



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

PAULO MARCELO DE FARIA VASCONCELOS

**Perfil Genotípico e Epidemiológico do Carcinoma de Células
Escamosas da Laringe**

**Goiânia
2016**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Paulo Marcos de Faria Vasconcelos

Título do trabalho: Perfil Genotípico e Epidemiológico do Carcinoma de Glândula Escamosa da Laringe

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Paulo Marcos de Faria Vasconcelos

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 16 / Março / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

PAULO MARCELO DE FARIA VASCONCELOS

**Perfil Genotípico e Epidemiológico do Carcinoma de Células
Escamosas da Laringe**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Paula Curado, PhD

Co-orientador:

Prof. Dr. Aparecido Divido da Cruz, PhD

Área de Concentração:

Dinâmica do Processo Saúde-Doença

Linha de Pesquisa:

Epidemiologia das Doenças Humanas

**Goiânia
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

de Faria Vasconcelos, Paulo Marcelo
Perfil Genotípico e Epidemiológico do Carcinoma de Células
Escamosas da Laringe [manuscrito] / Paulo Marcelo de Faria
Vasconcelos, Aparecido Divino da Cruz, Maria Paula Curado. - 2016.
xvii, 115 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Maria Paula Curado; co-orientador Dr.
Aparecido Divino da Cruz.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de
Medicina (FM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas.

1. xenobióticos. 2. epidemiologia. 3. fatores de risco. 4. Odds ratio.
5. sobrevida. I. Divino da Cruz, Aparecido. II. Curado, Maria Paula. III.
Curado, Maria Paula, orient. IV. Divino da Cruz, Aparecido, co-orient.
V. Título.

CDU 61

Ata da Defesa de Tese de Doutorado realizada por **Paulo Marcelo de Faria Vasconcelos**. Aos trinta dias do mês de setembro do ano de 2016, às 08:00 horas, reuniu-se na PUC-GO a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da defesa de Tese intitulada: **"PERFIL GENOTÍPICO E EPIDEMIOLÓGICO DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA LARINGE"**, como parte de requisitos necessários à obtenção do título de Doutor, área de concentração **Dinâmica do Processo Saúde-Doença**. O Presidente da Comissão julgadora, **Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz**, iniciando os trabalhos concedeu a palavra ao candidato, para exposição em até 50 minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir ao candidato durante o prazo máximo de 30 minutos, assegurando-se o mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato aprovado ou reprovado.

Banca Examinadora

Aprovado(a)/Reprovado(a)

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz - Presidente
Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva - Membro
Prof. Dr. José Laerte Rodrigues da Silva Júnior - Membro
Prof. Dr. Evandro Leão Ribeiro - Membro
Prof. Dr. Sérgio Henrique Nascente Costa - Membro
Profª. Drª. Thais Cidália Vieira - Suplente
Prof. Dr. Wilson de Melo Cruvinel - Suplente

Aprovado
Aprovado
Aprovado
Aprovado
Aprovado

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o candidato **Paulo Marcelo de Faria Vasconcelos** Habilitado () Não habilitado (). Nada mais havendo a tratar, eu **Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz**, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

Assinatura

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz - Presidente
Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva - Membro
Prof. Dr. José Laerte Rodrigues da Silva Júnior - Membro
Prof. Dr. Evandro Leão Ribeiro - Membro
Prof. Dr. Sérgio Henrique Nascente Costa - Membro
Profª. Drª. Thais Cidália Vieira - Suplente
Prof. Dr. Wilson de Melo Cruvinel - Suplente

Assinado
Assinado
Assinado
Assinado
Assinado

A banca examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Paulo Marcelo de Faria Vasconcelos
Paulo Marcelo de Faria Vasconcelos

**Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações Eletrônicas
(TDE) na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD)**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS - UFG**

**Programa de Pós Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno(a): Paulo Marcelo de Faria Vasconcelos, MSc

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Maria Paula Curado, PhD

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Maria Paula Curado, PhD – Universidade Federal de Goiás

2. Prof^a. Dr^a. Thaís Cidália Vieira – Universidade Estadual de Goiás

3. Prof. Dr. José Laerte Rodrigues da Silva Júnior – UniEvangélica

4. Prof. Dr. Evandro Leão Ribeiro – Universidade Federal de Goiás

5. Prof. Dr. Sérgio Henrique Nascente – Universidade Federal de Goiás

1º Suplente: Prof. Dr. Wilson de Melo Cruvinel – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

2º Suplente: Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Data: 30/09/2016

*Dedico este trabalho a Jesus Cristo e à minha
família, com os quais conheci o amor incondicional, a
resiliência, a tolerância, a humildade e o perdão.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao Misericordioso Jesus, o meu Bom Pastor, o qual me ofertou a oportunidade e os meios para mais esta vitória.

À minha amada esposa, Prof^a. Dr^a. Lara Stefânia Netto de Oliveira Leão Vasconcelos, minha companheira de vida, de alma e maior incentivadora.

À minha preciosa e sagrada família: aos meus pais Carmem Lúcia de Faria Vasconcelos e Marcelo Sardinha de Vasconcelos, aos meus irmãos Fernando de Faria Vasconcelos, Karla de Faria Vasconcelos e Fábio de Faria Vasconcelos, aos meus sogros Neusa Nunes de Oliveira Netto Leão e Marcondes Netto Ferreira Leão, aos meus cunhados André Luiz Netto de Oliveira Leão e Moabe Ferreira, aos meus sobrinhos Luiz Gabriel Pontes e Bernardo Ferreira de Vasconcelos ao meu irmão mais velho que a vida me presenteou Dr. Mario Henrique Miguel da Silva. Agradeço-lhes por caminharem comigo na busca deste e de tantos outros projetos.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Paula Curado. Minha gratidão pelos ensinamentos e pelo apoio sempre dedicados ao meu aprendizado! Outrora responsável pelo Registro de Câncer em Goiás e Serviço de Cabeça e Pescoço do HAJ - Hospital Araújo Jorge da ACCG - Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Brasil pela colaboração e obtenção das amostras biológicas e hoje honrosamente membro da IARC - International Agency for Research on Cancer (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer), Lyon, Brasil, pelo desenho investigativo e colaborativo do Estudo Internacional Correlacionando Virose e Câncer de Cabeça e Pescoço. Você é uma referência para mim!

Ao eterno e querido amigo, mentor, irmão de todas as horas, meu co-orientador, Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD. Obrigado por tudo! Você ajudou a formar o profissional que hoje sou. Tenho eterna gratidão por seu amor fraterno e incondicional. Imenso respeito e admiração pela dimensão humana que há em você. És uma fonte inspiradora! Obrigado pelo exemplo de humildade, conhecimento, carinho e confiança ofertados desde a minha juventude.

Aos amigos e irmãos de todas as horas, Dr. Prof. Paulo Luiz Carvalho Francescantônio, Dr^a. Prof^a Isabel Cristina Francescantônio, Dr. Sandro Gomes Albino, Prof^a. Dr^a. Claudia Maria Duque, Dr^a. Pabline Marçal, Dr^a. Camilla Alves Araújo, Dr^a. Bárbara Alves Araújo, Dr. Alceu Paulino Rezende, Dr. Cesar Lelli Parreão, Dr. Luis Fernando Santos e Dr^a. Loraine Siqueira Cruvinel. Aos amigos, colegas e discentes da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia, do Serviço de Atendimento Móvel de Urgência de Goiânia, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia e de Leopoldo de Bulhões e da Vila São José Bento Cottolengo, pelos desafios compartilhados e pelo auxílio sempre disponibilizado!

Ao companheiro e amigo incondicional Prof. Raimundo Lima da Silva Júnior MSc, cuja contribuição foi inestimável, na colaboração para o desenvolvimento das atividades de laboratório, auxílio na redação dos artigos e finalização deste estudo.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisas Replicon, Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás: Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva; Prof^a. Dr^a Lysa Bernardes Minasi; Damiana Mirian da Cruz e Cunha, MSc e Eduardo Rocha Pedrosa, Esp, pelo apoio, compreensão e dedicação.

