

FACULDADE CATÓLICA SALESIANA DO ESPÍRITO SANTO

JORDANA DOS SANTOS TREZENA

**POLIMORFISMO DO GENE *CYP1A1* E A SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER ORAL  
NO ESPÍRITO SANTO: UMA ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE FATORES  
GENÉTICOS E AMBIENTAIS**

VITÓRIA  
2015



JORDANA DOS SANTOS TREZENA

**POLIMORFISMO DO GENE *CYP1A1* E A SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER ORAL  
NO ESPÍRITO SANTO: UMA ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE FATORES  
GENÉTICOS E AMBIENTAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo,  
como requisito obrigatório para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dra. Melissa de Freitas Cordeiro-  
Silva

VITÓRIA  
2015



JORDANA DOS SANTOS TREZENA

**POLIMORFISMO DO GENE *CYP1A1* E A SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER ORAL  
NO ESPÍRITO SANTO: UMA ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE FATORES  
GENÉTICOS E AMBIENTAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, por:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Melissa de Freitas Cordeiro-Silva - Orientador

\_\_\_\_\_  
Prof. Msc. Priscila Pinto e Silva dos Santos, Faculdade Católica Salesiana do  
Espírito Santo

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Sandra Ventorin Von Zeidler, Universidade Federal do Espírito Santo



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pois desde o ventre da minha mãe tem cuidado de mim, me iluminando, abrindo portas e colocando em meu caminho pessoas especiais, no qual contribuíram para a realização desta importante fase em minha vida.

Também agradeço aos meus pais, Joana dos Santos Trezena e Celso Luiz Trezena da Silva, pelo apoio, carinho e amor que me dedicaram a cada dia.

Agradeço ao meu irmão, Daniel dos Santos Trezena, por sempre ter sido um exemplo de dedicação e comprometimento com tudo o que faz.

Ao querido Willian Ramos Martins, que foi meu companheiro nos momentos mais difíceis, sempre me ajudando. Sou muito grata por todo este carinho.

À professora e orientadora Dra. Melissa de Freitas Cordeiro-Silva, por todo apoio e competência com que vem orientando desde a iniciação científica até aqui, no qual aprendi muito durante todos estes anos.

A professora Dra. Sandra Ventorin Von Zeidler e todos os colegas do Laboratório de Patologia Molecular/UFES, pela cooperação na realização dos experimentos.

À minha querida amiga Letícia Fonseca dos Santos, com quem posso contar em todos os momentos desde o início da faculdade. Com ela pude compartilhar todas as minhas alegrias e dificuldades no qual encontrei ao longo da caminhada.

A todos amigos da Missão Evangélica Praia da Costa, principalmente ao meu pastor Simonton Araújo por sempre ministrar palavras de ânimo, garra e coragem.

A todos os colegas de trabalho do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), principalmente a Audestina Patricia da Silva Costa e Robson de Azevedo Mendes, por sempre me apoiarem desde quando era apenas uma estagiária e mesmo sendo áreas tão distintas.

A todos que sempre estiveram torcendo por mim e me apoiando, e que contribuíram de uma forma direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.



## RESUMO

O carcinoma epidermóide oral (CEO) está associado a fatores ambientais como o tabagismo e consumo de álcool, porém fatores genéticos como polimorfismos em genes envolvidos na metabolização de xenobióticos podem interagir predispondo indivíduos a desenvolver CEO. O gene *CYP1A1* age na metabolização de carcinógenos presentes na fumaça do cigarro e o polimorfismo MspI neste gene produz o alelo T que pode estar relacionado a suscetibilidade genética a doença. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a relação entre o polimorfismo MspI e suscetibilidade ao CEO no Espírito Santo. O grupo amostral compreendeu 105 pacientes portadores de CEO e 70 indivíduos controles. A análise molecular foi realizada através da técnica PCR-RFLP em gel de agarose. As frequências genóticas encontradas no grupo de pacientes foram: 28,57% (C/C), 67,62% (C/T) e 3,81% (T/T). No grupo de controles foram: 61,43% (C/C), 38,57% (C/T) e 0% (T/T). As frequências alélicas no grupo de pacientes foram: 61,90% (C) e 38,10% (T). No grupo de controles foram: 80,71% (C) e 19,29% (T). A análise estatística demonstrou uma maior prevalência do alelo polimórfico no grupo de pacientes, sugerindo que este alelo pode conferir um aumento no risco para CEO. As frequências de distribuição dos genótipos entre casos e controles foram estatisticamente diferentes devido à alta frequência do alelo polimórfico em pacientes. Foi encontrada diferença significativa no consumo de tabaco e álcool entre os grupos, prevalecendo no grupo de pacientes, confirmando tais hábitos como fatores de risco ao CEO. Nas análises genótipo/fenótipo não se observou relação entre características clínico-patológicas e genótipos avaliados.

**Palavras-chave:** Câncer Oral. Gene *CYP1A1*. Polimorfismo gênico. Suscetibilidade genética.



## ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is associated with environmental factors such as smoking and alcohol consumption, but genetic factors as polymorphisms in genes involved in the metabolism of xenobiotics can interact predispose individuals to develop OSCC. The CYP1A1 gene acts in the metabolism of carcinogens present in cigarette smoke and the MspI polymorphism in this gene produces the T allele that may be related to genetic susceptibility to disease. Therefore, this study aimed to evaluate the relationship between the MspI polymorphism and susceptibility to the OSCC in the Espírito Santo State, Brazil. The sample group comprises 105 patients with OSCC and 70 control subjects. Molecular analysis was performed by PCR-RFLP technique in agarose gel. The genotype frequencies found in the group of patients were: 28.57% (C/C) 67.62% (C/T) and 3.81% (T/T). In the control group were 61.43% (C/C) 38.57% (C/T) and 0% (T/T). The allele frequencies in group of patients were: 61.90% (C) and 38.10% (T). In the control group were 80.71% (C) and 19.29% (T). Statistical analysis showed a higher prevalence of polymorphic allele in patients, suggesting that this allele can confer an increased risk for the OSCC. The frequency distribution of genotypes between cases and controls were statistically different due to the high frequency of polymorphic allele in patients. Significant differences were found in the consumption of tobacco and alcohol use among groups, prevailing in the group of patients, confirming such habits as risk factors to the OSCC. In the analyzes genotype/phenotype there was no relationship between clinical and pathological features and genotypes.

**Keywords:** Oral cancer. *CYP1A1* gene. Gene polymorphism. Genetic susceptibility.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Carcinoma epidermóide em duas localizações anatômicas (A – localizado no assoalho; B – na língua).....	28
Figura 02 - Lesões precursoras (A – leucoplasia; B – eritroplasia). ....	29
Figura 03 - Carcinoma epidermóide oral presente na região de úvula apresentando lesão ulcerada indolor e sangramento .....	30
Figura 04 - Inspeção realizada por um cirurgião dentista em um paciente durante uma exame clínico (A - lábio inferior; B - mucosa jugal; C - sulco gângivo-jugal; D - palato duro; E - palato mole; F – língua; G - assoalho bucal; H - dentes e da gengiva).....	32
Figura 05 - Esquema representando o Genoma do vírus HPV .....	43
Figura 06 - Hiperplasia causada por câmaras de sucção .....	48
Figura 07 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna da cavidade oral por 100 mil indivíduos do sexo masculino, estimadas para os anos de 2014 e 2015.....	52
Figura 08 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna da cavidade oral por 100 mil indivíduos do sexo feminino, estimadas para os anos de 2014 e 2015.....	52
Figura 09 - Distribuição dos dez principais cânceres entre o gênero masculino e feminino da população da região sudeste no Brasil, estimados para os anos de 2014 e 2015 .....	53
Figura 10 - Reações de fase I e II no metabolismo de xenobióticos .....	54
Figura 11 - Termociclador marca Applied Biosystems® utilizado no ensaio de PCR....	63
Figura 12 - Cuba horizontal e fonte elétrica utilizados na eletroforese.....	64
Figura 13 - Equipamento para banho-maria utilizado no ensaio de RFLP .....	64

Figura 14 - Resultados obtidos após a realização do ensaio de RFLP em amostras de pacientes. Destacado em vermelho tem-se um homozigoto normal (C/C), em branco um homozigoto polimórfico (T/T) e em amarelo um heterozigoto (C/T)..... 65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Distribuição entre tabagistas e etilistas dos 63 casos de CEO analisados no Estado de Minas Gerais no ano de 2011 .....	40
Tabela 02 - Distribuição do número e porcentagem de casos e controles, segundo características gênero e idade, tabagistas e etilistas .....	68
Tabela 03 - Frequência genotípica do polimorfismo <i>CYP1A1</i> .....	69
Tabela 04 - Frequência genotípica dos tabagistas.....	69
Tabela 05 - Frequência alélica do polimorfismo <i>CYP1A1</i> .....	70
Tabela 06 - Frequência alélica dos tabagistas .....	70
Tabela 07 - Análise do polimorfismo <i>CYP1A1</i> x características clinicopatológicas e epidemiológicas.....	72



## LISTA DE SIGLAS

CEO – Carcinoma Epidermóide Oral

HPV – *Human Papillomavirus*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

PAHs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

AHH – Aril Hidrocarbono Hidroxilase

UICC – União Internacional de Combate ao Câncer

RL – Radicais Livres

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

RFLP – *Restriction Fragment Length Polimorphism*



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	25
2.1 EPIDEMIOLOGIA .....	25
2.2 CARACTERIZAÇÃO DO CEO .....	26
2.3 SINTOMAS .....	28
2.4 DIAGNÓSTICO .....	31
2.5 CLASSIFICAÇÃO TNM .....	34
2.6 PROGNÓSTICO .....	36
2.7 TRATAMENTO .....	37
2.8 FATORES DE RISCO .....	39
<b>2.8.1 Fatores extrínsecos fortemente associados ao CEO</b> .....	40
2.8.1.1 Tabaco .....	40
2.8.1.2 Álcool .....	41
2.8.1.3 Infecção por HPV .....	42
<b>2.8.2 Fatores extrínsecos potencialmente associados ao CEO</b> .....	45
2.8.2.1 Dieta.....	45
2.8.2.2 Irritação Mecânica Crônica .....	47
2.8.2.3 Higienização Bucal .....	48
<b>2.8.3 Fatores intrínsecos</b> .....	50
2.8.3.1 Idade .....	50
2.8.3.2 Gênero .....	51
2.8.3.3 Suscetibilidade Genética .....	54
2.8.3.3.1 <i>Polimorfismos gênicos associados ao risco de CEO</i> .....	55
2.9 SUPERFAMÍLIA CYP .....	56
<b>2.9.1 Gene CYP1A1</b> .....	58
<b>2.9.2 Polimorfismo no gene CYP1A1 e o risco de CEO</b> .....	59
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	61
3.1 CASUÍSTICA .....	61
3.2 ANÁLISE DE DNA .....	61

<b>3.2.1 Extração de DNA das amostras</b> .....	61
<b>3.2.2 Rastreamento do Polimorfismo MspI do Gene <i>CYP1A1</i></b> .....	62
<b>3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	65
<b>4 RESULTADOS DISCUSSÃO</b> .....	67
4.1 AVALIAÇÃO DOS CASOS E CONTROLES EM RELAÇÃO AS CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	67
4.2 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE <i>CYP1A1</i> NA SUSCETIBILIDADE DO CEO: CASO x CONTROLE.....	68
4.3 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE <i>CYP1A1</i> COM O PROGNÓSTICO DOS PACIENTES E COM OS FATORES DE RISCO .....	72
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	75
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77
<b>ANEXO A</b> .....	87
<b>ANEXO B</b> .....	89

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer tem despertado uma grande preocupação nos responsáveis pela saúde pública devido ao aumento nas incidências em todo o mundo. O carcinoma epidermóide oral (CEO) é considerado um grave problema de saúde devido a sua elevada taxa de mortalidade, grande número de incidência mundial, além das graves deformações funcionais e estéticas que apresentam ao longo do tratamento desta doença (PARK et al., 1997). O CEO é o sexto motivo de morte causada pelo câncer em todo o mundo, onde o mesmo representa cerca de 90% das neoplasias orais (SILVERMAN, 2001; HUNTER; PARKINSON; HARRISON, 2005). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (2014, p. 41) “estimam-se, para o Brasil, no ano de 2014, 11.280 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres”.

Para o Estado do Espírito Santo, as estimativas referentes aos anos de 2014 e 2015 apontaram 290 novos casos em homens e 110 em mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014).

O CEO apresenta uma das menores taxas de sobrevida se comparado com os principais tipos de câncer. Apesar dos pacientes terem se beneficiado dos últimos avanços nos tratamentos como radioterapia, quimioterapia e técnicas cirúrgicas, a taxa de sobrevida é de somente 5 anos para aproximadamente 50-60% dos pacientes com CEO nos Estados Unidos da América (SILVERMAN, 2001). Segundo Oliveira e outros (2006), a taxa de sobrevida global em cinco anos é de apenas 24% para esse tipo de câncer.

O diagnóstico tardio é o principal motivo da alta taxa de mortalidade, pois quando o diagnóstico é feito em estágios avançados da doença, fase em que as possibilidades de cura estão muito reduzidas, os pacientes terão que passar por tratamentos debilitantes, levando a sua diminuição na qualidade de vida (DURAZZO et al., 2005).

O fumo de tabaco e/ou consumo excessivo de álcool são os fatores ambientais mais comumente associados ao desenvolvimento do CEO, atuando tanto independentemente quanto sinergicamente (HASHIBE et al., 2007). Em 2012 as estimativas do INCA apontaram o fumo como o maior responsável pelos óbitos dos pacientes com CEO, representando cerca de 42% dos óbitos, enquanto que o etilismo excessivo correspondeu a, aproximadamente, 16% dos óbitos. Estudos

ainda apontam que existe um sinergismo entre o fumo de tabaco e o consumo de bebida alcoólica, levando a um aumento de até 30 vezes no risco para o desenvolvimento deste câncer. (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012).

Além disso, existem outros cofatores que também podem contribuir para o risco do CEO, como poluição ambiental, condições de trabalho associados à exposição de substâncias químicas, nutrição e má higienização bucal (DROBROSSY apud COLOMBO; RAHAL, 2009). Recentemente, estudos têm demonstrado que a infecção pelo vírus HPV (*Human Papillomavirus*) também desempenha um papel na etiologia do CEO (CHOI, MYERS apud COLOMBO; RAHAL, 2009).

Apesar da exposição desses fatores ambientais de risco serem cruciais para o desenvolvimento da doença, apenas uma parte dos indivíduos expostos desenvolvem o câncer, pressupondo então, que a suscetibilidade genética esteja associada ao desenvolvimento de CEO juntamente com os carcinógenos ambientais (BOCCIA et al. apud COLOMBO, RAHAL, 2009).

Estudo sobre a relação entre as variações genéticas interindividuais e a capacidade de metabolização de xenobióticos (substâncias endógenas e exógenas que são estranhas a um organismo ou um sistema biológico) identificou inúmeros polimorfismos em genes codificadoras de enzimas que são responsáveis pelo processo metabolização de xenobióticos. Essas variantes genéticas afetam os níveis de expressão ou de atividade catalítica da enzima. (MACLEOD et al., 1997). Algumas enzimas polimórficas participam do processo de ativação ou inativação de xenobióticos, sendo que a sua insuficiência poderá gerar vantagem ou desvantagem na susceptibilidade de determinadas doenças (DALY et al., 1993).

Os polimorfismos gênicos são variações na sequência do DNA de um gene com frequência superior a 1% na população, sendo responsáveis pelas diversidades das características comuns nas populações humanas e pela suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças comuns, como por exemplo, o câncer (BROOKES, 1999).

O tabaco age através do hábito de fumar, onde ocorre a absorção de 4000 substâncias tóxicas e cerca de 60 elementos cancerígenos (MACKAY; ERIKSEN, 2002). A interação dos metabólitos provenientes dos agentes carcinogênicos com o DNA celular pode provocar alterações genéticas e epigenéticas suficientes para

iniciar o processo neoplásico (CANEVARI; ROGATTO, 2004).

O processo de biotransformação de xenobióticos ocorre em duas fases sendo elas a fase I (ativação), onde enzimas catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise, e a fase II (detoxificação), onde ocorre a atuação de enzimas que tornam os compostos mais solúveis em água, facilitando sua eliminação do organismo. A exposição à xenobióticos, como os carcinógenos provindos do tabaco, faz com que ocorra a expressão das enzimas metabolizadoras de drogas, tanto na fase I quanto na fase II (HAYES; PULFORD, 1995).

A maioria dos carcinógenos proveniente do tabaco, tais como as nitrosamidas e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), são convertidos em reativos eletrofílicos intermediários pelas enzimas oxidativas da Fase I, principalmente pelas enzimas da superfamília do citocromo P-450 (CYP). Se a metabolização do carcinógeno ocorrer de forma descoordenada, os intermediários podem se ligar covalentemente ao DNA atuando como agentes mutagênicos. Polimorfismos nestes genes podem alterar a expressão, função e/ou a atividade dessas enzimas e, por sua vez, aumentar o risco de câncer quimicamente induzido (BARTSCH et al., 2000).

A variabilidade interindividual na resposta aos xenobióticos e os seus efeitos carcinogênicos, é mediada pela predisposição herdada. Alguns indivíduos ou até mesmo subgrupos populacionais podem demonstrar um risco maior de desenvolver câncer do que a média populacional. Este fato se deve às diferenças nos processos de ativação e detoxificação de xenobióticos decorrentes de alterações gênicas herdadas (WORMHOUDT et al., 1999; CAPORASO, 1999).

Várias enzimas polimórficas da família CYP envolvidas na ativação de carcinógenos do tabaco tem sido examinadas com enfoque em sua associação com o potencial aumento do risco de desenvolvimento de câncer oral (SATO et al., 1999).

