a) ( )0-5 anos. b) ( )5 –10 anos. c) ( )mais 10 anos.

41- Esta dentadura já lhe causou alguma ferida na boca? ( ) sim ( ) não

42- Com que freqüência você vai ao dentista? ( ) nunca ( ) <1/ano ( ) >1/ano

43- Você tem algum dente estragado? ( ) sim ( ) não

44- (Se sim) eles estão lhe machucando? ( ) sim ( ) não

### Histórico alimentar: (refira-se somente a hábitos freqüentes)

45- De qual tipo é o fogão da sua casa? ( ) gás ( ) lenha ( ) elétrico ( ) outro

46- Já residiu em casa com fogão á lenha? ( ) sim ( ) não

47- Você tem o hábito de ingerir alimentos e bebidas muito quentes? ( ) sim ( ) não

48- Você toma chimarrão? ( ) sim ( ) não

49- Você se alimenta apenas de vegetais? ( )sim ( )não

50-Você come carne? ( )sim ( )não

51-Se SIM, com que freqüência você come estes alimentos:

Dias/Semana

menos que 1

1-2

3-4

5-6

Diariamente

Carne	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Peixe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Frango	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Porco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Outros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### Histórico genético

52-Para mulheres: você já sofreu algum aborto espontâneo?

sim       não

53-Para ambos os sexos: você possui algum(a) irmão(a) gêmeo idêntico(a)?

sim       não

**Incluir informações das amostras do tumor (localização, laudo histopatológico):**

---

---

---