Aos docentes e técnicos-administrativos do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás, em especial à secretária Valdecina Quirino, pela dedicação e atenção sempre ofertados aos alunos do programa.

À PROPE/PUC-GO Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pela infraestrutura disponível e necessária ao desenvolvimento deste estudo.

À SES/GO Secretaria de Estado da Saúde do Governo do Estado de Goiás pela disponibilidade dos equipamentos e softwares necessários ao desenvolvimento deste estudo, mediante o estabelecimento do Convênio de Cooperação Mútua entre a Secretaria de Estado da Saúde e Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás pelo apoio financeiro, na forma de bolsa, para a realização deste doutorado.

Aos professores membros da banca examinadora, eternos mestres, que compartilharam comigo seus conhecimentos, os quais foram essenciais para o aperfeiçoamento desta tese.

Aos participantes do estudo, que gentilmente e voluntariamente concordaram em participar e colaborar com este projeto. A cada um especial colaborador um especial agradecimento pela sua disponibilidade em meio a dor e ao estresse pessoal em que se encontravam, ainda assim acharam possível a partilha com a ciência.

Agradeço aos meus inúmeros amigos, familiares e estudantes que de alguma forma contribuíram para a realização desta conquista.

SUMÁRIO

Pág.

Biografia	xii
Listas de Símbolos e Abreviaturas	xv
Resumo	xviii
Abstract	xix
1. Introdução	18
2. Revisão da Literatura	22
2.1 Considerações Históricas.....	22
2.2 Câncer de Cabeça e Pescoço.....	24
2.3 Laringe: Histologia e Anatomia.....	24
2.4 Carcinoma de Células Escamosas da Laringe (CCE).....	28
2.4.1 <i>Epidemiologia do Câncer da Laringe</i>	29
2.4.2 <i>Classificação Internacional da Doença e Estadiamento</i>	30
2.4.3. <i>Sobrevida</i>	32
2.5 Fatores de risco.....	33
2.5.1 <i>Tabagismo</i>	34
2.5.2 <i>Etilismo</i>	34
2.5.3 <i>Tabagismo e Etilismo: Sinergismo</i>	35
2.5.4 <i>Papiloma vírus humano (HPV)</i>	36
2.5.5 <i>Aspectos socioeconômicos, saúde bucal e dieta</i>	38
2.6. Aspectos Genético-Moleculares.....	49
2.6.1 <i>A Família do Gene Citocromo P450 (CYP)</i>	43
2.6.2 <i>Os genes GSTM1, GSTP1 e GSTT1</i>	44
2.6.3 <i>Gene TP53</i>	45
3 Objetivos	50
3.1 Objetivo Geral	50
3.2 Objetivos Específicos	50
4 Metodologia	51
4.1 Tipo e local do estudo.....	51
4.2 Aspectos Ético-Legais.....	51
4.3 Grupo Amostral.....	52
4.4 Critérios de Inclusão e Exclusão das Amostras.....	52

4.5 Obtenção das amostras.....	52
4.6 Análise Molecular e Elaboração dos Artigos.....	53
4.7 Análise Estatística.....	53
5 Resultados	54
Artigo 01.....	54
Artigo 02.....	70
Artigo 03.....	86
6 Considerações Finais	97
7 Referências Bibliográficas	98
Anexos	108
Anexo 1 - Parecer favorável do Comitê de Ética da Associação de Combate ao Câncer em Goiás.....	108
Anexo 2 - Análise de Prontuários de Pacientes com CCE de Laringe.....	109
Anexo 3 - Comprovante de submissão à Cancer Prevention Research (CPR).....	110
Anexo 4 - Instruções para submissão à Clinics (FM/USP).....	113

BIOGRAFIA

Minha trajetória profissional teve início em 1998 quando ingressei no curso de graduação em Biomedicina na Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO), concluindo em agosto de 2002. Durante minha graduação, como consequência do meu interesse pela Imunologia e Genética, realizei estágios em laboratórios de pesquisa do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG) e da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO). Obtive vivências no Laboratório de Imunologia e Virologia (IPTSP-UFG), Laboratório de Autoimunidade (LAI/PUC-GO), coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Luiz Carvalho Francescantonio e Núcleo de Pesquisas Replicon (PUC-GO), coordenado pelo Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD. Nesta época, participei de pesquisas e grupos de estudos, os quais contribuíram significativamente para minha formação científica.

Obtive minha graduação em Biomedicina em 2001 e com o objetivo de aprimorar meus conhecimentos em pesquisa e ensino na área da Imunologia e Genética, ingressei no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde da PUC-GO (2005-2007). Obtive o título de Mestre desenvolvendo pesquisa na área de radiologia e imunobiologia orientada pelo Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz e intitulada Avaliação das Proporções de Células T, B, NK e NK/T em Indivíduos Expostos à Radiação Ionizante do Césio 137.

Durante este período também desenvolvi atividades de ensino e pesquisa na condição de Professor Convidado do Departamento de Biomedicina da PUC-GO (2002-2011). Paralelamente durante esta época graduei-me em Farmácia e Bioquímica em 2007, exerci a atividade de biomédico na Santa Casa de Misericórdia de Goiânia, GO, Brasil, por sete anos, sendo dois anos como *Staff* do Estágio do Curso de Biomedicina na mesma Instituição. Atuei como Farmacêutico no Serviço de Atendimento Móvel de Urgência de Goiânia (SAMU) por dois anos, exerci o cargo de Assessor Técnico em Municipalização da Secretaria Municipal de

Saúde de Goiânia, GO, Brasil (SMS) por dois anos, fui membro do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP-SCM) da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia, Go, Brasil por dois anos e membro da Comissão Organizadora do atual Curso de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Ingressei no Curso de Medicina na PUC-GO, onde graduei-me em 2013.

Atualmente, minhas áreas de atuação concentram-se na prática médica em Clínica Geral nos níveis de atenção Primária, Secundária e Terciária, com foco em Medicina de Família, Saúde Mental, Saúde Pública, Oncologia, Genética Humana, Saúde Ocupacional e Pesquisador do Grupo de Pesquisas Replicon da PUC-GO. A análise destas experiências me levou à necessidade de qualificação e aprimoramento dos conhecimentos científicos referentes às temáticas vivenciadas.

Desta forma, diante do incentivo e exemplo abnegado do Coordenador do Grupo de Pesquisas Replicon da PUC-GO, Prof. Dr. Aparecido Divido da Cruz, escolhi o Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para a realização do processo de doutoramento. O programa foi escolhido por apresentar o compromisso, a qualidade e a competência necessários à realização das atividades integradoras de formação do profissional de saúde e de geração e consolidação do conhecimento.