O gene *CYP1A1*, pertencente a CYP, codifica a enzima Aril Hidrocarbono Hidroxilase (AHH) na qual atua na fase I do metabolismo de carcinógenos do tabaco, ativando os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (MACIEL et al., 2005). Certos genótipos variantes do gene *CYP1A1* causam um aumento na atividade enzimática que parece ter um papel importante na susceptibilidade de formação de aductos, e presumivelmente, no risco de câncer. A mudança de um par de bases na

posição 264 localizada na região 3'-UTR (3'- não traduzida) do gene resulta na introdução de um sítio de restrição *MspI* resultando em polimorfismo no gene *CYP1A1* que está associado ao aumento da atividade enzimática e está ligado ao aumento de suscetibilidade de cânceres relacionados ao fumo de cigarro, como o câncer oral e de pulmão. O polimorfismo pode ser encontrado entre 5 a 30% das populações (NEBERT et al., 1996; KAO et al., 2002; BARTSCH et al., 2000).

Como o equilíbrio entre as enzimas que participam das fases I e II do metabolismo de xenobióticos pode ter influência no desenvolvimento do CEO, deve-se considerar a susceptibilidade genética na elaboração de modelos que estabeleçam perfis de risco populacional ou individual à exposição ambiental. Com base na capacidade que os indivíduos possuem de metabolizar carcinógenos (como os encontrados no cigarro) é possível identificar indivíduos que possuem maior suscetibilidade no desenvolvimento de CEO. Esta identificação é de suma importância, pois a identificação precoce dos indivíduos que são mais propensos a acumular mutações ao longo de suas vidas, auxiliará nas novas perspectivas para a prevenção e o diagnóstico precoce de tumores (GEISLER; OLSHAN, 2001; GATTÁS, 2001).

A busca de perfis genéticos que são suscetíveis ao desenvolvimento de certas anomalias é um novo e promissor campo de prevenção para a medicina (MOTA et al., 2010). Portanto, o conhecimento das frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos em genes metabolizadores de xenobióticos, como o tabaco, na população do Espírito Santo é de grande importância para o estabelecimento da frequência deste alelo na população, e poderá futuramente ser utilizado como biomarcador no auxílio à prevenção e detecção precoce do carcinoma epidermóide oral na população do Espírito Santo.

Considerando que o gene *CYP1A1* esteja envolvido na fase I (fase de ativação) do processo de biotransformação de xenobióticos (tabaco e álcool) e que a ocorrência de um polimorfismo pode afetar a metabolização destes compostos, pressupõe-se que o gene quando se encontra na forma polimórfica esteja relacionado com o risco de desenvolvimento de CEO, já que este está fortemente ligado ao consumo de tabaco e álcool.

Neste sentido, busca-se avaliar se a variante do gene *CYP1A1*, cujo produto enzimático atua na fase I do metabolismo de xenobióticos, influencia o risco de carcinoma epidermóide oral na população capixaba. Este trabalho também objetivou

determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo MspI no gene *CYP1A1* no ES e a associação do polimorfismo com a exposição aos fatores de risco (tabaco e álcool), e parâmetros clinicopatológicos dos pacientes, permitindo avaliar a possibilidade de utilizar a presença do polimorfismo MspI no gene *CYP1A1* como marcador genético associado à susceptibilidade ao CEO, ou ao prognóstico do paciente, no Espírito Santo, e ainda, buscou-se comparar as frequências gênicas detectadas com as descritas em outras populações, visando contribuir para um melhor conhecimento da estrutura populacional do Espírito Santo e elaboração de estratégias de prevenção.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer bucal tem se tornado uma grande preocupação mundial devido sua grande incidência e elevado número de óbitos. Cerca de 8 milhões de indivíduos são diagnosticados com câncer por ano em todo mundo, sendo que 300 mil destes cânceres localizam-se na boca. Dos tumores de boca, 95% são carcinomas epidermóide orais (CEO) e os 5% restantes compreendem os sarcomas, adenocarcinomas e linfomas (RUIZ et al., 2006; MONTORO et al., 2008).

Apesar da possibilidade da realização do auto-exame para a detecção do câncer bucal, a sua incidência ainda é elevada (FONSECA et al., 2005).

Em relação a sua incidência mundial, o câncer bucal se encontra em quinto lugar e a região que possui maior frequência é a Ásia, onde este tipo de câncer representa mais da metade dos indivíduos que são diagnosticados com câncer. Fatores que possam explicar a alta incidência dessa região é o hábito que a população possui de mascar uma planta típica da Índia chamada de bétela e também o fumo do tabaco (STUGIS, 2004; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2002).

Ao afirmar sobre a incidência do câncer oral no Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (2014, p. 41) diz “Estimam-se, para o Brasil, no ano de 2014, 11.280 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres.” Dentre as regiões brasileiras, o Sudeste e o Nordeste possuem a maior incidência de câncer bucal tanto para homens quanto para mulheres. Para o estado do Espírito Santo, as estimativas apontaram cerca de 400 novos casos de câncer bucal, sendo que 40 destes foram para a capital Vitória (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014).

Entre os anos de 1979 e 1998, o Instituto Nacional do Câncer (2002) definiu que a taxa de mortalidade para homens era de 2,16 para cada 100.000 indivíduos e 0,48 para 100.000 mulheres.

O Brasil possui uma alta incidência de câncer bucal e mortalidade por este tipo de câncer se comparado com países desenvolvidos, como os Estados Unidos e o Canadá. Essas variações geográficas podem estar relacionadas com os diferentes estilos de vida da população, no qual o grande consumo de álcool e/ou tabaco

aumentaria a incidência dessa doença (FARIA et al. apud CAMPOS; CHAGAS; MAGNA, 2007; CARVALHO et al, 2004).

Essa diferença de incidência entre diferentes grupos também pode ser observada entre homens e mulheres sendo que a maior incidência ocorre nos homens. Porém, nos últimos anos tem-se observado um aumento desta incidência nas mulheres, que pode ser explicado pela mudança de hábitos ocorrida neste grupo. Têm-se observado um maior número de tabagistas e etilistas entre as mulheres, que pode estar relacionado com este aumento de incidência (BRADLEY; RAGHAVAN, 2004).

Em relação à idade, o CEO afeta principalmente indivíduos com mais de 40 anos. Porém a doença também ocorre em jovens (SHIBOSKI; SCHMIDT; JORDAN, 2005).

Pelo fato do CEO se manifestar em indivíduos com idades avançadas, deve-se despertar uma maior preocupação em relação ao aumento da taxa de incidência e de mortalidade, pois com a melhora dos serviços prestados a saúde, a população vem envelhecendo mais, levando a um aumento na prevalência da doença. Com isto, deve-se emergencialmente adotar medidas para a prevenção desta doença e o diagnóstico precoce do mesmo (AUGUSTO, 2007).

## 2.2 CARACTERIZAÇÃO DO CEO

Câncer é uma doença que tem despertado grande preocupação, pois o mesmo tem afetado um grande número de indivíduos no mundo. Esta doença ocorre quando as células sofrem um crescimento de forma desordenada, podendo atingir estruturas próximas como até órgãos afastados (DIAS et al., 2005; ALVES et al., 2002).

No Brasil, o câncer bucal tem se destacado entre os diversos tipos de cânceres, pois a sua incidência é uma das mais elevadas no país (DIAS et al., 2005).

O câncer bucal é uma doença multifatorial, decorrente da combinação entre fatores de risco ambientais, como o tabaco e o álcool, que poderão afetar genes envolvidos nos mecanismos para o controle da multiplicação e do crescimento das células (LIMA et al., 2005). Também se acredita na influência de fatores genéticos herdáveis no surgimento do câncer bucal (CARVALHO; FAVA, 1989).

Em relação ao tipo histológico, o que mais se destaca é o carcinoma epidermóide oral (CEO) representando 90% dos tipos de câncer bucal (ALVES et al., 2002). Ao

definir CEO Johnson e outros (2005, p. 168) diz que se trata de “uma neoplasia epitelial escamosa invasiva, com diferentes graus de diferenciação e uma propensão a metástases precoces em gânglios linfáticos [...]”.

O motivo pelo qual se dá a elevada incidência de CEO é o fato do epitélio de revestimento ser a estrutura mais exposta à ação de agentes cancerígenos. Os agentes mais frequentemente envolvidos no aparecimento de neoplasia na cavidade oral são o alto consumo de tabaco e de bebidas alcoólicas (RAPOPORT apud MATEUS, 2008).

O CEO pode ocorrer em locais diferentes na cavidade oral e isto dependerá da forma com que os indivíduos fiquem expostos aos fatores de risco. Para indivíduos com hábito de fumar cachimbo o câncer comumente se desenvolve no palato duro. Aos que possuem o hábito de mascar fumo apresentam maior incidência de câncer no assoalho e na mucosa jugal. Já para os indivíduos alcoólatras e fumantes, as localizações mais comuns são gengiva inferior, assoalho (Figura 01, A) e língua (Figura 01, B) (DONATO et al., 2001).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (2002) o câncer se desenvolve em três etapas: a etapa de iniciação, de promoção e progressão. Na etapa de iniciação o carcinógeno interage com o DNA da célula provocando alteração. A célula alterada poderá sofrer eliminação pelo próprio organismo ou receber outros estímulos ocasionando novas alterações. A etapa de promoção ocorre após a lesão inicial, onde as células que ficaram expostas à agentes promotores irão manifestar efeitos carcinogênicos. Por último têm-se a etapa de progressão onde é estabelecido fenótipo maligno quando não se consegue mais controlar a divisão celular. Caso a agressão seja intensa e prolongada poderá ocorrer o surgimento de displasias que poderão evoluir de grau leve até intenso, levando até ao carcinoma epidermóide *in situ*. No que diz respeito às displasias têm-se a displasia leve (as células alteradas se encontram apenas na camada basal), a displasia moderada (as alterações atingem o terço médio do epitélio) e a displasia acentuada (as modificações podem atingir o terço superior do epitélio).

Figura 01 – Carcinoma epidermóide em duas localizações anatômicas (A – localizado no assoalho; B – na língua).



Fonte: Tucci, 2010

Em relação ao carcinoma epidermóide, sabe-se que o mesmo representa 90% das lesões malignas da cavidade oral conforme dito anteriormente. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (2002, p. 13) “No carcinoma epidermóide *in situ* as modificações celulares correspondem a uma exacerbação das características da displasia acentuada, acrescido de alterações na diferenciação, crescimento e proliferação celulares” [...].

As características clínicas apresentadas no CEO são mudanças na coloração da mucosa de rósea para avermelhada ou irritação dolorosa bucal. Nesta situação, ainda não houve o rompimento da camada basal do epitélio e o tumor é considerado inicial (HAYASSY, 1998).

Caso as células continuem se multiplicando, irá ocorrer o rompimento da membrana basal tendo assim o carcinoma invasor, que irá infiltrar o tecido conjuntivo vascularizado ocasionando a metástase (HAYASSY, 1998; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2002).

Além dos mecanismos citados acima que poderão contribuir para o desenvolvimento do CEO, existem também lesões denominadas de precursoras no qual contribuem para o surgimento desta doença. Segundo Barbosa (apud MENDES, 2000) existem lesões precursoras que não são diagnosticadas como malignas, mas poderão progredir e se tornarem câncer. Essas lesões podem ser classificadas como brancas e vermelhas. Dentro de lesões brancas tem-se a leucoplasia e das lesões vermelhas a eritroplasias (Figura 02). Estes na maioria das vezes se tornam carcinomas (DIAS

et al, 2005).

As leucoplasias são lesões brancas no qual não é possível ser removível por meio de raspagem e na maioria das vezes são indolores. A taxa de transformação de leucoplasia em uma lesão maligna ultrapassa 18%. Quando esta lesão for detectada o paciente deverá se afastar dos fatores que irritam a mucosa, pois os mesmos contribuem para o surgimento da lesão. Já as eritropplasias são lesões vermelhas e na maioria delas apresenta carcinoma *in situ*, displasia epitelial ou até mesmo carcinoma invasivo (DIAS et al, 2005; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 1996).

Figura 02 – Lesões precursoras (A – leucoplasia; B – eritroplasia).



Fonte: Nouel, 2001; Instituto Nacional do Câncer, 1996.

É de suma importância que se realize a detecção e a retirada dessas lesões, pois poderá reduzir significativamente a incidência de CEO (DIAS et al, 2005).

### 2.3 SINTOMAS

Um dos grandes problemas que se tem em relação ao CEO é o fato do mesmo ser assintomático em sua fase inicial, podendo levar até meses para apresentar sinais ou sintomas que poderiam ser percebidos pelo indivíduo. Muitas das vezes as displasias acabam passando despercebidas pelo próprio paciente, sentindo apenas uma ardência quando o mesmo se alimenta com comidas muito salgadas ou muito doces (CZERNINSKI; ZINI; SGAN-COHEN apud TORRES-PEREIRA et al. 2012; HAYSSY, 1998).

O surgimento de feridas na cavidade oral que não cicatrizam no período de sete dias é o principal sintoma de CEO. Os demais sintomas que surgem no CEO são ulcerações na superfície da cavidade oral que possui diâmetro menor que 2cm. Essas ulcerações são indolores e podem apresentar sangramento (Figura 03) ou não. Outros sintomas que surgem são manchas avermelhadas ou esbranquiçadas na mucosa oral. Em relação ao CEO em estágio avançado, os principais sintomas são dor, dificuldades na mastigação, na deglutição e na fala, e existência de linfadenomegalia cervical (nódulo no pescoço) (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2003).

Figura 03 – Carcinoma epidermóide oral presente na região de úvula apresentando lesão ulcerada indolor e sangramento.



Fonte: ALMEIDA et al., 2011

Ao falar sobre os sintomas do carcinoma invasivo, Kowalski (apud MENDES, 200, p. 30) diz:

[...] carcinoma invasivo se manifesta na forma de lesão ulcerada de crescimento progressivo e indolor no início. Outros sintomas só ocorrem bem depois da doença já instalada, quando são detectados invasões na musculatura e nos filetes nervosos, dando como sintomas a dor, sangramento, amolecimento dentário, halitose, trismo e emagrecimento. Geralmente a maioria dos pacientes apresentam uma lesão oral única.

Diante disto, Hayssy (1998) afirma que os cirurgiões dentistas e os médicos devem reconhecer lesões e alterações presentes na mucosa oral, no qual poderão

representar displasias. Esse reconhecimento é de suma importância, pois se o mesmo for realizado de forma precoce, contribuirá para a obtenção da cura do paciente.

## 2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico é de suma importância para que ocorra o sucesso terapêutico. Quando o CEO é diagnosticado precocemente, a realização do tratamento é facilitado e com menores complicações. Com isto, os resultados estéticos e funcionais (funções da boca e outros órgãos que foram afetados) se tornam melhores e ocorre aumento da sobrevida do paciente (VILAR; MARTINS, 2012).

Alguns fatores dificultam o diagnóstico precoce desta doença fazendo com que a maioria dos indivíduos sejam diagnosticados com CEO em estágio avançado, ou seja, com disseminação da neoplasia para outras localizações anatômicas (metástase) (VILAR; MARTINS, 2012). Uma delas é o fato desta anomalia ser assintomática durante a fase inicial fazendo com que muitos pacientes procurem por atendimento apenas com a apresentação de dor, um sintoma característico quando a doença já se encontra em estágio avançado (SILVESTRE et al. apud FROTA, 2011). Muitos desses indivíduos confundem a manifestação da doença com apenas uma lesão bucal do tipo benigna. (GUGGENHEIMER et al. apud MORAIS, 2003).

A falta de identificação das lesões iniciais pela maioria dos profissionais da área da saúde, principalmente pelos cirurgiões dentistas, também dificulta o diagnóstico precoce do CEO (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 1996). Estudos demonstram a importância da participação do cirurgião dentista na prevenção, diagnóstico precoce, orientação sobre os tratamentos e recuperação dos pacientes (BIAZEVIC et al., 2006). Porém, apesar da suma importância desses profissionais para a realização do diagnóstico precoce de CEO, tem-se visto que parte deles possui uma grande deficiência para reconhecer esta doença (FALCÃO et al., 2010).

O cirurgião dentista ou o médico deve ser capaz de realizar um exame clínico reconhecendo as lesões e modificações indicativas de displasias. (HAYASSY, 1998).

Em relação a importância da realização do exame clínico, o INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (2002, p. 35) diz que “[...] deve ser realizado em todos os indivíduos,

sobretudo nos considerados de risco para o câncer da boca, com a finalidade de se descobrir lesões precursoras do câncer ou lesões malignas em suas fases iniciais”.

O exame clínico deve ser realizado de forma minuciosa. É importante que haja inspeção nas seguintes regiões: lábios, mucosa jugal, sulco gângivo-jugal, palato duro, palato mole e a porção visível da orofaringe, língua, assoalho bucal, dentes e a gengiva (Figura 04). A inspeção é realizada por meio de palpação, onde busca-se alterações na cor, forma, textura, tamanho, brilho, consistência, entre outras anormalidades. Caso haja detecção de uma lesão de pequena dimensão, recomenda-se a realização de uma biópsia com orientação topográfica. Porém, se a lesão for maior, deve-se haver confirmação histológica por meio de biópsias ou através de pinça entre o tumor e a mucosa no qual aparentemente se encontra normal (VILAR; MARTINS, 2012; SOARES apud AUGUSTO, 2007).

Figura 4 – Inspeção realizada por um cirurgião dentista em um paciente durante um exame clínico (A - lábio inferior; B - mucosa jugal; C - sulco gângivo-jugal; D - palato duro; E - palato mole; F – língua; G - assoalho bucal; H - dentes e da gengiva).



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)



(F)



(G)



(H)

Fonte: Augusto, 2007

Além do fato da doença ser assintomática e a da dificuldade em que os profissionais da saúde possuem em detectar o CEO em estágio inicial, outro fator que contribui para o atraso do diagnóstico é a falta de informação sobre o risco de desenvolvimento de CEO na população (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 1996).

Para Alves e outros (2002), a população deve ser informada e conscientizada por meio dos profissionais da área de saúde, assim poderia alcançar avanços, tanto na detecção precoce de CEO como na sua prevenção.

Alguns autores defendem a ideia de que os pacientes deveriam ser instruídos para realizarem o auto-exame, com finalidade de identificar anomalias presentes na mucosa bucal, fazendo com que o paciente procure um cirurgião dentista. Isto poderia contribuir para um melhoramento no serviço e no prognóstico dos pacientes diagnosticados com CEO (COSTA; MIGLIORATI, 2001; AUGUSTO, 2007).

Segundo o Instituto Nacional Do Câncer (2002, p. 11), “o auto-exame da boca é um método simples, bastando para a sua realização um ambiente bem iluminado e um

espelho.”

Com auxílio das mãos, o indivíduo irá procurar alguma alteração na mucosa bucal, como feridas que permanecem por mais de 15 dias, úlceras menores que 2cm e que sejam indolores apresentando sangrando ou não, e manchas vermelhas ou brancas. (ALMEIDA et al. apud PRADO; PASSARELLI, 2009).

Apesar de alguns autores defenderem a utilização do auto-exame ou do exame clínico como um método preventivo, o Instituto Nacional do Câncer (2002, p. 11) afirma que “As atuais evidências científicas indicam que o rastreamento populacional para o câncer de boca por meio do auto-exame ou do exame clínico não reduz a mortalidade por este câncer.”

## 2.5 CLASSIFICAÇÃO TNM

A classificação TNM é utilizada na classificação dos tumores que sejam malignos e foi elaborada pelo francês Pierre Denoix entre os anos de 1943 e 1952. Essa classificação foi incorporada pela União Internacional de Combate ao Câncer (UICC) em 1950 e tem como objetivo unificar o diálogo entre os oncologistas e troca de experiência entre os mesmos (UNIÃO INTERNACIONAL DE COMBATE AO CÂNCER apud BRENER et al., 2007).

A classificação TNM avalia três aspectos: a extensão do tumor primário (T), a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais (N) e a ausência ou presença de metástase à distância (M). Para indicar a extensão que ocorreu no tumor maligno, os três aspectos são acompanhados por números conforme demonstrado no Quadro 01. Para tumores malignos da cavidade oral devem ser adotados os seguintes procedimentos para a avaliação: exame físico e diagnóstico por imagem (BRASIL, 2004).

Quadro 01 – Classificação TNM para carcinomas da cavidade oral de acordo com a UICC.

(Continua)

<b>T</b>	<b>Tumor primário</b>
Tx	Tumor Primário não pode ser avaliado
T0	Tumor primário não evidente
Tis	Carcinoma in situ

(Continuação)

<b>T</b>	<b>Tumor primário</b>
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
T4	T4a: Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face
	T4b: Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigóides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna
<b>N</b>	<b>Linfonodos Regionais</b>
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N1	Metástases em único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão
N2	N2a: Metástase em um único linfonodo homolateral com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão
	N2b: Metástases em linfonodos homolaterais múltiplos, onde nenhum tenha mais de 6 cm em sua maior extensão
	N2c: Metástases em linfonodos bilaterais ou contralaterais, onde nenhum ultrapasse 6 cm em sua maior dimensão
N3	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão
<b>M</b>	<b>Metástases à distância</b>
Mx	Metástases à distância não podem ser avaliadas
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Presença de metástases à distância

Fonte: adaptado do Brasil, 2004.

A partir da classificação TNM, os tumores malignos podem ser classificados por estádios clínicos sendo divididos em estádios de I à IV (Quadro 02). Essa divisão pode auxiliar o oncologista no planejamento do tratamento do paciente, dando indicações em relação ao prognóstico e contribuindo na avaliação dos resultados obtidos durante e após o tratamento (BRASIL, 2004).

Quadro 02 – Grupamento dos tumores malignos por estádios

<b>ESTÁDIOS</b>	<b>CLASSIFICAÇÃO TNM</b>		
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Estádio IV A	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Estádio IV B	Qualquer T	N3	M0
	T4b	Qualquer N	M0
Estádio IV C	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: adaptado do Brasil, 2004

## 2.6 PROGNÓSTICO

O prognóstico dos pacientes que são diagnosticados com CEO dependerá de diversos fatores. Um desses fatores é o longo período que se tem entre o surgimento do tumor e o diagnóstico para posteriormente realizar o tratamento (COSTA et al., 2002).

Esse longo período entre o surgimento da doença e o diagnóstico faz com que uma lesão maligna possua pouca chance de ser curada, diferentemente se fosse diagnosticada precocemente (COSTA; MIGLIORATI, 2001).

Segundo os registros realizados nos hospitais brasileiros, cerca de 50% dos pacientes chegam aos hospitais portando CEO em estágio avançado, levando, assim, o indivíduo a passar por tratamentos prolongados e com prognósticos desfavoráveis. Dentre os paciente que apresentam lesões em estágios avançados, cerca de 50%, chegam a sobreviver até 5 anos. Porém, para pacientes diagnosticados precocemente a sobrevida aumentou em 20%. (SCULLY; PORTER apud FALCÃO et al., 2010; SCOTT; GRUNFELD; MCGURK, 2005)

O tratamento para o CEO também é um fator que contribui para o prognóstico desfavorável. O tratamento inclui radioterapia e, em casos de estágios avançados, quimioterapia. Tanto a radioterapia quanto a quimioterapia são formas de tratamento que são seguidos de grandes complicações, não só para a região bucal como também para o restante do organismo (COSTA; MIGLIORATI, 2001).

Apesar dos avanços para a realização do diagnóstico e do tratamento para CEO, os danos causados sobre a qualidade de vida e sobrevida dos indivíduos portadores da doença causam muitos impactos sobre os mesmos, sendo eles: dificuldades para mastigação e também para deglutição, muitas dores, perda da fala, deformidades estéticas e distúrbios psicológicos (MENDEZ et al. apud SOUZA, 2012).

Diante disto, Campos e outros (2007) concluíram que o prognóstico positivo para o paciente dependerá do diagnóstico e o tratamento precoce, assim, diminuindo a dor, mutilações, perda de algumas funções que levam a má qualidade de vida do indivíduo portador de CEO.

Outro fator que foi abordado por Andrade e Carvalho (1994) é a faixa etária no qual ocorre o desenvolvimento de CEO, mostrando que indivíduos que desenvolveram

CEO precocemente possuem um prognóstico pior caso a manifestação desta doença seja dada por exposição de carcinógenos de forma intensa na idade juvenil.

A classificação TNM também é de suma importância na determinação do prognóstico do paciente. Em relação ao tamanho do tumor, quanto maior o mesmo for, pior será o prognóstico. De acordo com Almeida e outros (2011), tumores classificados em T1 (até 2 cm) atuam biologicamente de forma mais favorável, onde 90% dos casos apresentam uma sobrevida maior que 5 anos. Por outro lado, tumores classificados em T4 (tumores invasivos) atuam de forma desfavorável no prognóstico do paciente, pois neste caso o tipo de tratamento requerido é agressivo.

A existência de metástases, tanto linfonodais quanto à distância, causam impacto sobre o prognóstico dos pacientes, desfavorecendo o mesmo. Em um trabalho realizado por Montoro e outros (2008), no qual avaliaram as variáveis que influenciam na sobrevida dos pacientes com CEO, os autores constataram uma queda de 60-70% para 30-50% na sobrevida dos pacientes com metástase linfonodal (N+) se comparados com aqueles que não possuem (N0). Em casos onde ocorreu o comprometimento de múltiplos linfonodos, a sobrevida dos pacientes diminui cerca de 50% comparado com os pacientes que apresentam um linfonodo afetado apenas.

## 2.7 TRATAMENTO

Após a confirmação do diagnóstico de CEO, o paciente irá procurar um especialista para realizar uma avaliação da doença e definir a melhor forma de tratamento para o seu caso (CARVALHO apud MENDES, 2000).

Em relação ao planejamento do tratamento do CEO, Mimura ([201-], p. 5) diz:

O tratamento do CEO e o planejamento do mesmo são baseados no tamanho da lesão, presença de linfonodos positivos e/ou metástases, condições de saúde do paciente e a classificação TNM (classificação dos Tumores Malignos). O planejamento envolve uma equipe multidisciplinar, incluindo médicos cirurgiões, radioterapeutas, oncologistas, dentistas, enfermeiros, fisioterapeutas, fonoaudiólogos, psicólogos entre outros. A equipe planeja o tratamento e deve se preparar para as complicações e sequelas advindas do mesmo.

Os métodos mais utilizados no tratamento de CEO são: cirurgia, radioterapia e, em alguns casos, a quimioterapia. Estes podem ser empregados de forma isolada ou associada (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2002).

Nos casos de diagnósticos precoces em que se detecta lesão maligna em fase inicial (menor que 2 cm), o tratamento escolhido será o cirúrgico no qual será suficiente para curar o paciente na maioria dos casos. Na cirurgia completa do CEO, realiza-se uma reconstrução imediata, permitindo grandes excisões e uma boa recuperação do paciente. Porém, as deformidades estéticas e funcionais são graves. (COSTA; MIGLIORATI, 2001; PARKER; RICE; CASCIATTO apud MENDES, 2000). Algumas das consequências causadas pela realização da cirurgia radical citadas por Parker, Rice e Casciatto (apud MENDES, 2000, p. 38) são: [...] “comprometimento total ou parcial da fala, pneumonia de aspiração, paralisia facial, parestesias e dor na dissecação radical”.

Nos casos de diagnósticos tardios, onde provavelmente poderá ter ocorrido extensão da lesão maligna, a radioterapia deverá ser incluída no tratamento como um complemento a cirurgia. Neste caso, a radioterapia poderá ser utilizado antes da cirurgia (quando as lesões apresentam um tamanho muito grande) ou após a cirurgia (lesões menores) (COSTA; MIGLIORATI, 2001). A radioterapia é um tipo de tratamento onde o agente terapêutico utilizado é a radiação ionizante que irá atuar no DNA fazendo com que provoque a morte das células afetadas ou retire sua capacidade de reprodução (NOVAES apud JHAM; FREIRE, 2006).

Uma das vantagens da utilização da radioterapia é a preservação da estrutura dos tecidos atingidos, porém as reações que se manifestam sobre a cavidade bucal são inúmeras resultando em uma elevada morbidade e diminuição na qualidade da vida do paciente (SPECHT, 2002).

Em relação aos problemas gerados pelo uso da radioterapia Jham e Freire (2006, p. 704) disseram que [...] “Dentre as complicações da radioterapia estão a mucosite, candidose, disgeusia, cárie por radiação, osteorradionecrose, necrose do tecido mole e xerostomia”. Com isso, é importante que os profissionais da área da saúde estejam cientes sobre essas complicações para que possam atuar com o objetivo de diminuir o sofrimento do paciente (JHAM; FREIRE, 2006).

Em relação a pacientes diagnosticados com CEO em estágio avançado, o

tratamento utilizado será a quimioterapia. A quimioterapia utiliza drogas anticoplásicas que tem como objetivo reduzir o tamanho do tumor para que possa utilizar a radioterapia ou cirurgia posteriormente. Dependendo da dose utilizada na quimioterapia, consegue-se destruir cerca de 20 a 99% de células tumorais. Porém este tipo de tratamento contribui para a piora do prognóstico dos pacientes (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 1996; PARKER; RICE; CASCIATTO apud MENDES, 2000).

Conforme visto, todas essas formas de tratamento para o CEO são acompanhadas de complicações severas, não somente para a região bucal como também para todo o organismo trazendo grandes complicações para o paciente (COSTA; MIGLIORATI, 2001).

## 2.8 FATORES DE RISCO

O CEO possui uma etiologia multifatorial onde ocorre o somatório de diversos fatores que contribuem para o desenvolvimento do mesmo (COSTA; MIGLIORATI, 2001).

Devido ao desenvolvimento tecnológico, muitas alterações foram ocorrendo na vida da população como a urbanização, o crescimento de indústrias e seus hábitos, expondo-os a muitos fatores de risco para desenvolverem câncer (COSTA; MIGLIORATI, 2001; DIAS et al., 2005).

Em relação aos fatores de risco, os mesmos podem ser divididos em intrínsecos (relacionados com o indivíduo) e extrínsecos (ambiental). Dentre os fatores intrínsecos têm-se idade, gênero e perfil genético, enquanto que nos extrínsecos têm-se fatores fortemente associados com CEO que são o tabagismo, alcoolismo e infecção por HPV, e fatores potencialmente associados como a dieta, a irritação mecânica crônica e a má-higiene bucal (ALVES et al, 2002; BIAZEVIC et al, 2006; DIAS et al., 2005; GARRIGA; GARCÍA, apud MOTA, 2009).

Dentre os fatores extrínsecos os principais são o uso do tabaco e o álcool podendo atuar isolados ou associados. Acredita-se que haja sinergismo - quando o tabaco e o álcool são consumidos juntos - o que acaba levando ao aumento da chance do desenvolvimento de CEO (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2002).

Em 2011, foi realizado um trabalho no Estado de Minas Gerais analisando 63 pacientes com CEO, no qual constatou-se que 77,8% deles eram fumantes e 60,3% etilistas (Tabela 01), mostrando assim que o tabaco e o álcool estão fortemente relacionados com o desenvolvimento de CEO (ALVES et al., 2011).

Tabela 01 – Distribuição entre tabagistas e etilistas dos 63 casos de CEO analisados no Estado de Minas Gerais no ano de 2011.

Características		Frequência	
		Absoluta	Percentual
<b>Tabagismo</b>	Fumante	49	77,8
	Não Fumante	14	22,2
<b>Etilismo</b>	Etilista	38	60,3
	Não Etilista	25	39,7

Fonte: adaptado do Alves et al., 2011

## 2.8.1 Fatores extrínsecos fortemente associados ao CEO

### 2.8.1.1 Tabaco

O tabaco é uma das substâncias com efeito carcinogênico que o próprio ser humano ingere no organismo de forma voluntária. O tabaco possui 4.000 substâncias tóxicas onde 60 destas são consideradas carcinógenos. Dentre eles têm-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e as nitrosaminas. Essas substâncias provocam o ressecamento da mucosa oral, levando ao aumentando da camada de queratina, facilitando, assim, a atuação de outros carcinógenos. Além disto, o próprio hábito de fumar contribui para o desenvolvimento de CEO pois a mucosa oral fica exposta às altas temperaturas ocasionando a agressão da mesma (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2002; SILVESTRE; JERONYMO, 2007).

O risco de desenvolvimento de CEO também vale para os que possuem o hábito de consumir o tabaco sem que haja combustão (fumo para mascar e rapé), pois as substâncias restantes que ficam na cavidade oral permanecem em contato com a mucosa por um período mais prolongado, fazendo com que as substâncias do tabaco atuem podendo ocasionar o surgimento de CEO (SILVESTRE; JERONYMO, 2007).

O hábito de fumar e/ou mascar tabaco pode promover reações oxidativas sobre os

tecidos, que ocasionará o início de reações que produzirão radicais livres. A existência de oxigênio reativo poderá levar a um dano ao DNA e por menor que seja o dano causado, o DNA poderá sofrer mutagênese e, dependendo da região do genoma afetada, a célula poderá sofrer uma modificação no seu ciclo celular levando à carcinogênese (SILVESTRE; JERONYMO, 2007).

Em relação à quantidade e ao tipo de tabaco consumido, o Instituto Nacional do Câncer (2002, p. 17) diz que “Dependendo do tipo e da quantidade do tabaco usado, os tabagistas apresentam uma probabilidade 4 a 15 vezes maior de desenvolver câncer da boca do que os não-tabagistas”.

Com isto, conclui-se que são necessárias medidas para que haja a diminuição do consumo do tabaco e conseqüentemente a redução da incidência de CEO. Estes programas poderão ser o aumento dos impostos gerados nos cigarros, conscientização dos consumidores, impedimento de propagandas, proibição dos indivíduos fumarem em locais públicos e um incentivo aos fumantes abandonarem o hábito de fumar (FREITAS et al, 2010).

#### 2.8.1.2 Álcool

O álcool é considerado o segundo fator causador do câncer de boca principalmente de língua e assoalho bucal. O álcool é considerado uma droga lícita, porém o mesmo vem causando sérios problemas para a saúde pública, não somente para o desenvolvimento de CEO, mas como também para o convívio social e também familiar (GIGLIOTTI et al, 2008).

O consumo de álcool aumenta 9 vezes a chance de desenvolvimento de CEO. Quando o mesmo está associado ao tabaco, esse risco aumenta e torna-se 35 vezes maior. Ao consumo exagerado de álcool atribui-se cerca de 2 a 4% das mortes devido ao câncer e destes, cerca de 50 a 70% são cânceres de cavidade oral, língua, esôfago e faringe (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2002).

A atuação do álcool no desenvolvimento de CEO ainda não é certa, mas sabe-se que o mesmo altera a permeabilidade da mucosa oral, facilitando então a penetração das substâncias carcinógenas, principalmente as do fumo. Outra forma de atuação do álcool seria o impedimento da formação de uma barreira impermeável (composta por lipídios) produzida pelas células epiteliais. Essa barreira possui

função de impedir a desidratação da mucosa oral e penetração de agentes externos (CARRARD et al, 2008).

Em relação as bebidas fermentadas (cerveja e o vinho por exemplo) o risco de desenvolver CEO é maior do que os destilados, como o whisky por exemplo. Contudo, mais importante é levar em conta a quantidade de álcool ingerido e a duração do hábito que o tipo de bebida consumida (CARRARD et al, 2008).