Para o doutorado foi delineado um projeto inserido nas linhas de pesquisa do programa, da orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Paula Curado, PhD (FM-UFG) e do co-orientador Prof. Dr. Aparecido Divido da Cruz, PhD. O projeto faz parte de um estudo maior coordenado pela Prof^a. Dr^a. Maria Paula Curado, e intitulado “Estudo Internacional Correlacionando Virose e Câncer de Cavidade Oral e de Laringe”. O projeto foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética (Protocolo-CEPACCG/30.06.98) do HAJ/ACCG e foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene) /LACEN/SES e Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) do Departamento de Biologia, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Acredito que o título de doutor ampliou meus conhecimentos e contribuirá para qualificar minha prática cotidiana e capacidade investigativa, além de me oportunizar amadurecimento pessoal e profissional. Os resultados e o aprendizado gerados por esta pesquisa serão aplicados tanto em sala de aula, quanto no delineamento de estudos de interesse e práticas na área médica. Fazem parte de minhas perspectivas futuras a realização de um pós-doutorado, a inserção em um programa de pós-graduação e a consolidação como pesquisador na linha de pesquisa a qual estou inserido.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A Adenina	kDa kilo Dalton
a.C. Antes de Cristo	M Molar
ACCG Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Brasil	mg Miligramas
ACS Sociedade Americana de Câncer, EUA (<i>American Cancer Society</i>)	MgCl Cloreto de magnésio
C Citosina	min Minuto
CCE Carcinoma de Células Escamosas	mL Mililitro
CID Classificação Internacional de Doenças	mL Milímetro
CID-O Classificação Internacional de Doenças para Oncologia	mM Milimolar
cm Centímetro	n Número amostral
CYP Citocromo P450	NADPH Adenina nicotinamida dinucleotídeo Fosfato-oxidase (<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>)
DNA Ácido Desoxirribonucleico	NAT N- Acetil transferase
dNTP deoxi-nucleotídeo trifosfato	nmol Nanomol
DP - Desvio padrão	°C Graus Celsius
EDTA Ácido etilenodiaminotetracético (<i>Ethylenediamine tetracetic acid</i>)	OMS Organização Mundial da Saúde
EtBr Brometo de Etídeo	OR Risco relativo (<i>Odds ratio</i>)
EUA Estados Unidos da América	p Braço cromossômico curto
f Frequência Relativa (%)	p Valor probabilístico de significância
Fe⁺³ Íon Ferro	p53 Proteína p53
g Grama	pb Par de base
G Guanina	TP53 gene TP53
GL Grau de Liberdade	
GSH Glutathiona na forma reduzida	
GST Glutathiona S-Transferase	
h Horas	
HAI Hospital Araújo Jorge	
HAP Hidrocarboneto Aromático Policíclico	
HPV Papilomavírus Humano (<i>Human Papilloma Virus</i>)	
IARC Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (<i>International Agency for Research on Cancer, FRA</i>)	
IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística	
IC Intervalo de confiança	
INCA/MS Instituto Nacional do Câncer do Ministério da Saúde, Brasil	
kb kilo base (1kb = 1000 pb)	

RESUMO

VASCONCELOS, P.M.F. **Perfil Genotípico e Epidemiológico do Carcinoma de Células Escamosas da Laringe. 2016. 115f.** Tese de Doutorado em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

A laringe possui funções importantes para o organismo, como fonação e respiração. Uma determinada patologia que acomete esse sítio anatômico trará sérios problemas fisiológicos, tendo um impacto expressivo na qualidade de vida do paciente. O objetivo deste estudo foi avaliar os dados clínico-epidemiológicos, sócio-demográficos e moleculares de pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular da laringe do Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia (RCBP) da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), analisando os dados de 63 pacientes acompanhados num período de 6 anos. O presente estudo foi conduzido no Núcleo de Pesquisas Replicon (PUC-GO) e no LaGene (SES-GO), no qual foram avaliadas as características clínico-epidemiológicas e moleculares relacionadas ao câncer da laringe. O presente estudo não observou associação entre os genes de biometabolismo de xenobióticos (*CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1*) e a suscetibilidade de câncer de células escamosas (CCE) de laringe. Adicionalmente, o estudo do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* revelou que indivíduos Pro/Pro desenvolveram câncer da laringe mais tardiamente do que os pacientes Arg/Arg e Arg/Pro. Comparando os grupos caso e controle, foi observado um risco maior de desenvolver câncer de laringe com a presença do genótipo Arg/Pro de 2,7 vezes. A frequência do genoma do HPV foi de 3% das amostras analisadas (HPV11 e 16/45), todos para indivíduos Arg/Arg. O CCE de laringe, no presente estudo, acometeu 3,5 vezes mais homens, do que mulheres. Os pacientes com hábitos tabagista e etilista crônicos e concomitantes apresentam uma sobrevida consideravelmente menor, quando comparados aos pacientes que não apresentam tais hábitos em um intervalo de 6 anos. Adicionalmente, a sobrevida geral da laringe foi de aproximadamente 66% em seis anos. Tal observação está diretamente relacionada aos hábitos tabagistas e etilistas concomitantes, reforçando a participação desses fatores na iniciação e progressão do CCE de laringe. Alterações adicionais em regiões previamente estudadas e a investigação de outros fatores associados aos carcinomas laríngeos poderão vir a ser ferramentas importantes na estimativa do prognóstico da progressão tumoral e, conseqüentemente, na melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

Palavras-chaves: xenobióticos, epidemiologia, fatores de risco, *Odds ratio* e sobrevida.

ABSTRACT

VASCONCELOS, P.M.F. **Profile genotypic and Epidemiology of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. 2016. 115p. Doctoral Thesis in Health Sciences**, Federal University of Goiás, Goiânia, 2016.

The larynx has important functions in the body, such as speech and breath. A particular pathology that affects this anatomical site will bring serious physiological problems, having a significant impact on quality of life of the patient. The aim of this study was to evaluate the clinical and epidemiological data, social-demographic and molecular patients diagnosed with squamous cell carcinoma (SCC) of the larynx of the Registro de Câncer de Base Populacional of Goiania (RCBP) of the Associação de Combate ao Câncer in Goiás (ACCG), analyzing the data of 63 patients followed over a period of 6 years. This study was conducted at the Núcleo de Pesquisa Replicon (PUC-GO) and LaGene (SES-GO), in order to evaluate the clinical and epidemiological characteristics and molecular related to cancer of the larynx. This study found no association between biometabolism genes of xenobiotics (CYP1A1, GSTM1 and GSTT1) and susceptibility to SCC of the larynx. Additionally, the study of polymorphism in codon 72 of TP53 revealed that individuals Pro/Pro develop cancer of the larynx later than the Arg/Arg and Arg/Pro patients. Comparing the case and control groups were observed an increased risk of developing cancer of the larynx in the presence of the Arg/Pro genotype 2.7 times. The HPV genome rate was 3% of analyzed samples (HPV16/45 and HPV11), all for Arg/Arg individuals. The SCC larynx, in this study, occurred 3.5 times more men than women. Patients with tobacco habits and chronic alcoholic and concomitant feature a significantly lower survival compared to patients without such habits at an interval of six years. Additionally, the overall survival of the larynx was approximately 66% in six years. This observation is directly related to smoking and concomitant alcoholic habits, strengthening the participation of these factors in the initiation and progression of SSC larynx. Additional changes in previously studied areas and the investigation of other factors associated with laryngeal carcinomas can be important tools in estimating the prognosis of tumor progression and hence improving the quality of life of patients.

Key words: *xenobiotics, epidemiology, risk factors, Odds ratio and survival.*

1 INTRODUÇÃO

O câncer constitui um problema mundial de saúde pública, sendo apontado como segunda causa mais frequente de óbito na população conforme dados do Instituto Nacional do Câncer, Brasil (INCA). A palavra câncer tem sua origem no termo grego *karkínos* (caranguejo) e constitui uma doença genética, na qual as células multiplicam-se desordenadamente, invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2014). Este crescimento celular desordenado é resultante do acúmulo de alterações genéticas e/ou epigenéticas em genes que participam do controle do crescimento, proliferação e diferenciação celular; estabilidade e reparo do DNA; imunidade; quimiorresistência às drogas e apoptose, morte celular programada (INCA, 2014; SILVA, 2003).

Um dos sítios anatômicos acometidos pelo câncer é a laringe. Esta constitui-se de um tubo de forma regular com 4cm de comprimento, que conecta a faringe à traquéia e possui importante função respiratória e fonatória. Localiza-se entre a traquéia e a base da língua, é separada pela epiglote e divide-se em três compartimentos heterogêneos: subglote, glote e supraglote. Suas paredes contêm um esqueleto formado por uma série de estruturas cartilaginosas, conectadas por tecido conjuntivo fibroelástico (ROBBINS, 2012; MOORE, 2000).

O tecido cartilaginoso forma o arcabouço da laringe e tem como função mantê-la aberta para o fluxo do ar e ofertar suporte às pregas vocais, sendo estas classificadas em dois tipos: hialinas (tireóidea, cricóidea e a maior parte das aritenóideas) e as elásticas (epiglote, ápice e processo vocal das aritenóideas, corniculadas e cuneiformes (ROBBINS, 2012; MOORE, 2000).