Pacientes etilistas não possuem bom prognóstico de câncer de cabeça e pescoço, pois o álcool afeta também o sistema imunológico diminuindo o número e função das células de defesa. Soma-se a isso, o fato de o etilista se alimentar mal devido ao alto teor calórico do álcool potencializando o estado de imunossupressão (CARRARD et al., 2008).

#### 2.8.1.3 Infecção por HPV

O HPV (*Human Papillomavirus*) é um vírus de pequena dimensão (cerca de 50 nm de diâmetro) e possui replicação intracelular. Até os dias atuais foram verificados diferentes tipos de HPVs, sendo que a presença dos subtipos 1, 2, 4, 6, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32 e 57 já foi detectada na mucosa da cavidade oral apresentando lesões semelhantes as que são encontradas na região do trato genital (SARRUF; DIAS, 1997; KELLOKOSKI et al. apud XAVIER; BUSSOLOTI; LANCELOTTI, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Alguns estudos têm demonstrado a existência do HPV em determinadas lesões pré-malignas da mucosa oral suspeitando, assim, a participação do mesmo no surgimento destas doenças. As estimativas ainda apontam que a detecção de HPV é de 2 a 3 vezes maior em lesões pré-malignas e de 4,7 vezes maior em CEO se for comparado com mucosa oral normal (MILLER; JOHNSTONE apud SOUZA 2012).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (2002) existem dois subtipos de HPV que estão sendo relacionados com modificações neoplásicas ocorridas no epitélio escamoso oral: o tipo 16 e 18. Estudos na Índia tem demonstrado que ocorre uma alta incidência de HPV nos tecidos tumorais da mucosa oral como também na mucosa adjacente ao tumor que não apresenta neoplasia.

Em um estudo realizado por Uobe e outros (apud RIBEIRO, 2013) foi analisado a

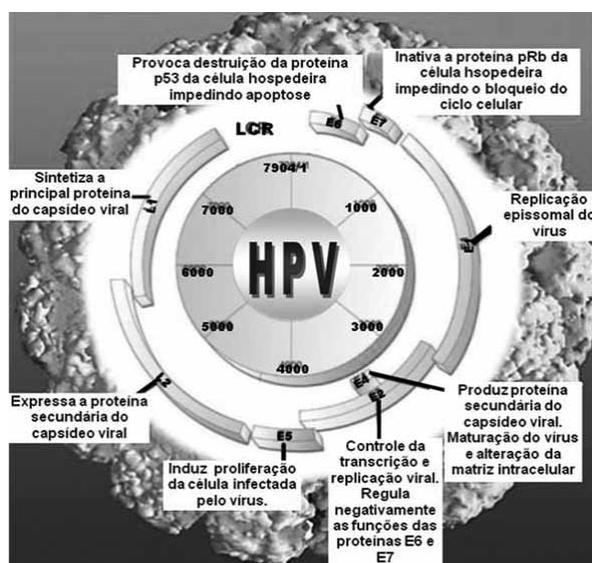
prevalência do HPV em CEO da população chinesa e japonesa, onde os resultados detectaram o HPV tanto nas células epiteliais quanto nas tumorais das lesões nas duas populações. Diante disso, os autores afirmaram que a infecção por HPV pode contribuir para o desenvolvimento de CEO.

Ao falar sobre a atuação do HPV no desenvolvimento de CEO, Neville (et al. apud RIBEIRO, 2013) afirmou que o vírus possui a capacidade de regular o crescimento celular como também a multiplicação das células que foram infectadas, propiciando a transformação maligna.

O material genético do HPV (Figura 5) possui seis genes no qual se expressam precocemente, ou seja, logo após a infecção (early [E]), e dois se expressam tardiamente em estágios posteriores a infecção (late [L]) (GANGULY; PARIHAR, 2009).

Existem duas oncoproteínas do HPV: a E6 e a E7. A oncoproteína E6 possui a capacidade de induzir e manter a modificação da célula hospedeira. Além disso, foi verificado que a mesma atua como ligante da p53 (proteína que impede a disseminação das células que estejam geneticamente defeituosas) causando sua deterioração, no qual irá provocar prejuízos ao DNA e instabilidade cromossômica. Caso ocorra o aumento da expressão da E6, os danos causados a célula hospedeira são: propagação celular, immortalização da célula infectada, replicação do DNA no qual apresenta danos e acumulação de mutações (GANGULY; PARIHAR, 2009).

Figura 05 – Esquema representando o Genoma do vírus HPV.



Fonte: FERRARO et al., 2011

A oncoproteína E7 causa a proliferação das células infectadas de forma descontrolada. Esse dano se dá pelo fato do mesmo se ligar à pRb (proteína envolvida no controle do ciclo celular) inativando, assim, sua função. no caso da elevada expressão da oncoproteína E7, perde-se o controle da passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular onde, conseqüentemente, as células sofrem uma proliferação de forma descontrolada (GANGULY; PARIHAR, 2009).

Dois subtipos de HPV foram detectados em lesões benignas e pré-malignas, sendo eles os subtipos 6 e 11. Porém, os mesmos foram dificilmente detectados em lesões neoplásicas da cavidade bucal (SNIJDERS et al. apud XAVIER; BUSSOLOTI; LANCELOTI; 2005).

Atualmente tem-se verificado uma alta incidência de CEO relacionado com HPV entre jovens e não fumantes tanto do sexo masculino quanto do sexo feminino. Esse fato se deve à mudança ocorrida no comportamento sexual dos mesmos. Alguns estudos tem verificado a contribuição da prática do sexo oral para a infecção do HPV na mucosa bucal. Os resultados demonstraram que a maioria das lesões com HPV ocorriam em indivíduos que admitiram praticar relação sexual oral-genital e oral-anal com seu parceiro ou até mais de um parceiro (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012; VIDAL et al. 2005).

Apesar das presenças de HPV serem detectadas em lesões malignas, estudos apontam que apenas a presença do mesmo não determina a obrigatoriedade do desenvolvimento de CEO, sendo que a maior parte das infecções não são persistentes e sim transitórias (RAGIN; MODUGNO; GOLLIN apud SOUZA, 2012).

Para os autores Pannone, Santoro e Papagerakis (apud SOUZA, 2012) ocorre sinergismo entre o HPV considerado de alto risco com a ingestão de álcool, mas o mesmo não acontece em relação ao consumo de tabaco. Os mesmos autores também afirmam que pacientes com CEO relacionados com HPV apresentam maior sobrevida e uma baixa taxa de reincidência. Para esses casos, os tratamentos escolhidos são: remoção cirúrgica juntamente com a radio-quimioterapia ou somente a radio-quimioterapia.

Em relação à prevenção do HPV na mucosa bucal, ainda são poucas as recomendações para a realização do mesmo. A única orientação que se tem no momento é a prática de sexo oral utilizando preservativos como proteção (TORRES-

PEREIRA et al., 2012).

## **2.8.2 Fatores extrínsecos potencialmente associados ao CEO**

### **2.8.2.1 Dieta**

A dieta tem demonstrado que atua no risco de desenvolvimento de CEO de forma positiva ou negativa. Muitos alimentos como frutas e verduras, por exemplo, atuam como protetores reduzindo assim o risco de CEO enquanto que alimentos que possuem origem animal, como a carne e a gordura, atuam no aumento do risco de desenvolver CEO (PETTI, 2009 apud TORRES-PEREIRA et al., 2012).

Muitos estudos têm revelado que a falta de determinados nutrientes (como os antioxidantes) e dietas inapropriadas tem sido fonte de radicais livres (RL). Esses, porém, demonstram que podem estar relacionados com alterações no DNA, fazendo com que o indivíduo se torne mais suscetível para CEO (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2002).

Em relação a exposição à oxidantes e a ação de RL, o Instituto Nacional do Câncer (2002, p. 19) diz:

De todo o oxigênio de que dispomos, 5% é transformado em RL. Numerosos estudos demonstram que a exposição a oxidantes, seja diretamente, seja por meio de processos celulares, pode levar à mutação, transformação ou ativação de oncogenes específicos. A ação dos RL no ADN pode ser direta ou através da promoção da ligação com agentes carcinogênicos. Além disto, os geradores de RL são também considerados fatores de progressão do tumor.

Além disto, estudos constataram que dieta baseada em ferro, gordura e álcool, sendo também carente em determinados micronutrientes, como as vitaminas (A, E, C, B2) e os minerais (como o cálcio e o selênio por exemplo), têm sido consideradas como um grande fator para o risco de CEO. Também foi verificado que ocorre um baixo risco de CEO nos indivíduos consumidores de elevadas quantidades de vegetais ricos em betacaroteno (precursor da vitamina A) e frutas cítricas. Os alimentos ricos em betacaroteno são: mamão, couve, cenoura, abóbora, espinafre e batata doce (SOARES, 2005 apud AUGUSTO, 2007). Em relação a vitamina A, tem-se evidenciado que o mesmo protege a cavidade oral, a faringe, a laringe e o

pulmão, do risco de câncer (PRADO; PASSARELLI, 2009).

Esses micronutrientes são de suma importância, pois os mesmos atuam como antioxidante. Além disto, Zain (apud LEITE; GUERRA; MELO, 2005, p. 32) cita outras atividades que esses micronutrientes exercem, tais como: “[...] modulação do metabolismo carcinogênico, alteração da transformação e diferenciação celular, inibição da proliferação celular, expressão oncogênica e da formação endógena de carcinogênicos, e função imune”.

Em relação a vitamina C, o Instituto Nacional do Câncer (2002) afirma que portadores de câncer apresentam uma queda na taxa desta vitamina, sendo que o mesmo é de suma importância para o sistema imunológico. Com isto, deve-se consumir vitamina C para ocorrer o aumento da defesa imunológica. O Instituto Nacional do Câncer também afirma que o selênio é um forte antioxidante, podendo atuar isoladamente ou de forma associada com a vitamina E.

Nos países ocidentais, foi verificado que a dieta está relacionada em cerca de 30% dos casos de cânceres, devido ao elevado consumo de carne e/ou gordura, e açúcar. Já em países em desenvolvimento foi verificado que a dieta possui uma menor contribuição para o risco de desenvolver câncer (cerca de 20%), onde a alimentação é baseada em poucos tipos de alimentos, e o consumo de carne, gordura e açúcar é baixo (KEY et al., 2002).

No Brasil, Toporcov, Antunes e Tavares (apud LEITE; GUERRA; MELO, 2005) avaliaram a dieta de 140 pacientes e a sua relação com o risco de CEO, no qual demonstrou que existe uma alta relação entre alimentos que possuam gordura e o risco de desenvolvimento de CEO. Em relação à ingestão de maçãs, chá de ervas e frutas cítricas, foi verificado que os mesmos estão relacionados com a prevenção de CEO.

Outro estudo realizado no Brasil avaliou a dieta de 845 indivíduos do município de São Paulo, no qual demonstrou que o feijão (leguminosa tradicional na alimentação da população brasileira) é um fator de proteção para o CEO. O consumo de leguminosas é recomendado, pois tem sido demonstrado que o mesmo contribui para a diminuição do risco dos indivíduos desenvolverem doenças crônicas que não sejam transmissíveis (MARCHIONI et al., 2007).

A alimentação da população brasileira tem sido motivo de preocupação devido à

alteração no hábito alimentar ocorrido nos últimos tempos. A grande correria do dia-a-dia em que muitos indivíduos estão sendo submetidos faz com que a maioria não consiga ter uma dieta saudável. Diante disso, muitos indivíduos procuram alimentos denominados fast-food (palavra do inglês que significa comida rápida). Este tipo de alimento possui uma alta quantidade de açúcares, gordura, sal, e escasso teor de vitaminas. Porém, esta alimentação está relacionada com diversos problemas sistêmicos como, por exemplo, nível de colesterol alto, diabetes, doenças cardiovasculares e diversos cânceres incluindo o CEO (PRADO; PASSARELLI, 2009).

Portanto, para a prevenção de CEO recomenda-se uma dieta baseada em frutas, legumes, verduras e cereais, pois os mesmos estão relacionados com a menor incidência de diversos cânceres com origem no epitélio de revestimento, como o CEO por exemplo. Em relação a carnes, tanto as brancas quanto as vermelhas devem ser consumidas cozidas ou grelhadas, evitando sempre consumi-las na forma frita. Além disso, também deve ser evitado o consumo de álcool e tabaco (PRADO; PASSARELLI, 2009; KEY et al., 2002).

#### 2.8.2.2 Irritação Mecânica Crônica

Poucos estudos afirmam que a irritação mecânica crônica seja um fator de risco para CEO, mas tem se discutido que ocorrências irritativas de pouca intensidade e de longa ação possam favorecer o surgimento do CEO (MENDES, 2000).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (2002) a constante atividade de próteses dentária que se encontram mal ajustadas, de câmaras de sucção (recurso usado por cirurgiões-dentistas para obtenção de uma melhor fixação de dentaduras) e dentes quebrados por um longo período, provocam lesões hiperplásicas (Figura 6). A ação de forma constante dessas atividades podem ser cofatores para o desenvolvimento de CEO, pois os mesmos favorecem a atuação de outros carcinógenos, como por exemplo, o tabaco e o álcool.

Em relação as lesões provocadas têm-se a hiperplasia fibrosa traumática, sendo esta considerada benigna. Com o tempo essas lesões poderão ulcerar causando dor e desconforto para o indivíduo. Em casos de lesões pequenas, as mesmas poderão regredir caso ocorra o ajuste da prótese que se encontrava mal ajustada. Porém, as

lesões maiores poderão evoluir para tumores malignos. Diante disto, é de suma importância que os pacientes que possuem prótese dentária façam visitas aos cirurgiões-dentistas regularmente (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2002).

Figura 06 – Hiperplasia causada por câmaras de sucção.



Fonte: Brites, 2012

### 2.8.2.3 Higienização Bucal

Alguns estudos têm demonstrado que a má higienização oral pode ser considerada um cofator para o desenvolvimento de CEO como o estudo realizado por Maier (et al., 1993). Nesse estudo foram analisados 100 pacientes e 214 controles, onde constatou-se que a higiene bucal e as condições dos dentes foram significativamente desfavoráveis nos casos. Isso se deve ao pouco ou até mesmo nenhum hábito que a maioria dos portadores de CEO possuíam de escovarem os dentes. Também foi verificado que a ocorrência de dentes deteriorados e de inflamações crônicas na gengiva neste grupo foi maior se comparado aos que não possuíam essa doença. Nesse estudo também constatou-se que a relação entre a higiene oral mais o consumo de tabaco e álcool foi positiva para o risco de CEO.

As inflamações crônicas provocam sangramento e isto faz com que indivíduos que sofram desse mal escovem menos os dentes devido ao sangramento que ocorre durante a escovação (MARQUES et al., 2008).

Um outro estudo realizado na China foram analisados 404 casos e 404 controles. Ao comparar pacientes que sofreram perda de 15 a 32 dentes com aqueles que perderam nenhum dente, constatou-se que os resultados foram estatisticamente significativos tanto em homens quanto em mulheres. No mesmo constatou-se que o risco de CEO foi maior em pacientes que afirmaram que não escovavam os dentes. Diante disso, o autor concluiu que as condições da saúde oral e a dentição precária (demonstrada através da quantidade de dentes no qual foram perdidos), são fortes fatores de risco para o câncer oral (ZHENG et al., 1990).

No Brasil, os estudos realizados pelos autores Reis (et al., 1997) e Franco (et al. 2002) apontam que a escovação dental realizada com pouca frequência, dentição precária e consultas irregulares ao dentista são fatores que aumentam o risco de desenvolver CEO.

Outro estudo realizado no Brasil, Marques e outros (2008) constataram que indivíduos que não possuíam hábito de escovar os dentes e que não iam a consultas odontológicas possuíam um maior risco de desenvolverem CEO se comparados com os que possuíam a prática de escovarem os dentes de 3 a mais vezes ao dia e que frequentavam regularmente a consultas odontológicas. Este cuidado com a higiene bucal auxilia na eliminação de agentes cancerígenos ou evita que a mucosa bucal fique exposta a esses carcinógenos.

O mesmo estudo também avaliou a associação do uso de antissépticos com o CEO e verificou-se que o risco era 3 vezes maior em pessoas que usavam antissépticos frequentemente que entre indivíduos que nunca utilizaram. Algumas marcas de antissépticos possuem álcool em sua composição atuando como solvente. Alguns desses antissépticos possuem cerca de 27% de álcool no qual ficarão em contato com a mucosa bucal e poderá causar agressão química das células, assim como as bebidas alcoólicas (MARQUES et al., 2008).

### 2.8.3 Fatores intrínsecos

#### 2.8.3.1 Idade

A qualidade de vida da população brasileira tem aumentado devido ao desenvolvimento econômico no país e, com isto, prolongou-se a idade dos indivíduos provocando, assim, o aumento da população com idades mais avançadas (COSTA; MIGLIORATI, 2001).

Alguns fatores contribuem para a longevidade da população como a melhora das condições ambientais e da vida pessoal dos indivíduos (alimentação e o acesso à saúde) (PERUSSI et al., 2002).

Porém, o aumento da expectativa de vida da população tem trazido não somente benefícios como também algumas consequências. Uma dessas consequências é o elevado índice de doenças crônicas como, por exemplo, o câncer que está relacionado com o envelhecimento das células (COSTA; MIGLIORATI, 2001; PERUSSI et al., 2002).

O câncer é uma doença que de uma forma geral ocorre em indivíduos que possuem idades avançadas. O CEO não foge a esta regra, onde a realidade epidemiológica demonstra que a maioria dos pacientes portadores de CEO apresenta idade superior a 40 anos (COSTA; MIGLIORATI, 2001; SILVERMAN, 2001).