A mucosa da laringe forma dois pares de pregas que fazem saliência para o interior de sua cavidade. O primeiro par, superior, é constituído das pregas vestibulares. A lâmina própria dessa região é frouxa e contém numerosas glândulas mucosas. O segundo par, inferior, constitui-se das pregas vocais que apresentam o músculo vocal, tireoaritenóideo. O fluxo de ar passa pela cavidade laríngea, em alta velocidade, e com a contração de músculos modifica a abertura das pregas vocais condicionado-as a produção de sons com diferentes timbres (ROBBINS, 2012).

O perfil histológico ao longo da cavidade da laringe não é uniforme. Na face ventral e parte da face dorsal da epiglote, bem como nas pregas vocais, o epitélio está sujeito a atrito e desgastes, sendo, portanto, um epitélio escamoso estratificado. Nas demais regiões é do tipo pseudoestratificado ciliar colunar, onde os cílios deslocam o muco produzido pelo epitélio respiratório em direção a faringe para ser deglutido. A lâmina própria é rica em fibras elásticas e contém pequenas glândulas do tipo misto. Essas glândulas não são encontradas nas pregas vocais (MOORE, 2000).

Na laringe não se identifica uma submucosa bem definida. O crescimento celular desordenado na laringe pode resultar em diferentes tipos de câncer, de acordo com o perfil histológico acometido. Cerca de 95% são do tipo carcinoma de células escamosas (CCE) e os 5% restantes adenocarcinomas e alguns sarcomas, a exemplo dos condrossarcomas (MOORE, 2000; ROBBINS, 2012).

O câncer de laringe é mais incidente em homens, com idade acima dos 40 anos e tem como principal fator de risco o uso de tabaco, que quando associado ao álcool tem o risco potencializado. Dentre os outros fatores de risco descritos, tem-se: histórico familiar; má alimentação; situação socioeconômica desfavorável; exposição a produtos químicos, pó de madeira, fuligem ou poeira de carvão e vapores da tinta; inflamação crônica causada por refluxo gastroesofágico e pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) (INCA, 2014; CURADO, HASHIBE et al, 2009). Estima-se que a infecção pelo HPV no sítio laríngeo esteja associada a

cerca de 25% dos CCE de laringe. Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), há evidências suficientes de que subtipos específicos de HPV participam da carcinogênese do CCE de laringe (PINTO et al., 2011).

No mundo, o câncer de laringe corresponde, aproximadamente, a 3% de todos os casos, sendo o sexto tipo mais comum da doença (IARC, 2014). Dados recentes apontam para a ocorrência de cerca de 160 mil novos casos/ano e para 83 mil óbitos/ano. No Brasil, este tipo de câncer responde por cerca de 2% de todos os cânceres e por 25% dos casos de câncer de cabeça e pescoço (CCP). No Estado de Goiás, em 2014, foram registrados 150 casos de câncer de laringe, sendo 120 em homens e 30 em mulheres. Já na capital do Estado, Goiânia, foram registrados três casos em homens e um caso em mulheres (INCA, 2014).

O câncer de laringe, quando diagnosticado nos estágios iniciais, possui bom prognóstico com elevado percentual de cura, 80% a 100% dos casos (INCA, 2014). Porém, o tratamento desta doença promove mudanças importantes que reduzem a qualidade de vida dos indivíduos afetados, comprometem suas atividades diárias e, em muitos casos, levam à consequências e complicações graves, incluindo o óbito (GALBIATTI et al., 2013).

Segundo a IARC (2014), os casos de câncer no mundo deverão aumentar em 75% até 2030. E apesar dos constantes progressos na detecção da etiologia, patogênese e prognóstico dos carcinomas, o tema ainda necessita de elucidações. Neste aspecto, os estudos epidemiológicos e genético-moleculares que investigam as mutações associadas à iniciação e progressão dos diferentes CCP, incluindo os laríngeos, consistem em importantes ferramentas para a compreensão dos mecanismos carcinogênicos subjacentes ao desenvolvimento tumoral (BRAY et al., 2012).

Desta forma, o presente estudo buscou caracterizar, genotipicamente e epidemiologicamente, o CCE de laringe, sua relação com o Papiloma Vírus Humano (HPV) e o perfil polimórfico em pacientes de um hospital oncológico referência na Região Centro-Oeste do Brasil. Os resultados desta pesquisa podem contribuir para uma melhor compreensão da gênese deste carcinoma entre os pacientes assistidos pela referida instituição de saúde e, conseqüentemente, subsidiar a promoção da saúde e medidas necessárias para a instituição de condutas adequadas tanto preventivas como terapêuticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CONSIDERAÇÕES HISTÓRICAS

Há registros da presença de doença neoplásica em múmias em papiros egípcios do século VII a.C., a exemplo de um tumor maxilar datado em 4.000 a.C. Desta época até o século XVI, os conhecimentos sobre o câncer sustentavam-se no desequilíbrio dos fluídos corpóreos e/ou um desequilíbrio do sistema linfático (INCA, 2012; NASCIMENTO, 2003).

No século XVIII, os estudos do anatomista italiano *Giovanni Battista Morgagni* somados aos da médica francesa *Marie François Xavier Bichat*, nortearam o entendimento do câncer para uma espécie de unidade específica localizada em uma parte do corpo e que os órgãos eram constituídos por diferentes tecidos que, por sua vez, podiam ser afetados por diferentes tipos de câncer. Ainda neste período, o médico *Joseph Claude Anthelme Recamier* foi o primeiro a identificar um caso de metástase que usou a corrente sanguínea para se disseminar (NASCIMENTO, 2003).

Mas somente por volta de 1860, com os avanços envolvendo a pesquisa celular, que o câncer ganhou impacto no advento da cirurgia, devido a possibilidade de uso de anestésicos e do emprego de técnicas de assepsia e antissepsia, aplicadas na época pelo cirurgião *Joseph Lister*. Com o aumento do conhecimento e a evolução na abordagem das técnicas cirúrgicas, começaram a surgir os primeiros casos com sucesso de remoção de tumores (MITELMAN, 2000; MIMEAUT et al., 2006).

Em 1890, o médico patologista alemão *David Von Hanseemann* observou irregularidades nucleares e mitóticas estudando biópsias de tumores malignos. No início do século XX, em 1902, o norte-americano *Walter Sutton* e o alemão *Theodor Boveri* chamaram a atenção para o fato de que as regras de herança mendeliana seriam explicadas pelo comportamento dos cromossomos na meiose, permitindo a proposição da Teoria Cromossômica (MITELMAN, 2000; MIMEAUT et al., 2006; INCA, 2013).

A Teoria Cromossômica, debatida entre o período de 1902-1915, contribuiu para o entendimento de questões relacionadas à hereditariedade, sugerindo que os fatores hereditários propostos por Mendel, estariam presentes nos cromossomos. Em 1914, *Theodor Boveri* apresentou a Hipótese da Teoria Clonal do Câncer que postulou o desenvolvimento de tumores malignos a partir de um clone originado de uma célula que apresentava cromossomos anormais. A hipótese de *Theodor Boveri* foi confirmada na década de 1960, mediante estudos das células neoplásicas, constituindo-se um marco inicial, a descrição do cromossomo *Philadelphia (Ph1)* nas leucemias mielóides crônicas (PORTIN, 2000; MARTINS, 2002).

Na década de 1970, a prática das técnicas citogenéticas de bandeamento cromossômico humano bem como a avaliação genético-molecular do CCP, contribuíram de maneira significativa para a compreensão do papel das aberrações cromossômicas associadas à sua oncogênese (SANTOS et al., 2009; MITELMAN, 2011).

Outra técnica, denominada FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*), propiciou progressos no mapeamento gênico e na investigação cromossômica, tornando-se uma ferramenta importante para a identificação das aberrações cromossômicas nos diversos tipos de câncer. Os resultados desta aplicação foram a revelação de mais de 600 rearranjos cromossômicos balanceados associados às neoplasias, bem como a descrição de mais de centenas de genes envolvidos em rearranjos, que podem estar associados aos diversos tipos de câncer (GAUDET et al., 2010; NOZAWA, 2006; SANTOS, 2002).

O conhecimento adquirido cronologicamente por meio do desenvolvimento científico levou a constatação da importante participação dos fatores de risco exógenos e endógenos na modulação da complexa carcinogênese dos tipos CCP, em especial, o CCE de laringe. A realização de estudos genético-moleculares e epidemiológicos deste tipo são necessários para a instituição de condutas adequadas tanto preventivas como terapêuticas (CONWAY et al, 2010;; CHUANG et al., 2012).

2.2. CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO (CCP)

O CCP constitui um grupo de diferentes tipos de câncer que acometem tecidos e órgãos localizados nestas áreas anatômicas, como a laringe. Sua incidência e mortalidade são avaliadas de acordo com os sítios acometidos e reflete, frequentemente, a distribuição geográfica de fatores de risco específicos. O estudo destes fatores é fundamental para melhor caracterizar epidemiologicamente os diferentes tipos de câncer que constitui o grupo CCP (INCA, 2013; JEMAL et al., 2011; CURADO, 2000).

O perfil histológico mais comum dentre os tipos de CCP é o carcinoma de células escamosas ou espinocelular, responsável por cerca de 95% dos casos, a exemplo do CCE de laringe. Sua representação é singular na saúde pública, sobretudo, por afetar uma região anatômica onde funções vitais como a fala e a deglutição estão relacionadas (TRIBIUS et al., 2013; CURADO, HASHIBE, 2009;).

2.3. LARINGE: HISTOLOGIA E ANATOMIA

A laringe é um órgão com localização na via aérea inferior, na parte antero-inferior à faringe e superior à traquéia. Anatomicamente, a laringe contém três regiões: supraglótica, glótica e subglótica. Embriologicamente, a região supraglótica tem origem nos 3º e 4º arcos faríngeos que correspondem ao segmento buco-facial do embrião. As regiões glótica e subglótica, por outro lado, tem sua origem no 5º e 8º arcos faríngeos, correspondentes ao segmento pulmonar do embrião (TORTORA, 2002; DÂNGELO, FATINI, 2001; HAAST, 1975).

A laringe é dividida quanto às irrigações sanguínea e linfática. A região supraglótica é irrigada pela artéria laringéia superior, ramo da carótida, e as regiões glótica e subglótica são irrigadas pela artéria tireoidiana inferior, ramo da subclávia. Os linfonodos, abundantes na região supraglótica, drenam pela membrana tiro-hióidea para os linfonodos médios e superiores da cadeia jugular. Os linfonodos da prega vocal, evidentemente mais escassos, drenam pela membrana crico-tiróidea para os linfonodos médios e profundos da cadeia jugular.

A região glótica anterior possui rede linfática que drena pela parte superior da membrana crico-tireóidea, para o linfonodo pré-laríngeo ou de *Delphian* (TUCKER, 1976).

O linfonodo pré-laríngeo localiza-se na parte anterior da membrana crico-tireóidea, acima do istmo da glândula tireóide, recebendo linfonodos da parte anterior das pregas vocais e das partes superior e anterior da glândula tireóide. A disseminação de células neoplásicas via linfonodo pré-laríngeo é conhecida como metástase linfonodal contra-lateral. A mucosa da laringe é contínua com a da faringe e da traquéia. O órgão apresenta dois tipos de epitélios: o escamoso não-queratinizado, acima das pregas vocais, e o pseudoestratificado com células caliciformes, recobrando o restante da laringe. As glândulas seromucosas da laringe são encontradas por toda a lâmina própria, com exceção a nível das cordas verdadeiras (KIERSZENBAUM, 2004; TORTORA, 2002;).

A laringe é situada no plano mediano e anterior do pescoço, apresentando-se como um órgão tubular da via aérea superior, de consistência multicartilaginosa, revestida por tecido epitelial, posicionada anteriormente à faringe e continuada diretamente pela traquéia. Anatomicamente é dividida em três regiões distintas: a *região supraglótica* é caracterizada pela face laríngea da epiglote, pelas pregas ariepiglóticas, pelas falsas pregas vocais e pelos ventrículos laríngeos ou ventrículos de *Morgagni*, notando-se que o assoalho do ventrículo é parte da região glótica, enquanto sua parede lateral e teto estão na supraglote. O termo epilaringe tem sido usado para designar o conjunto de duas porções marginais da supraglote: a porção suprahióidea da epiglote e as pregas ariepiglóticas (DÂNGELO, FATINI, 2001).

Os cornos superiores unem-se à extremidade do corno maior do osso hióide. Na parede lateral da cartilagem tireóide observa-se um ponto de inserção para os músculos constritores inferior da faringe, esternocleidomastóideo e tíreo-hióideo, denominada linha oblíqua (KIERSZENBAUM, 2004). A cartilagem cricóide se apresenta em um formato semelhante ao de um anel de sinete e localiza-se no mesmo plano da sexta vértebra cervical, apresentando uma porção estreita anteriormente denominada arco. Na porção

posterior, o arco alarga-se, formando a lâmina cricóide. Na borda superior da lâmina cricóide existem duas facetas articulares, uma à esquerda e outra à direita, em relação às cartilagens aritenóides (KIERSZENBAUM, 2004). Na superfície posterior da lâmina verifica-se uma depressão bilateral, promovida pela inserção do músculo cricoaritenóideo posterior. Na região mediana desta superfície aparece uma crista decorrente da inserção do esôfago, através do tendão cricoesofágico. A borda inferior da lâmina cricóide marca o limite entre a laringe e a traquéia, assim como o limite entre a faringe e o esôfago. De cada lado, a cartilagem cricóide apresenta uma faceta lateral de articulação com o corno inferior da cartilagem tireóide (DÂNGELO, FATINI, 2001).

A cartilagem epiglótica se encontra posteriormente à raiz da língua e ao osso hióide, e anteriormente ao adito da laringe. As cartilagens aritenóides apresentam morfologia piramidal, com três superfícies: medial, posterior e antero-lateral, além do ápice e da base. As cartilagens corniculadas e cuneiformes estão localizadas junto às pregas ariteno-epiglóticas, onde as cartilagens cuneiformes ocupam a porção mais anterior quando comparadas com as cartilagens corniculadas (KIERSZENBAUM, 2004).

A laringe desempenha funções primordiais para a manutenção da vida do indivíduo. Suas principais funções em ordem de relevância são: proteção das vias aéreas, respiração e fonação. A laringe protege as vias aéreas durante a deglutição, coordena e otimiza as vias aéreas superiores durante a respiração e promove o controle da fonação por meio de mecanismos intrínsecos em conjunto com a faringe e as cavidades oral e nasal (SASAKI, WEAVER, 1997).

A função da laringe é de proteger a via aérea inferior contra o fluxo de corpos estranhos, alimentos e líquidos através da elevação da laringe, abaixamento da epiglote e o fechamento da glote. Caso o fechamento não aconteça, reflexos como o de tosse ou outros movimentos respiratórios para a retropulsão são acionados com o intuito de eliminar os corpos estranhos. O fechamento da entrada da laringe ocorre pelo deslocamento das cartilagens

aritenóides de encontro com a epiglote. Este movimento é produzido pela contração dos músculos tiroaritenóideos, aritenóideos, ariepiglóticos e tiroepiglóticos. A contração dos músculos palatofaríngeos e estilofaríngeos promove a elevação e inclinação da laringe para frente. A oclusão das vias aéreas inferiores ocorre apenas durante o período que o alimento está passando pela faringe, que ao atingir o esôfago a laringe abre-se novamente (CASPER & COLTON, 1996).