Acredita-se que o fator tempo esteja relacionado com o desenvolvimento de CEO, onde ocorram mudanças bioquímicas em células que estejam em fase de envelhecimento e também na resposta dessas células à irritação crônica. Além disto, com o decorrer do tempo os agentes carcinogênicos relacionados com o aumento do desenvolvimento de CEO irão provocando e acumulando alterações gênicas nas células do epitélio afetado (SILVERMAN, 2001; CLARK; ROSEN; LAPERRIERE, 1982 apud ALMEIDA et al., 2011).

Segundo Brunett e Montenegro (2000, apud REZENDE et al., 2008) o epitélio que reveste a cavidade oral passa a sofrer alterações com o decorrer dos anos, no qual se tornam mais finos, com menos elasticidade e passando a se tornar atrófico. Outra alteração que ocorre é em relação ao sistema imune local onde acaba ocorrendo o aumento do risco para infecção e trauma, tornando a cavidade oral um local propício

para doenças inflamatórias ulcerativas e tumores.

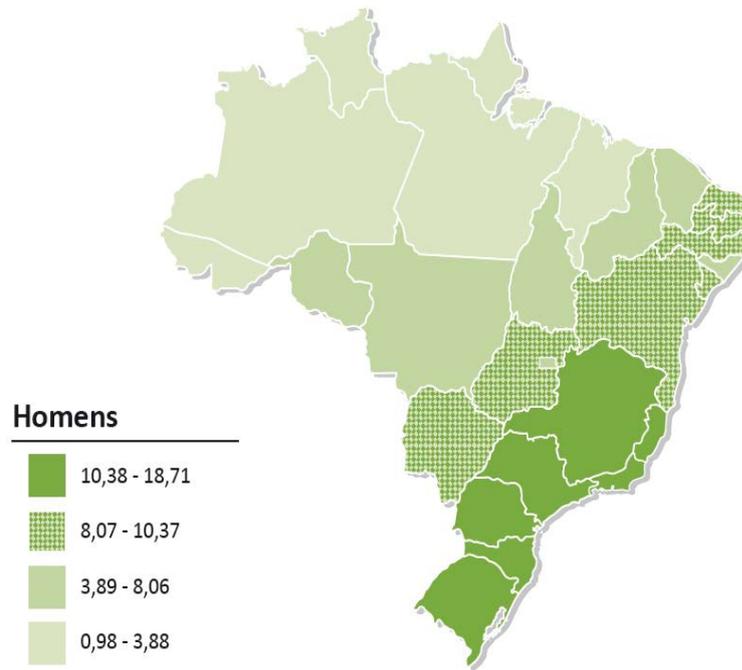
Apesar do alto índice de pacientes portadores de CEO com idade acima de 40, tem-se observado um aumento na taxa de incidência no grupo de indivíduos mais jovens em diversos países. Porém, ainda não se conhece os mecanismos relacionados ao desenvolvimento de CEO neste grupo de pacientes (IAMAROON et al. apud RUIZ et al. 2006; LLEWELLYN et al. apud RUIZ et al., 2006).

#### 2.8.3.2 Gênero

O CEO é mais frequente no grupo do gênero masculino. De acordo com as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (2014, p. 41) referentes aos anos de 2014 e 2015 seriam [...] “11.280 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres”.

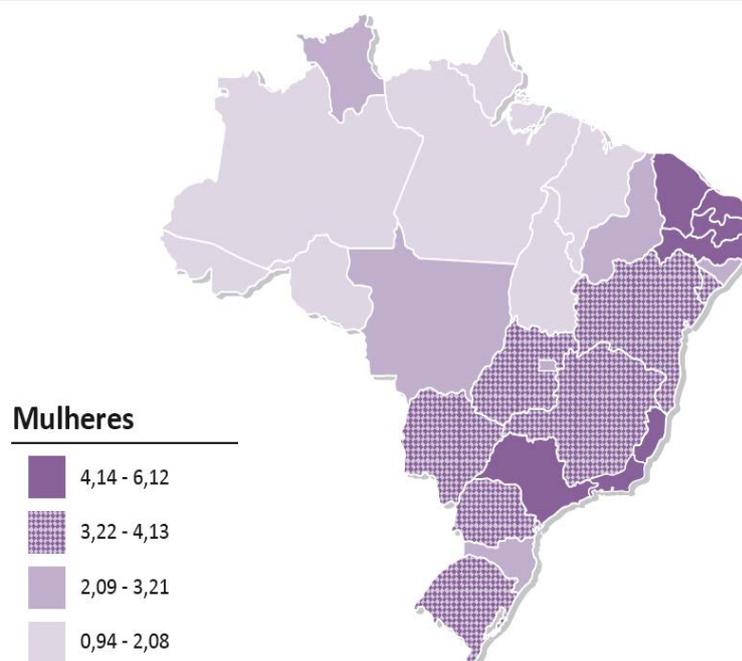
O Instituto Nacional do Câncer (2014) também mostrou os Estados brasileiros que possuem um maior índice de casos da patologia entre os homens e entre as mulheres (Figuras 7 e 8). Os Estados que possuem maior índice entre os homens são Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo. Para as mulheres, os Estados que apresentaram maior índice foram Ceará, Espírito Santo, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte e São Paulo. Vale ressaltar que o Espírito Santo esteve entre os estados com os maiores índices para ambos os sexos.

Figura 7 – Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna da cavidade oral por 100 mil indivíduos do sexo masculino, estimadas para os anos de 2014 e 2015.



Fonte: Instituto Nacional do Câncer, 2014

Figura 8 – Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna da cavidade oral por 100 mil indivíduos do sexo feminino, estimadas para os anos de 2014 e 2015.



Fonte: Instituto Nacional Do Câncer, 2014

Para a região Sudeste (região brasileira onde se situa o Estado do Espírito Santo) o CEO é o quarto tipo de câncer mais frequente no gênero masculino e o nono mais frequente no gênero feminino (Figura 9). Lembrando que esses dados não consideram os tumores de pele do tipo não melanoma (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014).

Acredita-se que a diferença hormonal existente entre os diferentes gêneros esteja relacionada com o desenvolvimento de CEO, pois se sabe da interferência que os hormônios possuem no crescimento de determinados tipos de tumores. Porém, o principal fator que diferencia os grupos são os hábitos de vida, onde a maioria dos tabagistas e etilistas são do gênero masculino (BRASIL apud MARZOLA et al., 2006).

Figura 9 – Distribuição dos dez principais cânceres entre o gênero masculino e feminino da população da região sudeste no Brasil, estimados para os anos de 2014 e 2015.

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	35.980	22,9%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	30.740	21,5%
Cólon e Reto	9.270	5,9%			Cólon e Reto	10.590	7,4%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	7.580	4,8%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	4.960	3,5%
Cavidade Oral	6.320	4,0%			Colo do Útero	4.370	3,1%
Estômago	6.130	3,9%			Estômago	3.540	2,5%
Bexiga	4.090	2,6%			Glândula Tireoide	3.410	2,4%
Esôfago	3.860	2,5%			Corpo do Útero	3.280	2,3%
Laringe	3.750	2,4%			Ovário	2.840	2,0%
Linfoma não Hodgkin	2.540	1,6%			Linfoma não Hodgkin	2.790	2,0%
Leucemias	2.210	1,4%			Cavidade Oral	2.110	1,5%

Fonte: Instituto Nacional Do Câncer, 2014

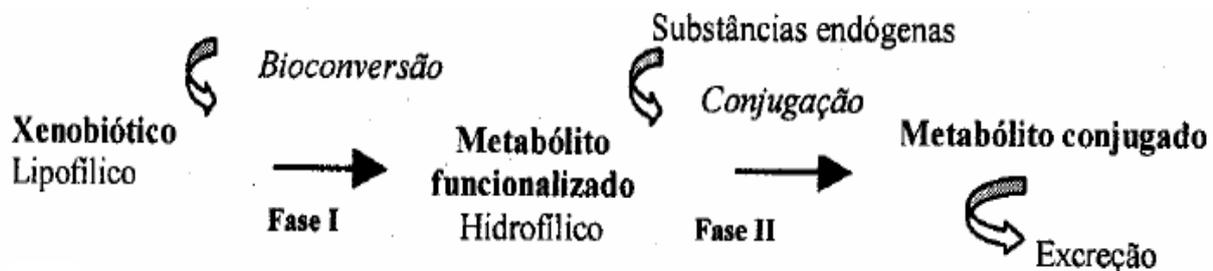
Apesar da incidência de CEO ser maior entre os homens do que entre as mulheres, tem-se visto que nos últimos anos houve um crescimento de CEO no sexo feminino diminuindo a razão homem:mulher. Isto se explica devido à mudança no hábito de vida que ocorreu nas mulheres, no qual as tornaram mais expostas ao tabaco e álcool (AMORIM, 2003 apud BRENER et al., 2007).

### 2.8.3.3 Suscetibilidade Genética

Conforme visto neste trabalho, um dos maiores riscos para o desenvolvimento do CEO são o tabaco e o álcool. As substâncias exógenas presentes no organismo (chamados de xenobióticos), principalmente as provenientes do tabaco, passam por uma biotransformação. Esta, porém, é realizada em duas fases: fase I (ativação) e fase II (detoxificação) (Figura 10) (MACIEL, 2005).

Tanto na fase I quanto na fase II existem enzimas metabolizadoras responsáveis por estes processos. Na fase I as enzimas participam das reações de oxidação, redução e hidrólise, no qual são denominadas de reações de funcionalização. Essas reações introduzem um grupo funcional à molécula que está sendo biotransformada, tornando-a mais hidrofílica. Na fase II ocorre reações de conjugação entre substâncias endógenas e o grupo polar do xenobiótico convertido. Isto faz com que os compostos se tornem mais solúveis em água, facilitando então sua eliminação pelo organismo (MACIEL, 2005; TRACY; VANDE apud COSTA; OLIVEIRA; PIMENTA, 2004).

Figura 10 – Reações de fase I e II no metabolismo de xenobióticos.



Fonte: adaptado de Drummond, 2005

Segundo Smith (et al. apud OLSHAN, et al. 2000), as enzimas metabolizadoras têm despertado uma grande atenção ultimamente pois acredita-se que as mesmas possam ser agentes na susceptibilidade genética em diferentes tipos de câncer.

Determinadas pessoas ou subgrupos populacionais, apresentam um risco maior de desenvolverem câncer relacionado a fatores ambientais, pois estes possuem respostas diferentes nas fases da biotransformação de xenobióticos, devido as alterações genéticas no qual foram herdadas (CAPORASO apud LEICHSENRING, 2005).

Os genes são os responsáveis por codificarem essas enzimas. Acredita-se que a presença de polimorfismos (variações na sequência do DNA de um gene com frequência superior a 1% na população) nestes genes poderá mudar a sua função ou expressão, elevando ou reduzindo a ativação ou desintoxicação dos carcinógenos levando o indivíduo a se tornar mais suscetível ao câncer (OLSHAN, et al. 2000).

#### 2.8.3.3.1 Polimorfismos gênicos associados ao risco de CEO

Diversos polimorfismos nos genes codificadores das enzimas responsáveis pela biotransformação de xenobióticos estão sendo associados com o risco do desenvolvimento de câncer, incluindo enzimas pertencentes da superfamília CYP e as GSTs (GATTÁS apud LEICHSENRING, 2005).

Dentre os genes pertencentes à superfamília CYP, tem-se o gene *CYP2E1* no qual codifica enzima que atua na fase I. A *CYP2E1* está envolvida na metabolização da acetona e do etanol. Além disso, o mesmo é responsável por catalisar a oxidação e produção de adutos através de diversos compostos encontrados na fumaça do tabaco, tais como o benzeno e as nitrosamidas. Polimorfismos presentes na localização promotora desse gene, no qual foram detectados pelas enzimas de restrição Pst1 e Rsa1, estão sendo associados com o aumento da sua atividade. A consequência que se obtém através disso é o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de diversas neoplasias, incluindo o da cavidade oral (GATTÁS et al., 2006).

Da superfamília dos GSTs (glutathionas-S-transferases), têm-se os genes *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1*, no qual codificam enzimas responsáveis pela fase II atuando, assim, na detoxificação de xenobióticos oriundos da fumaça do tabaco (ANWAR; ABDEL-RAHMAN; EL-ZEIN apud BISELLI et al., 2006).

O gene *GSTM1* está localizado em 1p13.3 e é um gene polimórfico em humanos sendo que um alelo é nulo (*GSTM1*-) pela deleção gênica presente no mesmo, e outros dois funcionais. O gene *GSTT1* se encontra localizado em 22q11.2 e também é um gene polimórfico na população, no qual poderá apresentar deleção gênica tornando-o nulo. Estudos têm relatado que a presença do genótipo nulo para esses dois genes em homozigose torna os indivíduos suscetíveis ao desenvolvimento de

neoplasias associadas a xenobióticos pelo fato dos mesmos possuírem a perda total da atividade enzimática (BRUHN et al. apud BISELLI et al., 2006; BOCCIA et al. apud COLOMBO; RAHAL, 2009).

Outro gene pertencente à superfamília dos GSTs é o *GSTP1* localizado em 11q13.2. Os polimorfismos deste gene tem sido relacionados com diferentes tipos de neoplasias (MOSCOW et al., 1988). Ao falar sobre o gene, Dusinká (et al., apud LEICHSENRING, 2005) afirmam que o mesmo é responsável por codificar a isoenzima P1 que é responsável pelo metabolismo de alguns PAHs.

Um das variantes para o gene *GSTP1* é o *GSTP1\*B* no qual ocorre a transição de adenina para guanina (A → G) no nucleotídeo +313 do éxon 5. O resultado dessa transição é a mudança do códon 105 de ATC para GTC (Ile → Val). Essa substituição de aminoácidos faz com que a atividade catalítica e o equilíbrio térmico da proteína codificada fiquem alterados (JOHANSSON et al., 1998; PANDYA et al. apud LEICHSENRING, 2005).

A consequência que se obtém por meio desta variação gênica é a diminuição da capacidade de realizar a detoxificação de xenobióticos como os PAHs. Com isso, indivíduos portadores do polimorfismo no gene *GSTP1* e que fiquem expostos à fumaça do tabaco podem ser mais suscetíveis ao câncer da cavidade oral (LEICHSENRING, 2005).

## 2.9 SUPERFAMÍLIA CYP

A superfamília CYP é constituída por hemoproteínas encontradas tanto em células procarióticas quanto em eucarióticas. Essas hemoproteínas são responsáveis pelo processo de oxidação na metabolização de fármacos e xenobióticos. Em relação aos seres humanos, a superfamília CYP é constituída por 18 famílias, 44 subfamílias e 57 genes funcionais (BARREIRO; FRAGA, 2015). As famílias, as subfamílias e suas respectivas funções estão descritas no Quadro 03.

Quadro 03 – Relação das famílias e subfamílias da superfamília CYP com suas respectivas funções

Famílias da superfamília CYP	Membros Funcionais	Principais Funções
CYP1	1A1, 1A2, 1B1	Metabolismo de Xenobióticos
CYP2	2A6, 2A7, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1, 2J2, 2R1, 2S1, 2U1, 2W1	Metabolismo de Xenobióticos e metabolismo de esteroides
CYP3	3A4, 3A5, 3A7, 3A43	Metabolismo de Xenobióticos
CYP4	4A11, 4A22, 4B1, AF2, 4F3, 4F8, 4F11, 4F12, 4F22, 4V2, 4X1, 4Z1	Metabolismo de ácidos graxos e ácido araquidônico
CYP5	5A1	Síntese de tromboxana A2 (tromboxana sintase)
CYP7	7A1, 7B1	Esteróide 7 $\alpha$ -hidroxilase
CYP8	8A1, 8B1	Síntese de prostaciclina (prostaglandina sintase) e biossíntese de ácidos biliares
CYP11	11A1, 11B1, 11B2	Biossíntese de esteroides
CYP17	17A1	Biossíntese de testosterona e estrogênio (esteróide 7 $\alpha$ -hidroxilase)
CYP19	19A1	Biossíntese de estrogênio (aromatase)
CYP21	21A2	Biossíntese de esteroides
CYP24	24A1	Metabolismo da vitamina D
CYP26	26A1, 26B1, 26C1	Metabolismo do ácido retinoico (hidroxilase de ácido retinoico)
CYP27	27A1, 27B1, 27C1	Biossíntese de ácidos biliares e ativação da vitamina D3
CYP39	39A1	Metabolismo do colesterol
CYP46	46A1	Metabolismo do colesterol (colesterol 24-hidroxilase)
CYP51	51A1	Metabolismo do colesterol (lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase)

Fonte: adaptado de Barreiro; Fraga, 2015

Conforme visto anteriormente, algumas famílias participam da metabolização de xenobióticos como as famílias CYP1 e CYP2. A família CYP1 é constituída pelas subfamílias CYP1A e CYP1B. A subfamília CYP1A possui as enzimas CYP1A1 e CYP1A2 no qual apresentam similaridade. Esta subfamília desempenha um papel importante no metabolismo de xenobióticos, onde participa das reações de oxidação de substâncias exógenas como, por exemplo, as aminas heterocíclicas, as aminas aromáticas e os PAHs (PARKINSON, 2001; KAWAJIRI; HAYASHI apud ROCHA, 2004).

Em relação a expressão da isoenzima CYP1A1, a mesma possui característica extra-hepática, onde uma grande quantidade de mRNA e proteínas foram encontradas em linfócitos, pulmões e placenta de fumantes ativos. Diferentemente da CYP1A1, a expressão de CYP1A2 ocorre apenas no fígado (KAWAJIRI;

HAYASHI apud ROCHA, 2004).