Na função respiratória ocorre a abdução das pregas vocais o que permite a passagem do fluxo de ar para os pulmões ou sua saída. Os músculos cricoaritenóideos posteriores são responsáveis pela abertura da glote durante a respiração, visto que sua contração se relaciona aos processos vocais das cartilagens. O fechamento da região glótica garante a produção da tosse para a eliminação das secreções tráqueo-pulmonares (CONTI & FERNÁNDEZ, 1992).

Durante a fonação, a laringe é responsável pela geração de sons por meio dos movimentos de adução e abdução das pregas vocais e da vibração da mucosa que as recobre. A abertura da glote (abdução) ocorre pela contração dos músculos cricotireóideos posteriores, pela fixação da cartilagem tireóide, determinada pelos músculos extrínsecos e também pela ação moderadora dos músculos antagonistas, os adutores. A tensão e o alongamento das pregas vocais ocorrem pela contração dos músculos cricotireóideos, importante alvo de trabalho dos fonoaudiólogos na terapia fonética em pacientes laringectomizados parcialmente (LOFIEGO, 1994).

Os perfis histológicos presentes na laringe são: epitélio escamoso estratificado, que recobre a superfície do vestíbulo laríngeo (região da glote), toda a extensão das cordas vocais, denominadas pregas ariteno-epiglóticas e os ligamentos vestibulares e vocais; e o epitélio pseudoestratificado ciliar colunar, que recobre o restante da laringe. A maioria dos tumores que acometem a laringe surge na superfície desses epitélios, por isso, são denominados carcinomas de células escamosas (CURADO, & HASHIBE 2009; DÂNGELO, J.G. & FATINI, 2001).

Outros tecidos, além do tecido epitelial, podem ser acometidos por tumores como

por exemplo o tecido cartilaginoso, intensamente presente na laringe. Condrossarcomas e condromas são denominações habitualmente utilizadas para tumores malignos e benignos em cartilagem, respectivamente. Estes tumores são mais raros do que os tumores epiteliais e a cartilagem cricóide é a mais acometida (THOMÉ et al., 2001).

Dentre as diversas patologias que acomete a laringe, o câncer apresenta-se como uma das mais graves. O CCE, neoplasia mais comum que acomete este órgão, é uma doença multifatorial e multigênica, sendo influenciada por fatores ambientais e comportamentais inerentes ao indivíduo (OLIVEIRA, 2005).

2.8. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA LARINGE (CCE)

O carcinoma espinocelular (CEC) da laringe resulta do desenvolvimento neoplásico maligno envolvendo as células do epitélio escamoso estratificado, presente na porção superior do vestíbulo laríngeo, e no epitélio ciliar colunar pseudoestratificado, que recobre o restante da laringe. A maioria dos carcinomas da laringe é do tipo de células escamosas, que quase sempre se iniciam na corda vocal, como carcinoma *in situ*. Comumente, o câncer de laringe é uma lesão isolada, mas em alguns casos pode apresentar potencial multifocal de invasão. Por outro lado, o carcinoma verrucoso da laringe apresenta-se bem diferenciado, geralmente com agressividade local e crescimento lento e, geralmente, não é metastatizante (KASHIMA, 1987).

Os pacientes que apresentam CCE laríngeo apresentam os sintomas de odinofagia e rouquidão prolongada, o que sugere tumores na região glótica e subglótica. O câncer supraglótico está, muitas vezes, acompanhado por sinais e sintomas como, alteração na qualidade da voz, disfagia leve, sensação de um caroço na garganta e linfadenopatias. Em situações avançadas, além da rouquidão, podem ocorrer dores na garganta, intensa disfagia e dispnéia (INCA, 2012).

No encontro clínico após anamnese, durante o exame físico na realização da oroscopia e palpação cervical ou na realização de exames auxiliares, diante da evidência de tumores que acometem a região da cabeça e pescoço avalia-se principalmente a extensão loco-

regional do tumor, identificando a presença de outros tumores primários nesta região, assim como a detecção de metástases para linfonodos regionais. O tamanho e a localização do tumor são os parâmetros mais bem observados para o carcinoma da laringe. O tempo que marca o início dos sintomas e a presença de nódulo cervical são os principais fatores que definem o diagnóstico clínico das neoplasias da laringe (KOWALSKI et al., 2000).

O exame loco-regional, dá-se através de exames complementares, como exemplos podemos citar a laringoscopia indireta, a rinoscopia anterior e posterior. Para uma confirmação diagnóstica, a laringoscopia direta com biópsia deve ser realizada quando o exame indireto não permite uma melhor elucidação clínica (KOWALSKI et al., 2000).

2.4.1. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DA LARINGE

O câncer de laringe corresponde a 3% de todos os casos da doença no mundo, sendo o sexto tipo mais comum. Estima-se a ocorrência de cerca de 160 mil novos casos/ano e 83 mil óbitos/ano (IARC, 2014). No Brasil, este tipo de câncer responde por 2% de todos os cânceres e por 25% dos CCP. No ano de 2014, no Estado de Goiás, foram registrados 150 casos de câncer de laringe, sendo 120 em homens. Na capital Goiânia, foram registrados três casos em homens e um caso em mulheres (INCA, 2014).

Os tumores supraglóticos são mais frequentes nas pacientes do sexo feminino. Os tumores da região supraglótica dificilmente se propagam para a região glótica, apesar de não ter sido demonstrada nenhuma barreira anatômica que justifique esse comportamento. Possivelmente, a origem embriológica diferenciada dessa região e a separação das irrigações sanguínea e linfática sejam as razões pelas quais esses tumores raramente atravessam o ventrículo de *Morgagni* (APRIGLIANO & MELLO, 2006).

Os tumores da região glótica, são os mais frequentes entre as lesões malignas da laringe, tendo origem no epitélio escamoso da mucosa da prega vocal. Sua evolução é lenta, as metástases são tardias e seu principal sintoma é a disfonia, que surge precocemente.

Geralmente são precedidos por lesões histológicas do epitélio, denominadas pré-malignas, como a hiperplasia epitelial, que pode mostrar queratose em sua camada superficial, como também nas camadas mais profundas (disqueratose). Essas alterações são quase sempre respostas a inalantes externos, dentre os quais o fumo é o principal fator de risco (AUERBACH et al., 1970).

Um estudo epidemiológico realizado em Goiânia (Goiás), no período de 1988 a 1998, mostrou que o câncer de laringe era 4,7 vezes mais frequente em homens que em mulheres (SILVA, 2003). Este fato deve-se provavelmente, aos hábitos de tabagismo e etilismo, mais predominantes no sexo masculino, correspondendo aos fatores de risco que mais contribuem para a carcinogênese deste órgão (MENEZES et al., 2002).

2.4.2 CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL DA DOENÇA E ESTADIAMENTO

A Classificação Internacional de Doença (CID) é utilizada pelos países membros da Organização Mundial de Saúde (OMS). Sua aplicação na pesquisa oncológica, observando o aumento de estudos epidemiológicos, tem sido atribuído ao arquivamento organizado de prontuários e o uso da CID na orientação e organização dos dados de pacientes acometidos por câncer (PERCY et al., 1996).

A CID-O permite a codificação de todas as neoplasias por topografia, histologia ou morfologia e comportamento biológico, como por exemplo, maligno, benigno, *in situ*, incerto se benigno ou maligno e metastático. Contudo, a CID-O não apresenta códigos para outros tipos de informação, como: estadiamento clínico, extensão da doença, lateralidade, método de diagnóstico e tratamento (PERCY et al., 1996).

O sistema TNM foi adotado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), em 1950, assumindo a responsabilidade desse sistema de estadiamento. A classificação TNM utiliza informações acerca da extensão do tumor primário (T), da ausência ou presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais (N) e de possíveis metástases à distância (M). Atualmente, o estadiamento TNM é a base para a orientação terapêutica e prognóstico do

tratamento oncológico (NORONHA & DIAS, 1997). Contudo, nem mesmo o TNM é capaz de prever o comportamento biológico individual (LOURENÇO, 2007; MONTORO et al. 2008).