Na família CYP2 tem-se as subfamílias CYP2A, CYP2B e CYP2E. Dentre as enzimas da subfamília CYP2A tem-se a CYP2A6 que participa da metabolização de diferentes tipos de fármacos, substratos e substâncias tóxicas, tais como o halotano, a cumarina, a losigamona, as nitrosaminas, a nicotina e as aflatoxinas (POSTI et al., 1999).

As enzimas pertencentes a subfamília CYP2B são CYP2B6 e CYP2B7, onde a CYP2B6 é expressa no fígado enquanto que a CYP2B7 é expressa nos pulmões. Essas enzimas atuam no processo de ativação na biotransformação de xenobióticos (PARKINSON, 2001).

Em relação às enzimas pertencentes à subfamília CYP2E tem-se a CYP2E1 onde esta é induzível pelo etanol, como também pela isoniazida, pirazol e acetona. A CYP2E1 participa da metabolização de algumas substâncias, tais como a cafeína, o acetaminofenol, o benzeno, a anilina, o clorofórmio, o *p*-nitrofenol, as nitrosaminas e a teofilina (PARKINSON, 2001).

### **2.9.1 Gene *CYP1A1***

O gene *CYP1A1* localiza-se no cromossomo 15 (15q22-24), fazendo parte da superfamília do Citocromo P450 e família CYP1. Este gene possui 7 éxons e 6 íntrons, tendo um tamanho total de 5810 pb. O *CYP1A1* é responsável por codificar uma das enzimas que atua na fase I (fase de ativação) de substâncias como, por exemplo, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) oriundos do tabaco (MACIEL, 2005; COLOMBO; RAHAL, 2009).

A enzima Aril Hidrocarbono Hidroxilase (AHH) é codificada pelo gene *CYP1A1* que age na fase I do metabolismo de carcinógenos provenientes do tabaco no qual ativa os PAHs (MACIEL et al., 2005).

O gene *CYP1A1* é expresso em diferentes localizações anatômicas sendo elas: região bucal, trato gastrointestinal, pulmão e cérebro (SONG et al. apud MOTA et al., 2010).

### 2.9.2 Polimorfismo no gene *CYP1A1* e o risco de CEO

Os polimorfismos juntamente com os fatores ambientais podem conferir um risco diferencial de câncer para os indivíduos que possuem essas variações genéticas (OLSHAN et al., 2000).

Diversos polimorfismos já foram descritos para o gene *CYP1A1* sendo que dois destes são mais estudados: o *CYP1A1* MspI e *CYP1A1* ile/val. O polimorfismo *CYP1A1* MspI é a transição de citosina a timina (C → T) na posição 264 localizada na região 3' UTR do gene no qual resulta na introdução de um sítio de restrição para a enzima MspI (XU et al., 1996).

A região 3'-UTR dos genes foi reconhecida como sendo importante para o controle da expressão destes em diferentes níveis, tais como exportação nuclear, poliadenilação, eficiência da tradução e degradação do mRNA (CONNE; STUTZ; VASSALLI, 2000).

Polimorfismos presentes nessa região provocam um efeito sobre a expressão do gene, pois afeta a estabilidade do mRNA correspondente e, assim, a atividade enzimática, conforme demonstrado por Wang, Pitarque e Ingelman-Sundberg (2006) ao analisarem o efeito de um polimorfismo na região 3'-UTR do gene *CYP2A6*.

Esse polimorfismo está relacionado ao aumento da atividade enzimática e ligado com o aumento de suscetibilidade de cânceres que possuem relação com o fumo de cigarro, como o câncer oral e de pulmão (KAO et al., 2002).

Esses genótipos variantes elevam a atividade enzimática que parece ter um papel importante na susceptibilidade de formação de aductos, e presumivelmente, no risco de câncer (BARTSCH et al., 2000).

Uma das consequências causadas por esse polimorfismo no gene *CYP1A1* é a alteração da expressão, função e/ou a atividade das enzimas codificadas por este gene. Caso a metabolização do carcinógeno ocorra descoordenadamente, os intermediários poderão se ligar de forma covalente ao DNA atuando como agentes mutagênicos e, por sua vez, aumentará o risco de câncer quimicamente induzido (BARTSCH et al., 2000).

Outro polimorfismo descrito para o gene *CYP1A1* é ocasionado pela troca de adenina pela guanina no éxon 7, no qual origina um alelo polimórfico denominado

CYP1A1\*2B. O resultado desta mutação é a alteração do aminoácido Isoleucina para valina (Ile → Val) localizada no resíduo 462. O alelo mutante deste polimorfismo também ocasiona o aumento da atividade catalítica da enzima produzida (HAYASHI; WATANABE; KAWAJIRI, 1992; NAKACHI et al., 1991).

Para Kiyohara (et al., 1996), a possível consequência causada por esse polimorfismo é a possível formação de adutos no DNA no qual poderá ocasionar um acúmulo de danificações propícias à carcinogênese, porém ainda não foi estabelecido as consequências precisas desse polimorfismo (KIYOHARA; HIROHATA; INUTSUKA, 1996).

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 CASUÍSTICA**

O estudo incluiu 105 casos de carcinoma epidermóide oral atendidos no Programa de Prevenção e Detecção Precoce do Câncer de Boca do Hospital Santa Rita de Cássia/ SESA-ES. Também avaliou-se 70 controles que foram indivíduos voluntários recrutados do próprio serviço, os quais foram encaminhados para avaliação clínica, mas não apresentaram diagnóstico de câncer. Os controles foram pareados com os casos de acordo com o gênero e a idade ( $\pm 5$  anos).

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Integrado de Atenção à Saúde (ANEXO A) e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B). Após a realização de entrevistas, análise de prontuário ou consulta médica, foram registrados as seguintes variáveis: idade, gênero e histórico do consumo de álcool e o uso do tabaco.

#### **3.2 ANÁLISE DE DNA**

##### **3.2.1 Extração de DNA das amostras**

As amostras dos casos e controles foram constituídas de sangue. Para a extração do DNA, as amostras foram centrifugadas, onde eliminou-se as hemácias e o soro. Após a centrifugação, foram adicionados 30 $\mu$ l de SDS/proteinase K (5mg/mL em 10% SDS-Dodecil Sulfato de Sódio) ao pellet de leucócitos para digestão das proteínas e rompimento das membranas celulares. Em seguida, as amostras foram incubadas à temperatura de 48°C. Após um período de 2 horas de incubação, foi adicionado 600 $\mu$ l de Fenol-Clorofórmio com pH 9,0 às amostras. Os tubos contendo a mistura foram homogeneizados durante 1 minuto e, posteriormente, centrifugados a uma velocidade de 14.000rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transportado para um novo tubo, ao qual foi novamente adicionado 600 $\mu$ l de Fenol-Clorofórmio com pH 9,0. A solução foi, em seguida, homogeneizada durante 1 minuto.

Repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente e, novamente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Para a precipitação do DNA, foi adicionado 100µL de 10M de acetato de sódio e 1,0mL de etanol absoluto à solução aquosa. Os tubos foram armazenados à temperatura de -20°C, *overnight*.

Após o período de armazenamento, o material foi centrifugado a 14.000rpm, durante 20 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e, ao precipitado, foi adicionado etanol 75%. O material foi novamente centrifugado nas mesmas condições.

Mais uma vez, desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensão em TE (Tris-HCl 10mM pH7,5 e EDTA 1mM pH 8,0), e os tubos armazenados à 4°C.

### **3.2.2 Rastreamento do Polimorfismo MspI do Gene *CYP1A1***

A detecção do polimorfismo foi realizada através da técnica PCR/RFLP (*Polymerase Chain Reaction/ Restriction Fragment Length Polymorphism*). Inicialmente o DNA extraído foi submetido à técnica de PCR, no qual permitiu a amplificação da região de interesse onde está localizado o referido polimorfismo.

Utilizando a metodologia citada por Cha (et al., 2007) um fragmento do gene *CYP1A1* foi amplificado através dos seguintes primers: F – 5' TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT 3' e R – 5' CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT 3'. Para a realização do PCR foram misturados 0.4µM de cada primer, 100 ng de DNA genômico, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de cada dNTP, 1U da enzima Taq polimerase, e 2,5 µL de solução tampão para PCR ( 200 mM Tris-HCl ph 8,4 500 mM KCl) em volume final de 25µL. Todo o processo de PCR foi realizado em termociclador marca Applied Biosystems® (Figura 11) no qual foi programado 30 ciclos para a amplificação. Em cada ciclo foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação do DNA à 94 °C durante 30 s, anelamento dos *primers* a 57 °C durante 1 minuto e síntese de DNA à 72 °C por 1 minuto.

Figura 11 – Termociclador marca Applied Biosystems® utilizado no ensaio de PCR.



Fonte: arquivo próprio

Os produtos obtidos no PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 2% (Figura 12) no qual utilizou *Gel red* como corante de DNA, para possível visualização através do transiluminador UV dos fragmentos com tamanho esperado de 340 pb. Em seguida, os produtos amplificados foram submetidos à clivagem com a enzima de restrição específica (*MspI*) através do ensaio de RFLP.

A digestão enzimática ocorreu por meio de banho maria (Figura 13) com temperatura de 37°C durante 2 horas. O volume final utilizado para a reação de RFLP do gene *CYP1A1* foi de 20 µL no qual possuía 5 µL de produto de PCR, 2 µL de tampão de reação (10X), 12,7 µL dH<sub>2</sub>O e 5U da enzima *MspI*. Os resultados obtidos após a digestão da enzima foram: uma banda com 340pb para homozigoto selvagem (C/C), duas bandas contendo 140pb e 200pb para homozigoto polimórfico (T/T) e 3 bandas cada uma contendo 340, 200 e 140pb para heterozigoto (C/T) (Figura 14). Para a visualização e análise dos resultados obtidos, os fragmentos obtidos no RFLP também foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 2% e corados com *GelRed™ (Biotium)*.

Todas as análises do DNA dos casos e controles foram realizadas no laboratório de patologia molecular da Universidade Federal do Espírito Santo, *campus* de Maruípe

entre fevereiro de 2013 e agosto de 2015.

Figura 12 – Cuba horizontal e fonte elétrica utilizados na eletroforese.



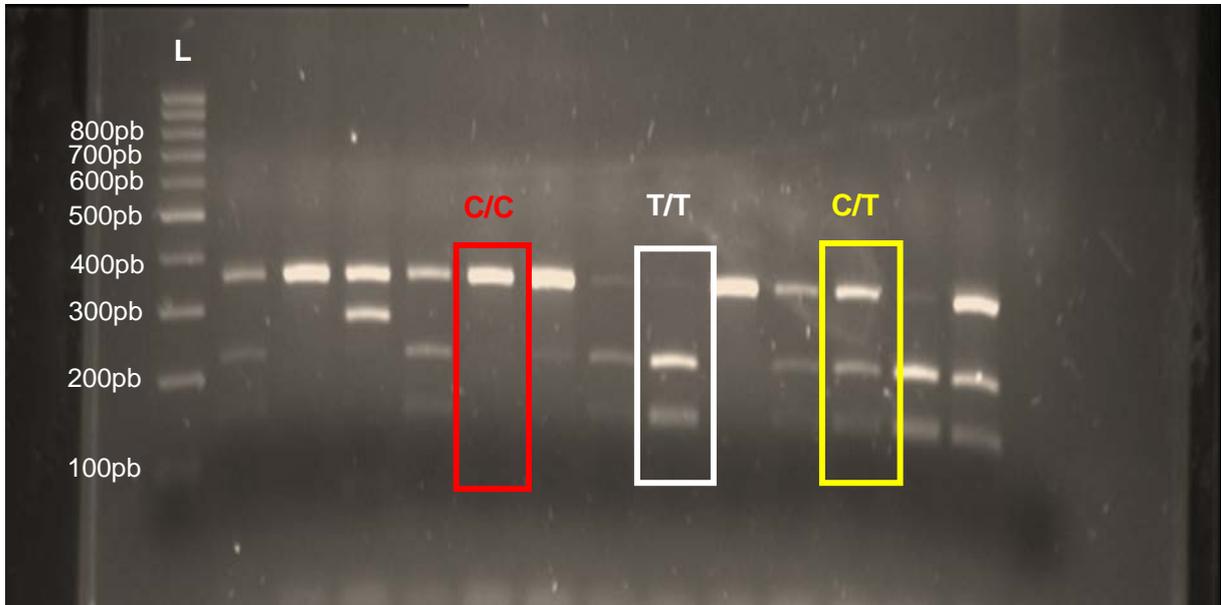
Fonte: arquivo próprio

Figura 13 – Equipamento para banho-maria utilizado no ensaio de RFLP.



Fonte: arquivo próprio

Figura 14 – Resultados obtidos após a realização do ensaio de RFLP em amostras de pacientes. Destacado em vermelho tem-se um homocigoto normal (C/C), em branco um homocigoto polimórfico (T/T) e em amarelo um heterocigoto (C/T).



Fonte: arquivo próprio

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram realizados o teste de Qui-quadrado e Fischer através do programa GraphPad Prism v.6, onde foi possível examinar a frequência dos genótipos estudados, comparar as diferenças demográficas entre controles e casos com CEO e verificar a associação entre frequência dos genótipos e fatores de risco e características clinicopatológicas. Foi considerado significativo  $p < 0.05$ .



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 AVALIAÇÃO DOS CASOS E CONTROLES EM RELAÇÃO ÀS CARACTERÍSTICAS GERAIS

Ao comparar as características dos pacientes com os controles, as estatísticas apontaram que não houve significância em relação ao gênero e a idade onde o valor de  $p$  foi igual a 1 e 0,1645 respectivamente (Tabela 2), visto que os controles foram pareados com os casos em relação a estas duas variáveis (idade  $\pm$  5 anos). Como o principal objetivo do trabalho foi avaliar o papel do polimorfismo no risco de desenvolvimento da doença é importante que os dois grupos comparados sejam homogêneos em relação a essas variáveis. Vale ressaltar que para a avaliação da diferença dos grupos em relação a idade, foi feito a média da idade de todos os participantes do estudo obtendo um valor de 56 anos. Com isto, foram distribuídos os indivíduos que possuíam idade inferior e superior a 56 anos entre os dois grupos.

Ao avaliar os fatores de risco (consumo de tabaco e álcool), houve diferença significativa entre os grupos de casos e controles. Em relação ao tabaco, foi visto que um maior número de tabagistas se encontrava entre os casos, com 75 (71,43%) dos pacientes tabagistas e apenas 9 (12,86%) dos controles, tendo assim valor de  $p < 0,0001$  (Tabela 2). Para o álcool, também foi detectado um maior número de etilistas entre os casos, onde 63,81% destes são etilistas, enquanto que dentre os controles apenas 34,29% ingerem álcool. O valor de  $p$  para este caso foi de 0,0001 (Tabela 2).

As porcentagens de pacientes tabagistas e/ou etilistas encontrados neste trabalho são próximos aos encontrados por Santos e outros (2010) no qual avaliaram o risco do tabaco e álcool para o câncer de bucal em 21 pacientes do Estado da Bahia, onde 16 (76,1%) eram tabagistas e 13 (61,9%) eram etilistas.

Também foi avaliado a interação entre o tabaco e o álcool, sendo que 54,29% dos casos eram tabagistas e etilistas, enquanto que em controles haviam 7,14%. O valor obtido ao comparar os dois grupos foi de  $p < 0,0001$  (Tabela 2) demonstrando, assim, a ocorrência de sinergismo entre esses dois fatores de risco.

Tabela 2 – Distribuição do número e porcentagem de casos e controles, segundo características gênero e idade, tabagistas e etilistas.

Características	Caso		Controle		p
	n	(%)	n	(%)	
<b>Gênero</b>					
Feminino	21	20,00	14	20,00	1
Masculino	84	80,00	56	80,00	
<b>Faixa etária, anos</b>					
< 56	49	46,67	41	58,57	0,1645
≥ 56	56	53,33	29	41,43	
<b>Tabagista</b>					
Sim	75	71,43	9	12,86	< 0,0001
Não	30	28,57	61	87,14	
<b>Etilista</b>					
Sim	67	63,81	24	34,29	0,0001
Não	38	35,24	46	65,71	
<b>Tabagista + Etilista</b>					
Sim	57	54,29	5	7,14	< 0,0001
Não	47	44,76	65	92,86	

Fonte: elaboração própria, 2015

A grande influência do tabagismo e do etilismo no desenvolvimento do CEO pode ser explicada pela maior exposição do tecido epitelial à ação de carcinógenos presentes no tabaco e álcool favorecendo a carcinogênese, já que se trata de um tecido de revestimento (RAPOPORT apud MATEUS, 2008).

#### 4.2 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE *CYP1A1* NA SUSCETIBILIDADE DO CEO: CASO x CONTROLE

Para a verificação da influência do polimorfismo com o desenvolvimento do CEO foram comparadas as frequências genóticas e alélicas dos pacientes e dos controles.

Em relação às frequências genóticas, o número obtido de C/C, C/T e T/T em pacientes com CEO foram de 0,29 (30/105), 0,68 (71/105) e 0,04 (4/105) respectivamente, enquanto que em controles foram 0,61 (43/70), 0,39 (27/70) e 0 (0/70). Ao comparar a frequência genotípica nos dois grupos, foi obtido um valor de  $p < 0,0001$ , demonstrando que houve uma diferença significativa entre casos e

controles, apontando uma maior frequência de genótipos heterozigotos e homozigotos variantes nos pacientes. A distribuição genotípica das populações está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Frequência genotípica do polimorfismo *CYP1A1*.