A escolha do tratamento envolve o paciente e uma equipe multidisciplinar e multiprofissional (ACS, 2002). Atualmente, diferentes modalidades terapêuticas para o CCE da laringe são utilizadas: 1. A radioterapia é indicada para pacientes em estádios iniciais da doença, no qual a presença de pequenas lesões pode ser observada. Esta é a mais importante estratégia de controle locorregional do CCE de laringe; 2. Os procedimentos cirúrgicos são indicados para os casos mais avançados da doença, podendo ser dividida em duas categorias; a laringectomia parcial, que remove apenas parte da laringe e a laringectomia total, que consiste na remoção total da laringe; 3. A quimioterapia é normalmente utilizada em casos de metástases, com intuito paliativo. As três categorias de tratamento podem ser combinadas de acordo com as necessidades de cada paciente (INCA, 2012).

A cirurgia é considerada um tratamento agressivo, podendo o paciente, inclusive, perder a voz completamente. Segundo dados do INCA, apenas 30% dos pacientes laringectomizados são capazes de restabelecer um padrão vocal esofágica inteligível. Cerca de 50% deles se retiram do convívio social incorrendo com frequência em desordens psiquiátricas, afastamento ocupacional e desemprego (NORONHA & DIAS, 1997). Atualmente técnicas cirúrgicas, com associação da robótica, auxiliam numa intervenção mais precisa e reduzem a taxa de traqueostomia o que permite uma recuperação mais rápida de funções como a da deglutição e redução no período de internações incorrendo em redução de infecções relacionadas à saúde (IRAS). A mortalidade e morbidade associadas ao CCE de laringe permanece elevada, causando impacto sobre a qualidade de vida e o custo de tratamento dos pacientes (DASGUPTA et al., 2012; HANS et al., 2012).

Por isso o conhecimento sobre a epidemiologia, promoção e prevenção, orientações sobre os fatores de proteção e de risco, diagnóstico precoce e tratamento são imprescindíveis para o rastreamento, detecção e intervenções satisfatórias. Quando diagnosticado em estágios

iniciais, o câncer de laringe possui um bom prognóstico com alto percentual de cura (80% a 100%) (CARVALHO et al., 2004; CHIN et al., 2004; PARKIN et al., 2005; HADDAD & SHIN, 2008).

2.4.3. SOBREVIDA

A sobrevida em média dos pacientes com CCE de laringe é de 5 anos, em 50% dos casos, permanecendo com este perfil nos últimos 50 anos, apesar dos avanços tecnológicos. Nas últimas décadas, tem se verificado a progressiva ascensão das doenças crônico-degenerativas. Estudos demonstram que pacientes com CCE de laringe avançado e resposta tumoral à quimioterapia neoadjuvante têm satisfatória taxa de cura. Isto é importante no que se refere ao emprego de uma terapêutica com menor nível de toxicidade (INCA, 2013; HADDAD et al., 2008). O diagnóstico precoce é o meio mais eficaz de que se dispõe para melhorar o prognóstico do CCE de laringe e consequentemente aumentar a taxa de sobrevida. Pois quanto mais tardiamente diagnosticado, o tratamento envolverá intervenções mais agressivas (SASSI et al., 2010; RODRIGUEZ, 2010).

A realidade atual revela-nos que mais da metade dos casos de CCE de laringe tem sido diagnosticada em estágios avançados com drásticas reduções na taxa de sobrevida. Esse cenário é justificado por: profissionais de saúde desinformados ou sem habilidade para orientar corretamente; população pouca informada e com restrição de acesso à informações sobre o tema e pacientes que não procuram o profissional por medo do diagnóstico ou somente o procuram quando já sofrem alguma sintomatologia restritiva como disfagia, disfonia, rouquidão, tosse, dentre outras (HONORATO et al., 2009; MURTHY et al., 2010; INCA, 2014).

Outro aspecto que envolvem a redução na sobrevida dos pacientes é a associação de comorbidades e fatores sociais que impactam o sucesso do tratamento, incluindo a baixa adesão, acesso restrito aos cuidados de saúde e os recursos limitados da gestão pública

destinados às terapêuticas (SANTOS et al., 2011). A avaliação da sobrevida é complexa, pois a mesma depende de fatores associados, não somente às características individuais, mas também daqueles pertinentes às características demográficas de cada região brasileira. Tal fato direciona para um olhar crítico e amplo sobre a abordagem e a avaliação das disparidades dos territórios, regionalismos culturais, a fim de estabelecer planejamentos acertivos que possam incrementar ações em saúde consistentes, voltadas para as pessoas e pacientes, alcançando resultados mais satisfatórios na prevenção e no cuidado ofertado, levando a um grau de resolutividade e melhora dos indicadores de sobrevida em Goiânia, Goiás e no Brasil.

2.5 FATORES DE RISCO

O termo risco refere-se à probabilidade de um evento indesejado ocorrer. Do ponto de vista epidemiológico é utilizado para definir a probabilidade de que indivíduos sem uma doença específica, mas que expostos a determinados fatores de risco (FR) podem desenvolver a patologia. Nos CCE de laringe parece haver dois comportamentos biológicos diferentes desse tipo de neoplasia: uma relacionada a fatores como álcool e tabaco, e outra relacionada ao HPV. Além desses, pode-se dizer que características genéticas individuais também contribuem para o efeito de uma substância ou agente agressor como responsável por uma neoplasia maligna (ACS, 2006; APRIGLIANO, 2006; JOHNSON, 2001; WHO, 2014).

Os fatores de risco para o CCE de laringe podem ser de ordem extrínseca, que incluem: o tabagismo, passivo ou ativo; o etilismo; a radiação solar; Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST); infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV); exposição a produtos químicos, pó de madeira, fuligem ou poeira de carvão e vapores da tinta; traumas recorrentes e condições ocupacionais, situação socioeconômica desfavorável. Entre os de ordem intrínseca encontram-se: a inflamação crônica da laringe causada pelo refluxo gastroesofágico (RGE); a desnutrição ou a anemia por deficiência de ferro e a predisposição herdada ou polimorfismo genético. O conhecimento acerca da suscetibilidade individual para o desenvolvimento do câncer tem crescido, e muitos estudos têm mostrado a interação gene-ambiente na

carcinogênese (AUERBACH et al., 1970; GOMES-CARNEIRO et al., 1997; REGEZI, 2000; INCA, 2014).

2.5.1. TABAGISMO

Segundo a *World Health Organization* (WHO), o tabagismo, isoladamente, é a mais relevante causa de câncer no mundo (WHO, 2014). O uso do tabaco teve início por volta do ano 1.000 *a.C* nas sociedades indígenas da América Central, chegando ao Brasil possivelmente por tribos *tupi-guarani*. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de tabaco em folha, ficando atrás apenas da China (REGEZI, 2000; WHO, 2014). Sua apresentação e uso é diversa, da inalação (cigarro, cachimbo, charuto e cigarrilha), aspirado (rapé) ou massado (fumo de rolo), segundo informações do Ministério da Saúde (CANEVARI & ROGATTO, 2004).

Outras formas de consumo do tabaco, além das mais conhecidas, estão o *Paan* (folhas de bétel, planta com origem na Índia, enroladas com lima, castanha de areca, condimentos, adoçantes e fumo), o bétel (que é um produto apimentado, à base de fumo, usado para mascar) e o bidi (cigarros com aproximadamente 0,2g de fumo grosseiramente enrolados em folhas de árvores) (KUMAR et al., 2008; MENEZES et al., 2002; ABDO et al., 2001).

O tabaco *Nicotiana tabacum* é uma planta da qual além da nicotina, são extraídas cerca de 4.700 substâncias tóxicas, destas 60 são consideradas carcinogênicas. Os principais agentes carcinogênicos do tabaco podem ser alocados em três grupos: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas e as N-nitrosaminas (ACHUTTI; MENEZES, 2001; KIM et al., 2003; GANDINI et al., 2008; INCA, 2012; LEE et al., 2008;).