Polimorfismo	Frequência genotípica			<i>p</i>
	Homozigoto selvagem (C/C)	Heterozigoto (C/T)	Homozigoto polimórfico (T/T)	
	n	n	n	
<b><i>CYP1A1</i></b>				
Casos	30	71	4	< 0,0001
Controles	43	27	0	

Fonte: elaboração própria, 2015

Também foi avaliada a frequência genotípica dos tabagistas tanto dos pacientes quanto dos controles e não foi obtido uma diferença significativa entre as frequências nos dois grupos, onde o valor de *p* foi de 0,4502 (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência genotípica dos tabagistas.

Polimorfismo	Frequência genotípica		<i>p</i>
	Homozigoto selvagem (C/C)	Heterozigoto (C/T) + Homozigoto polimórfico (T/T)	
	n	n	
<b><i>CYP1A1</i></b>			
Casos tabagistas	23	55	0,4502
Controles tabagistas	4	5	

Fonte: elaboração própria

As frequências obtidas para os alelos C (alelo selvagem) e T (alelo polimórfico) do gene *CYP1A1* foram de 0,62 (130/210) e 0,38 (80/210) respectivamente em pacientes e 0,81 (113/140) e 0,19 (27/140) em controles. Comparando as frequências alélicas nos dois grupos, foi obtido um valor de *p* = 0,0002. Isto demonstra que a frequência dos alelos é diferente entre as duas populações no qual a maior frequência do alelo polimórfico foi encontrada entre os casos. A distribuição alélica das populações está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Frequência alélica do polimorfismo *CYP1A1*.

Características	Frequência alélica		<i>p</i>
	Selvagem	Polimórfico	
	n	n	
Casos	130	80	<b>0,0002</b>
Controles	113	27	

Fonte: elaboração própria, 2015

Também foi avaliada a frequência do alelo polimórfico em tabagistas tanto dos pacientes quanto dos controles e não foi obtido uma diferença significativa entre as frequências nos dois grupos, onde o valor de *p* foi de 0,4520 (Tabela 6).

Tabela 6 – Frequência alélica dos tabagistas.

Polimorfismo	Frequência alélica		<i>p</i>
	Selvagem	Polimórfico	
	n	n	
<b><i>CYP1A1</i></b>			
Casos tabagistas	97	59	0,4520
Controles tabagistas	13	5	

Fonte: elaboração própria

De acordo com os valores obtidos no presente estudo, mostramos que houve associação estatisticamente significativa das variantes genóticas e alélicas do gene *CYP1A1* com o desenvolvimento de CEO, concluindo que a presença do alelo polimórfico aumenta o risco do surgimento da doença na população do Espírito Santo. As frequências de distribuição dos genótipos entre casos e controles foram estatisticamente diferentes devido à alta frequência do alelo polimórfico nos pacientes.

Em um estudo realizado por Cha e outros (2007), no qual avaliaram o mesmo polimorfismo em 72 pacientes com CEO e em 221 controles da população sul-coreana, foi verificado que os pacientes eram mais propensos a ter o genótipo homocigoto polimórfico (T/T) quando comparados aos controles. Também foi verificado uma prevalência significativamente maior do alelo polimórfico nos pacientes, onde o valor de *p* foi de 0,023. Neste mesmo estudo foi verificado que o mesmo polimorfismo em associação com o polimorfismo do gene *GSTM1* estava envolvidos na suscetibilidade do CEO, e os resultados obtidos foram

estatisticamente significantes para os genótipos GSTM1 (-)/CYP1A1 (T/T) ( $p < 0.009$ ).

Porém, alguns estudos não apresentaram valores estatisticamente significantes que demonstrem esta relação, como por exemplo, o estudo brasileiro de Monteiro e outros (2012) realizado em Goiás, no qual avaliaram 59 pacientes com CEO e 49 controles. Os valores de  $p$  para a distribuição genotípica e alélica obtidos neste estudo foram de 0,55 para ambos. Entretanto, os pesquisadores avaliaram uma quantidade pequena de casos e controles, o que poderia levar a uma limitação no poder estatístico.

Os genes da superfamília CYP codificam enzimas responsáveis pelas reações de fase I no metabolismo de xenobióticos incluindo diversos carcinógenos ambientais (ZHENG; ZHAO, 2015).

O tabaco contém diversas substâncias carcinogênicas, das quais os PAHs exercem papel importante no desenvolvimento de CEO como também na carcinogênese dos outros tumores associados ao tabagismo. Os PAHs são metabolizados por enzimas da família CYP através das reações de fase I, no qual irá gerar metabólitos altamente reativos (BARTSCH et al., 2000).

De acordo com Kriek e outros (1998), esses metabólitos gerados na fase I podem interagir com o DNA, contribuindo para a formação de aductos (“DNA adducts”), provocando uma instabilidade genética e tendo como consequência a iniciação do processo carcinogênico.

O gene *CYP1A1* codifica a enzima AHH, que está envolvida na ativação dos PAHs. Este gene está ativo em muitos tecidos epiteliais, inclusive na mucosa bucal (BARTSCH, 2000).

O polimorfismo MspI do gene *CYP1A1* está associado com o aumento da atividade enzimática. A consequência disto é um aumento na quantidade de compostos mutagênicos. O aumento da atividade enzimática gera estresse oxidativo intracelular tendo como consequência a elevada produção de radicais livres os quais podem reagir com o DNA causando danos (BARTSCH, 2000; MOONEY et al., 1997).

A presença do alelo T foi relacionada com o aumento na suscetibilidade do CEO na população capixaba, possivelmente por afetar a metabolização de substância presentes não só na fumaça do cigarro como também oriundos de outras fontes,

como por exemplo na poluição do ar.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE *CYP1A1* COM O PROGNÓSTICO DOS PACIENTES E COM OS FATORES DE RISCO

Os resultados encontrados para a avaliação do polimorfismo estudado com o prognóstico dos pacientes e com os fatores de risco não demonstraram significância estatística (Tabela 6), exceto para o tamanho do tumor onde o valor de  $p$  ao comparar os genótipos separadamente foi de 0,0414, demonstrando assim, que os genótipos não são estatisticamente iguais em relação ao tamanho do tumor. Neste caso, pode-se observar que entre os tumores menores (T1 + T2) a heterozigose foi mais frequente. O real motivo pelo qual a maior parte dos pacientes com tumores menores eram heterozigotos é inconclusivo, porém podemos inferir que esses pacientes tiveram o diagnóstico precocemente e, portanto, apresentaram tumores de dimensões menores.

Mathias e outros (2002) avaliaram a Influência dos polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *CYP2D6*, *CYP1A1* e *CYP2E1* no prognóstico do câncer de cabeça e pescoço. Neste estudo também não foi encontrado relação do polimorfismo do gene *CYP1A1* com o prognóstico dos pacientes, encontrando apenas relação dos polimorfismos *GSTT1* nulo e *CYP2D6* com extensão do tumor e comprometimento de linfonodos.

Tabela 7 – Análise do polimorfismo *CYP1A1* x características clinicopatológicas e epidemiológicas.

(Continua)

Características clinicopatológicas e epidemiológicas	<i>CYP1A1</i>									
	C/C		C/T		T/T		$p$	C/T + T/T		$p$
	n	(%)	n	(%)	n	(%)		n	(%)	
<b>Gênero</b>										
Masculino	26	24,76	54	51,43	4	3,81	0,2832	58	55,24	0,4185
Feminino	4	3,81	17	16,19	0	0		17	16,19	
<b>Idade</b>										
< 56	16	15,24	33	31,43	2	1,90	0,8187	35	33,33	0,6661
≥ 56	14	13,33	38	36,19	2	1,90		40	38,10	

(Continuação)

Características clinicopatológicas e epidemiológicas	CYP1A1									
	C/C		C/T		T/T		p	C/T + T/T		p
	n	(%)	n	(%)	n	(%)		n	(%)	
<b>Tabagismo</b>										
Sim	23	21,90	48	45,71	4	3,81	0,2848	52	49,52	0,633
Não	7	6,67	23	21,90	0	0,00		23	21,90	
<b>Etilismo</b>										
Sim	19	18,10	44	41,90	4	3,81	0,3167	48	45,71	1
Não	11	10,48	26	24,76	0	0		26	24,76	
<b>Tabagismo + Etilismo</b>										
Sim	16	15,24	37	35,24	4	3,81	0,1798	41	49,05	1
Não	14	13,33	33	31,43	0	0,00		33	31,43	
<b>Estágio</b>										
Inicial (I+II)	4	3,81	20	19,05	0	0,00	0,1518	20	19,05	0,199
Avançado (III+IV)	25	23,81	50	47,62	4	3,81		54	51,43	
<b>Tamanho do Tumor</b>										
T1+T2	7	6,67	31	29,52	0	0,00	<b>0,0414</b>	31	29,52	0,1147
T3+T4	23	21,90	39	37,14	4	3,81		43	40,95	
<b>Linfonodos (N)</b>										
Negativo	14	13,33	33	31,43	4	3,81	0,1106	37	35,24	0,8321
Positivo	16	15,24	38	36,19	0	0,00		38	36,19	

Fonte: elaboração própria, 2015



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O polimorfismo MspI do gene *CYP1A1* está associado ao aumento do risco de CEO na população do Espírito Santo conforme os resultados obtidos neste estudo, demonstrando uma frequência do alelo polimórfico significante mais elevada no grupo de pacientes. Diante disto, o alelo polimórfico poderá servir como marcador genético para a identificação de subgrupos populacionais suscetíveis a desenvolverem o CEO, auxiliando na prevenção e detecção precoce da doença no ES.

Os dois fatores ambientais que estão fortemente relacionados com o risco de desenvolvimento de CEO (tabaco e álcool) também foram associados com a doença na população capixaba confirmando, assim, o que outros autores já haviam descrito sobre o assunto. É de suma importância a elaboração de estratégias para combater o uso de tabaco e álcool e assim reduzir o número de indivíduos portadores de CEO.

Ao avaliar a associação do polimorfismo com os fatores de risco e o prognóstico dos pacientes, não foi encontrada relação entre os mesmos, demonstrando assim que não há interferência do polimorfismo e dos fatores de risco sobre o prognóstico dos portadores de CEO.

O presente estudo mostra como a variação genética pode influenciar significativamente no desenvolvimento de distúrbios multifatoriais, indicando a importância da avaliação do perfil genético individual para prevenir o surgimento de doenças graves nas populações, como o câncer.



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. C. S. et al. Fatores prognósticos no câncer de boca. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 471-478, 2011.
- ALVES, A. T. N. N. et al. Diagnóstico precoce e prevenção do câncer oral: um dever do cirurgião-dentista. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 59, n. 4, p. 259-260, jul./ago. 2002.
- ALVES, C. C. M. et al. Carcinoma de células escamosas de boca: relação entre graduação histopatológica e características clínicas da neoplasia. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v. 11, n. 4, p. 485-489, out./dez., 2011.
- AUGUSTO, T. A. Medidas preventivas do câncer bucal – Revisão de literatura. **Prêmio Colgate Profissional - Prevenção na área de saúde bucal**, Campinas, fev. 2007. Disponível em: <[http://www.colgateprofissional.com.br/LeadershipBR/News-Articles/NewsMedia/1PremioColgateProfissional\\_1.pdf](http://www.colgateprofissional.com.br/LeadershipBR/News-Articles/NewsMedia/1PremioColgateProfissional_1.pdf)> Acesso em: 18 maio 2015.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- BARTSCH, H. et al. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. **Cancer Epidemiology. Biomarkers & Prevention**, v. 9, p. 3–28, jan. 2000.
- BIAZEVIC, M. G. H. et al.,. Tendências de mortalidade por câncer de boca e orofaringe no Município de São Paulo, Brasil, 1980/2002. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 10, Rio de Janeiro: out. 2006.
- BISELLI, J. M. et al. Polimorfismos GSTT1 e GSTM1 em indivíduos tabagistas com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 5, p. 654-658, 2006.
- BRADLEY, P. J; RAGHAVAN, U. Cancers presenting in the head and neck during pregnancy. **Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery**, v. 12, n. 2, p. 76-81, apr. 2004.
- BRENER, S. et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 1, p. 63-69, 2007.
- BRITES, F. C. **Câmaras de Sucção nas Próteses Totais**. 2012. Disponível em: <<http://britesbucofacial.blogspot.com.br/2012/03/camaras-de-succao-nas-protese-totais.html>> Acesso em: 16 set. 2015.
- BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177-186, jul. 1999.
- CAMPOS, J. L. G.; CHAGAS, J. F. S.; MAGNA, L.A. Fatores de atraso no diagnóstico do câncer de cabeça e pescoço e sua relação com sobrevida e qualidade de

vida. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, v. 36, n. 2, p. 65-68, abr./jun. 2007.

CANEVARI, R.A.; ROGATTO, S.R. Câncer de cabeça e pescoço. In: Ferreira CG, Rocha JC. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu, p. 189-201, 2004.

CAPORASO, N. Selection of candidate genes for population studies. In: RYDER, W. Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. **IARC Scientific publications**. Lyons, n. 148, p. 23-36, 1999.

CARRARD, V. C. et al. Álcool e Câncer Bucal: Considerações sobre os Mecanismos relacionados. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n. 1, p. 49-56, 2008.

CARVALHO, A. L. et al. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. **Head & Neck**, v. 26, n. 1, p. 31-38, jan. 2004.

CARVALHO, M.B.; FAVA, A .S. Tumores malignos da cavidade oral. In \_\_\_\_\_: **Cirurgia de cabeça e pescoço**. São Paulo: Roca, 1989, p. 832.

CHA, I. H, et al. Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 genes and susceptibility to oral cancer. **Yonsei Medical Journal**, v. 48, n. 2, p. 233-239, 2007.

COLOMBO, J.; RAHAL, P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 55, n. 2, p. 165-174, 2009.

CONNE, B.; STUTZ, A.; VASSALLI, J.D. The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular "hotspot" for pathology? **Nature Medicine**, v. 6, p. 637-641, 2000.

COSTA, E. M. M. B.; OLIVEIRA, V.; PIMENTA, F. C. Citocromos P450 e biotransformação microbiana. *Revista de Patologia Tropical*, v. 33, n. 1, p. 21-31, jan./jun. 2004.

COURA, R. S. et al. CYP1A1 and CYP2E1 polymorphism frequencies in a large Brazilian population. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2007.

COSTA, A.L.L., Correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e localização anatômica em carcinoma epidermóide oral. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 216-220, 2002.

COSTA, E. G.; MIGLIORATI, C. A. Câncer bucal: Avaliação do tempo decorrente entre a detecção da lesão e o início do tratamento. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 283-289, 2001.

DALY, A. K. et al. Metabolic polymorphisms. **Pharmacology Therapeutics**. v. 57, p. 129-160, 1993.

DIAS, G. F. et al. Autocuidados na prevenção do câncer bucal. **Investigação - Revista Científica da Universidade de Franca**, Franca, v. 5 n. 1, p. 14-20, dez. 2005.

DONATO, A. C. et al. Estudo epidemiológico do câncer bucal: revisão da literatura e levantamento estatístico de 29 casos novos diagnosticados durante as campanhas de prevenção do câncer bucal na cidade de Osasco. **Revista Paulista de Odontologia**, v. 23, n. 5, p. 37-41, set./out. 2001.

DURAZZO, M. D. et al. Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: increasing incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastases. **Clinics**, São Paulo, v. 60, n. 4, p. 293–298, 2005.

FALCÃO, M. M. L. et al. Conhecimento dos cirurgiões-dentistas em relação ao câncer bucal. **Revista Gaúcha de Odontologia**. Porto Alegre, v. 58, n. 1, p. 27-33, jan./mar. 2010.

FERRARO, C. T. L. et al. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 451-459, ago. 2011.

FONSECA, R. V. et al. Prevalência de Lesões orais na Campanha de Prevenção do Câncer Bucal no Município de Osasco. **Revista Paulista de Odontologia**. v. 23, n. 1, p.10-14, fev./mar. 2005.

FRANCO E. et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **International Journal of Cancer**. v. 43, p. 992-1000, 1989.

FREITAS A. R. et al. Restrição ao uso de tabaco e a prevenção do câncer bucal. **Arquivos de Ciências da Saúde**; v. 17, n. 1, p. 54 - 57, jan./mar. 2010.

FROTA, A. R. S. **Orientação sobre prevenção de câncer bucal e auto-exame**. 2011. 25 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família) – Universidade Federal de Minas Gerais, Campos Gerais, 2011.

GANGULY, N.; PARIHAR, S. P. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. **Journal of Biosciences**, v. 34, n. 1, p. 113-123, 2009.

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

\_\_\_\_\_. et al. Genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. **Head & Neck**, v. 28, n. 9, p. 819-826, sep. 2006.

GEISLER, S. A.; OLSHAN, A. F. GSTM1, GSTT1 and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **American Journal of Epidemiology**, v. 154, n. 2, p. 95-105, 15 jul. 2001.

GIGLIOTTI, M. et al. Principais mecanismos de atuação do álcool no desenvolvimento do câncer oral. **Odontologia Clinico-Científica**. Recife, v.7, n.2, p.107 – 112, 2008.

HASHIBE, M.; BRENNAN, P.; BENHAMOU, S.; et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, p. 777–789, 16 may. 2007.

HAYASHI S.; WATANABE J.; KAWAJIRI K. High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and Mu-class glutathione S-transferase genes. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 83, n. 8, p. 866-870, aug. 1992.

HAYASSY, A. Câncer bucal no setor público de saúde. **Revista Brasileira de Odontologia**. v. 55, n. 3, p. 173-5, mai./jun. 1998

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**, v. 30, n. 6, p. 445–600, 1995.

HONMA, H. N. et al. O polimorfismo do gene CYP1A1\*2A e a suscetibilidade ao câncer de pulmão na população brasileira. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 8, p. 767-772, 2009.

HUNTER, K.D.; PARKINSON, E.K.; HARRISON, P.R. Profiling early head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 127-35, feb. 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 122p, 2012. Disponível em: <[http://portal.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/estimativas-de-incidencia-de-cancer-2012/estimativas\\_incidencia\\_cancer\\_2012.pdf](http://portal.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/estimativas-de-incidencia-de-cancer-2012/estimativas_incidencia_cancer_2012.pdf)> Acesso em: 09 abr. 2015

\_\_\_\_\_. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA (Instituto Nacional de Câncer)**, 122p, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>> Acesso em: 15 mar. 2015.

\_\_\_\_\_. **Manual de detecção de lesões suspeitas**: câncer de boca. Rio de Janeiro, p.1-47, 1996

\_\_\_\_\_. Falando sobre o câncer da boca. Rio de Janeiro: **INCA (Instituto Nacional de Câncer)**, 52 p, 2002. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/falando\\_sobre\\_cancer\\_boca.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/falando_sobre_cancer_boca.pdf)> Acesso em: 18 maio 2015.

\_\_\_\_\_. Prevenção do câncer da boca. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 4, p. 206, 2003.

JHAM, B. C.; FREIRE, A. R. S. Complicações bucais da radioterapia em cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 5, p. 704-708, 2006.

JOHANSSON, A.S. et al. Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1-1 governed by the H-site residue 105. **Journal of Molecular Biology**, v. 278, p. 687-698, 1998.

JOHNSON, N. et al. Squamous cell carcinoma. In: BARNES, L. et al. **Classification of tumours: Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: World Health Organization, 2005. p. 168-175.

KAO, S.Y.; WU, C.H.; LIN, S.C.; YAP, S.K.; CHANG, C.S.; WONG, Y.K.; CHI, L.Y.; LIU, T.Y. Genetic polymorphism of cytochrome P4501A1 and susceptibility to oral squamous cell carcinoma and oral precancer lesions associated with smoking/betel use. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 31, n. 9, p. 505-511, oct. 2002.

KEY, T. J. et al. The effect of diet on risk of cancer. **The Lancet**, v. 360, p. 861-868, 14 sept. 2002.

KIYOHARA, C; HIROHATA, T; INUTSUKA, S. The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms of the CYP1A1 gene. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 87, p. 18-24, 1996.

LEICHSENDRING, A. **Investigação de polimorfismos dos genes cyp1a1 e gstp1 em portadores de tumores de cavidade bucal**. 2005. 40 f. Dissertação (Mestre em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

LEITE, A. C. E.; GUERRA, E. N. S.; MELO, N. S. Fatores de risco relacionados com o desenvolvimento do câncer bucal: revisão. **Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica**, v.1, n.3, p. 31-36, jan./mar. 2005.

LIMA, A. A. S. et al. Conhecimento de alunos universitários sobre câncer bucal. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n.4, p. 283-288, 2005.

MACIEL, M. E. et al. Avaliação da frequência de polimorfismos dos genes CYP1A1, GSTT1 e GSTM1 em caucasóides do sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: SBG, 2005. p.875.

MACKAY, J.; ERIKSEN, M. **The tobacco atlas**. Hong Kong: World Health Organization, 2002. 10 p.

MACLEOD, S. et al. Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 influence the in vivo function of CYP1A2. **Mutation Research**, v. 376, p. 135-142, may. 1997.

MAIER H. et al. Dental status and oral hygiene in patients with head and neck cancer. **Otolaryngology Head Neck Surgery**. v. 108, n. 6, p. 655-661, 1993.

MARCHIONI, D. M. L. et al. Fatores dietéticos e câncer oral: estudo caso-controle na Região Metropolitana de São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 3, p. 553-564, Rio de Janeiro, mar. 2007.

MARQUES, L. A. et al. Oral health, hygiene practices and oral cancer. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, n. 3, p. 471-479, 2008.

MATHIAS, C. et al. Influence of glutathione s-transferase and cytochrome p450 polymorphisms on prognosis of head and neck cancer. **Laryngo Rhino Otologie**, v. 81, n. 6, p. 406-412, 2002.

MAZOLA, C. et al. Câncer Bucal: Incidência, Etiopatogenia, Diagnóstico, Lesões Pré-cancerosas, Tratamento e Prognóstico. **Revista de Odontologia**, Bauru, nov. 2006.

MENDES, A. M. S. **Câncer de boca**: um campo a ser explorado pela fonoaudiologia. 2000. 36 f. Monografia (Especialização em Motricidade Oral) - Centro de Especialização em Fonoaudiologia Clínica, Rio de Janeiro, 2000.

MIMURA, M.A.M. **Fundamentação Teórica**: Câncer Bucal. São Paulo: UNIFESP, UMA-SUS, [201-]. 7p.

MONTORO, J. R. M. C. et al. Fatores prognósticos no carcinoma espinocelular de cavidade oral. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, n. 6, p. 861-866, 2008.

MONTEIRO, C. D. et al. O polimorfismo de *CYP1A1* e a susceptibilidade ao carcinoma oral. **Estudos**, Goiânia, v. 39, n. 2, p. 189-197, abr./jun. 2012.

MOONEY, L. A. et al. Contribution of genetic and nutritional factors to DNA damage in heavy smokers. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 503-509, 1997.

MORAIS, T. M. N. **Câncer de Boca**: avaliação do conhecimento dos cirurgiões dentistas quanto aos fatores de risco e procedimentos de diagnóstico. 2003. 108f. Dissertação (Mestrado em Clínica Integrada) – Programa de pós-graduação em odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MOSCOW, J. A. et al. Isolation of the human anionic glutathione S-transferase cDNA and the relation of its gene expression to estrogen-receptor content in primary breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 6518-6522, 1988.

MOTA, K. M. **Câncer bucal**: diagnóstico precoce através do auto-exame. 2009. 11 f. Projeto de Intervenção (Especialista em Práticas Clínicas em Saúde da Família) - Escola de Saúde Pública do Ceará, Fortaleza, 2009.

MOTA, P. et al. Polimorfismos dos alelos m1 e m2 do gene *CYP1A1*: Susceptibilidade genética para o cancro do pulmão. **Revista Portuguesa de Pneumologia**. v. 16, n. 1, p. 89-98, enero/feb 2010.

NAKACHI, K.; IMAI, K.; HAYASHI, S.; WATANABE, J.; KAWAJIRI, K. Genetic Susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. **Cancer Research**, v. 51, p. 5177-5180, 1991.

NEBERT, D.W.; MCKINNON, R.A.; PUGA, A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. **DNA and Cell Biology**, v. 15, n. 4 p. 273-280, apr. 1996.

NOUEL, A. **Lesões bucais, aftas, herpes bucal, leucoplasia, candidíase o que é importante observar e saber?** 2001. 1 fotografia 410 x 277 pixels.

OLIVEIRA, L. R.; RIBEIRO-SILVA, A.; ZUCOLOTO, S. Perfil da incidência e da sobrevivência de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 42, n. 5, p. 385–392, out. 2006.

OLSHAN, A. F. et al. *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*, and *NAT1* Polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v. 9, p. 185–191, fev. 2000.

PARK, J. Y. et al. *CYP1A1* and *GSTM1* Polymorphisms and Oral Cancer Risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**. v. 6, p. 791-797, out. 1997.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: \_\_\_\_\_. **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 9. ed. New York. 2001. p. 133-219.

PERUSSI, M. R. et al. Carcinoma epidermóide da boca em idosos de São Paulo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 341-344, 2002.

POSTI, K. et al. Modulation of murine phenobarbital-inducible CYP2A5, CYP2A10 e CYP1A enzymes by inhibitors of protein kinases and phosphatases. **European Journal of Biochemistry**, n. 264, v. 1, p. 19-26, 1999.

PRADO, B. N.; PASSARELLI, D. H. C. Uma nova visão sobre prevenção do câncer bucal no consultório odontológico. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 21, n. 1, p. 79-85, jan/abr 2009.

REIS S. et al. Fatores de risco de câncer da cavidade oral e da orofaringe. Fumo, álcool e outros determinantes. **Revista de Pós-Graduação**. v. 4, n. 2, p. 127-132, 1997.

REZENDE, C. P. et al. Alterações da saúde bucal em portadores de câncer da boca e orofaringe. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, n. 4, p. 596-600, 2008.

RIBEIRO, N. A. **Importância do diagnóstico precoce do câncer bucal e suas implicações na estratégia de saúde da família**. 2013. 27 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família) – Universidade Federal de Minas Gerais, Araçuaí, 2013.

ROCHA, D. A. M. **Alterações de enzimas de biotransformação de xenobióticos na fase inicial da esquistossomose mansônica murina**. 2004. 67 f. Dissertação (Mestre em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

RUIZ, M. T. et al. Epidemiologia e biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 13, n. 1, p. 34-38, jan./mar. 2006.

SANTOS, G. L. et al. Fumo e álcool como fatores de risco para o câncer bucal. **Odontologia Clínico-Científica**, Recife, v. 9, n. 2, p. 131-133, abr./jun., 2010.

SARRUF, M. B. J. M.; DIAS, E. P. Avaliação citopatológica da cavidade bucal em pacientes portadores de infecção genital pelo papilomavírus humano (HPV). **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v. 9, n. 2, p. 4-18, 1997.

SATO, M.; SATO, T.; IZUMO, T.; AMAGASA, T. Genetic polymorphism of drugmetabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 10, p. 1927-1931, 1999.

SCOTT, S.E., GRUNFELD, E.A., MCGURK M. The idiosyncratic relationship between diagnostic delay and stage of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**. v. 41, n. 4, p. 396-403, 2005.

SHIBOSKI, C. H.; SCHMIDT B. L., JORDAN, R. C. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. **Cancer**, v. 103, n. 9, p. 1843 - 1849, 1 may 2005.

SILVERMAN, S. Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers: The outcomes, the trends, the challenge. **Journal of the American Dental Association**., v. 132, p. 7–11, 01 nov. 2001.

SILVESTRE, J. A. O.; JERONYMO, D. V. Z. Câncer bucal e sua correlação com tabagismo e alcoolismo. **Revista Eletrônica Lato Sensu**, v.2, n1, 2007.

SOUZA, R. O. **Densidade de mastócitos e microdensidade vascular em displasia epiteliais e carcinomas orais**. 2012. 42 f. Dissertação de Mestrado (Mestre em Patologia Humana) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2012.

SPECHT, L. Oral complications in the head and neck radiation patient. **Supportive Care in Cancer**, v.10, ed. 1, p. 36-39, jan. 2002

STUGIS, E. M. A review of social and behavioral efforts at oral cancer preventions in India. **Head & Neck**, v. 26, p. 937-944, 2004.

TORRES-PEREIRA, C. C. et al. Abordagem do câncer da boca: uma estratégia para os níveis primário e secundário de atenção em saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, 28, Sup:S30-S39, Rio de Janeiro, 2012.

TUCCI, R. et al. Avaliação de 14 casos de carcinoma epidermóide de boca com diagnóstico tardio. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 7, n. 2, p. 231-238, jun. 2010.

VIDAL, A. K. L. et al. Papiloma Virus Humano (HPV) como fator de risco para o carcinoma escamoso celular (CEC) oral: revisão de literatura. **Odontologia Clínico-Científica**, Recife, v. 5, n. 1, p. 07-25, jan./mar. 2005.

VILAR, C. M. C.; MARTINS, Í. M. Câncer de cabeça e pescoço. In: \_\_\_\_\_. **Oncolo-**

**gia Básica.** 1. ed. Piauí: Fundação Quixote, 2012. p. 9.

WANG, J.; PITARQUE, M.; INGELMAN-SUNDBERG, M. 3'-UTR polymorphism in the human CYP2A6 gene affects mRNA stability and enzyme expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, p. 491–497, 2006.

WORMHOUDT, L. W.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 29, n. 1 p. 59-124, 1999.

XAVIER, S. D.; BUSSOLOTI, I. F, LANCELLOTTI, C. L. P. Prevalência de achados sugestivos de papilomavírus humano (HPV) em biópsias de carcinoma espinocelular de cavidade oral e orofaringe: estudo preliminar. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 71, n. 4, p. 510-514, jul./ago. 2005.

XU, X. et al. Cytochrome P450 CYP1A1 MspI polymorphism and lung cancer susceptibility. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 5. p. 687-692, sep. 1996.

ZHENG, H.; ZHAO, Y. Association of CYP1A1 MspI Polymorphism in the Esophageal Cancer Risk: A Meta-Analysis in the Chinese Population. **European Journal of Medical Research** v. 20, n. 1, p. 40-46, 23 oct. 2015.

ZHENG T. Z. et al. Dentition, oral hygiene, and risk of oral cancer: a case-control study in Beijing, People's Republic of China. **Cancer Causes Control**. v. 1, n. 3, p. 235-241, nov. 1990.



## **ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir e no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento.

**INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ DEVE SABER SOBRE A PESQUISA:**

**Título da pesquisa:** *“Alterações genética e epigenéticas e detecção de Papiloma Vírus Humano (HPV) em carcinoma epidermóide da cavidade bucal.”*

**Objetivos da pesquisa:** *O objetivo deste estudo é avaliar possíveis alterações genéticas em células que possam estar relacionadas ao câncer de boca e verificar a presença do HPV.*

**Envolvimento na pesquisa/ Procedimentos:** *ao participar deste estudo o(a) Sr(Sra) permitirá que o (a) profissional retire células da sua mucosa bucal utilizando uma pequena escova. As células serão utilizadas como controle da pesquisa, pois o Sr(a) não apresenta nenhum indício clínico da doença e não possui nenhum fator de risco para o desenvolvimento da mesma. Esclarecemos que não haverá desconforto físico para sua pessoa.*

**Riscos:** *a participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade ou integridade física.*

**Benefícios:** *Contribuindo com a pesquisa você estará colaborando com informações importantes sobre o carcinoma epidermóide (um tipo de câncer) de boca, de forma que o conhecimento que será construído possa ser útil para o entendimento dessa doença e realização de novos estudos no tratamento dessa lesão.*

**Confidencialidade:** *todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o (a) pesquisador (a) terá o conhecimento dos dados.*

**Esclarecimentos:** *Esclarecemos que você, a qualquer momento, tem a liberdade de se recusar em contribuir com o estudo. Sua identidade não será revelada e será mantido o caráter confidencial de todas as informações obtidas. Os resultados do estudo serão divulgados em congressos científicos e publicados em revistas especializadas, mas preservando sua identidade. Os pesquisadores responsáveis por este estudo, sempre que solicitados, estarão à sua disposição para o esclarecimento de qualquer questão relacionada à pesquisa.*

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA  
PESQUISA**

Eu, \_\_\_\_\_,  
abaixo assinado, concordo em participar do estudo “*Alterações genéticas e epigenéticas e detecção de HPV em carcinoma epidermóide da cavidade bucal*” sob a responsabilidade da pesquisadora Ms Melissa de Freitas Cordeiro Silva.

Vitória, \_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura do sujeito ou responsável \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

## ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS  
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE  
Unimed Vitória

Vitória, 27 de junho de 2011.  
Projeto No: 318/2011  
Parecer: 21/2011  Inicial  Conclusão

**Título:** Estudo de Câncer de Cabeça e Pescoço no Brasil  
**Instituição:** Hospital Santa Rita de Cássia  
**Pesquisador:** José Roberto V de Podestá  
**Grupo e Área Temática Especial:** IA

**Prezado Pesquisador**

Após o recebimento e apreciação do projeto e das respostas as pendências formuladas, seguem as observações deste Comitê:

1. Adequar os objetivos de acordo com hipóteses formuladas em linha com a justificativa do projeto.  
**Parecer do CEP:** pendência atendida
2. Incluir, na metodologia os critérios de seleção (inclusão e exclusão) amostral assim como características outras que sejam pertinentes. Explicitar, ainda na metodologia, o estudo piloto, e sua metodologia.  
**Parecer do CEP:** Pendência atendida. O estudo piloto não foi contemplado na metodologia, mas é citado na página 17.
3. Justificar ausência do cálculo amostral  
**Parecer do CEP:** Pendência atendida. É citado na página 10 (metodologia) que a amostra será de conveniência.
4. Adequar o TCLE à CNS 347/05 de Janeiro 2005 e incluir campos para identificação de quem aplicou o TCLE. É direito inalienável do sujeito de pesquisa saber ou não querer saber sobre seus resultados de exames realizados em sua propriedade biológica, tenha ou não aplicabilidade clínica. Pede-se, portanto, para rever a informação sobre o tema no TCLE.  
**Parecer do CEP:** pendência atendida. TCLE devidamente adequado e, sobe nossa avaliação, dentro dos critérios éticos e alinhados com a resolução 196/1996 e suas complementares.



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS  
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE  
Unimed Vitória

5. Corrigir o cronograma

**Parecer do CEP:** pendência atendida. Cronograma corrigido.

6. Incluir Declarações de Infraestrutura de todas as instituições hospitalares participantes, inclusive a do Hospital que assina a Folha de Rosto.

**Parecer do CEP:** pendência atendida. Declarações entregues.

7. Informar no dossiê se as amostras biológicas permanecerão identificadas e no país ou se serão exportadas e/ou desvinculadas dos respectivos sujeitos.

**Parecer do CEP:** pendência atendida

### CONCLUSÃO

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa acima citado, foi considerado:

## APROVADO

É parecer desse comitê que o referido projeto e demais documentos apresentados, **atende** aos aspectos da Resolução **CNS 196/96** e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Estamos aguardando o parecer final da CONEP.

Foram aprovados os seguintes documentos:

- Projeto de pesquisa versão de 1º de abril de 2011;
- Declaração de infraestrutura versão 27 de abril de 2011;
- Respostas as pendências versão 27 de abril de 2011;

O primeiro relatório de andamento do projeto deverá ser encaminhado a este CEP até o dia 27 de dezembro de 2011.

Atenciosamente,

  
Dr. Álvaro Armando Carneiro de Moraes  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CIAS