2.5.2. ETILISMO

O etanol, o álcool presente nas bebidas alcoólicas, é produzido tanto por fermentação como pela destilação de vegetais, frutas e grãos. O consumo deste tipo de bebida é um hábito milenar, que permeia a história e cultura dos povos. A identificação dos segmentos

populacionais mais vulneráveis ao consumo abusivo de álcool tornou-se relevante, pois a elevada prevalência do consumo deste que o torna um problema de saúde pública, com abrangência mundial (WHO, 2012).

No Brasil, observou-se uma forte relação entre o consumo excessivo e diário de álcool e o risco de câncer CCE de laringe. Uma relação direta entre dose e efeito, de acordo com quantidade de ingesta, tempo de duração e consumo de álcool, pode ser estabelecida como FR para o CCE de laringe. Observa-se que em 60% dos casos de CCE de laringe os indivíduos são etilistas e o uso simultâneo de álcool e tabaco aumenta em até 15 vezes o risco da doença (SZYMAŃSKA et al., 2011).

Outro fator muito importante refere-se ao aumento da ingesta para ambos os sexos. Entre 2006 e 2009, foi observado um aumento na proporção de mulheres (12,4% para 19,8%) que consomem bebida alcoólica de uma a três vezes por semana em todas as regiões brasileiras, particularmente na Região Centro-Oeste (CASTELLSAGUÉ et al., 2004). O álcool é metabolizado em acetaldeído pelas chamadas álcool-desidrogenases (*ADH*) e, a seguir, em ácido acético pelas aldeído-desidrogenases (*ALDH*). Tais conversões são realizadas principalmente no fígado e também no trato respiratório superior, onde localiza-se a laringe. Há evidências de que polimorfismos genéticos associados às formas *ADH1B* e *ADH1C*, além de *ADH7* e *ALDH2*, estão caracterizados como fator de risco para neoplasias do trato respiratório superior, CCE de laringe (CANOVA et al., 2009).

O consumo crônico do etanol compromete a consolidação de uma barreira de proteção pelas células epiteliais facilitando a entrada de agentes carcinógenos do tabaco, interferindo de forma deletéria no processo de replicação do DNA (CHOI et al., 2008; HASHIBE et al., 2007; HASHIBE et al., 2009; MARRON et al., 2010).

2.5.3. TABAGISMO E ETILISMO: SINERGISMO

A exposição crônica e associada do tabaco e álcool interfere na biodisponibilidade de carcinógenos e no grau de agressão bioquímica e molecular no sítio laríngeo. Substâncias

como as nitrosaminas, encontradas na fumaça do tabaco denominadas de pré-carcinógenos, necessitam ser metabolizadas para exercerem sua função deletéria ao organismo. Quando ocorre ativação metabólica de pré-cancerígenos, os produtos formados, geralmente, são agentes eletrofílicos capazes de reagir com o DNA e incorrer em mutações importantes para a ocorrência do CCE de laringe (AUDI & PUSSI, 2000; VISONI, 2009).

2.5.4. PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV)

O HPV foi identificado em 1949, até o momento, há mais de 200 subtipos descritos. Etimologicamente este vírus pertence à família *Papillomaviridae*, caracterizada por um diverso grupo de pequenos vírus não encapsulados capazes de infectar células epiteliais cutâneas e mucosas. Possuem aproximadamente 55nm de diâmetro e uma cadeia dupla de DNA com um genoma de cerca de 8.000 nucleotídeos limitados por histonas celulares. Os subtipos de HPV dividem-se de baixo ou alto risco, de acordo com o seu potencial de malignidade (LETO et al., 2011; FELLER et al., 2010; MARKLUND et al., 2011; MCLAUGHLIN-DRUBIN et al., 2012; BETIOL et al., 2013).

Este vírus pode causar o condiloma acuminado (do grego *kondilus* = tumor redondo, e do latim *acuminare* = tornar pontudo), também conhecido como crista de galo ou verruga venérea. Em 1996, a WHO já considerava o HPV como uma importante causa de câncer cervical, com prevalência de cerca de 99,7% dos casos em todo mundo (CASTRO et al, 2004). A infecção pelo HPV é altamente transmissível, tem um período de incubação variável, e pode culminar numa infecção latente com baixo potencial de transmissão, em infecção subclínica ativa sem sinais clínicos ou em infecção clínica com potencial de desenvolvimento de lesões benígnas ou malignas (FELLER et al., 2010; SILVA et al., 2011; HAUSEN, 2009; MARTÍN-HERNÁN et al., 2013).

Dentre as DSTs, a infecção pelo HPV é a mais comum, na sua maioria assintomática e eficientemente controlada pelo sistema imunológico. Estima-se que cerca de 2/3 das pessoas que tenham contato sexual com portadores do vírus serão infectadas. A infecção oral pelo HPV

dá-se por contato oro-genital ou salivar (FELLER et al., 2010; SILVA et al., 2011). O HPV é considerado um vírus com genes que codificam proteínas com potencial oncogênico. São vários os subtipos de HPV relacionados as lesões em cavidade oral benígnas e malignas. Os subtipos mais associados ao desenvolvimento do câncer oral são os HPVs 16 e o 18 com relevância para o 16 (RAUTAVA et al., 2012; SYRJÄNEN et al., 2011; ISAYEVA et al., 2012; CHATURVEDI, 2012; NELKE et al., 2013). A IARC avaliou a participação do HPV na tumorigênese e concluiu que há evidências suficientes sobre o papel subtipo 16 na carcinogênese do CCE de laringe (RAGIN et al., 2007; IARC, 2014).

Os genomas dos HPVs subtipos 16 e 18, caracterizados como de alto risco oncogênico, possuem genes, cujos produtos correspondem a duas oncoproteínas (E6 e E7), quando expressas nas células epiteliais infectadas pelo HPV, E6 e E7, vão implicar no aumento de proliferação e diferenciação. Quando estas oncoproteínas são expressas a partir das células com HPVs de baixo risco, a sua ativação pode induzir tumores benignos. Por outro lado, em uma infecção de células com HPVs de alto risco, estas oncoproteínas podem de induzir lesões epiteliais como displasias e câncer (PINTO et al., 2011; FELLER et al., 2010;). Nas células infectadas pelos HPVs de alto risco, a oncoproteína E6 induz a inativação do gene supressor tumoral, *p53*, enquanto oncoproteína E7, pertencente à família de proteínas Rb, induz a inativação da apoptose.

A instabilidade genômica se agrava por efeitos aditivos de um ou mais co-fatores, o que conduz a um crescimento preferencial das células afetadas que se caracteriza por um incremento progressivo e descontrolado do tumor (D'SOUZA et al., 2007; FELLER et al., 2010; FARIDI et al., 2011; CHATURVEDI, 2012). O papel da predisposição genética no CCE de laringe tem sido bem documentado através de estudos das síndromes de múltiplos neoplasmas, estudos de múltiplos tumores primários e estudos da história familiar de câncer (TRIZNA & SCHANTZ, 1992; SPITZ et al., 1994; BONDY et al., 1993, CANOVA et al., 2009, SORIANO et al., 2011).

2.5.5 ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS, SAÚDE BUCAL E DIETA

Os pacientes com CCE de laringe, segundo alguns estudos, estão associados com piores condições sócio-econômicas, nível de escolaridade menor ou igual a 7 anos, desnutrição, histórico de familiares de primeiro grau com CCP, saúde bucal insatisfatória, exposição às doenças periodontais recorrentes e às doenças infecciosas virais e bacterianas e, consequentemente a ciclos contínuos de reparo tecidual e inflamação (BISHT & BIST, 2011; D'SOUZA et al, 2007; PRADO et al., 2010).

Outros fatores como perda da dentição precoce e o trauma mecânico crônico podem contribuir para o desenvolvimento de neoplasias na cavidade oral, pois levam a alteração e desequilíbrio da microbiota oral, favorece a redução de nitritos à nitratos e a produção de acetaldeído, estes produtos podem influenciar na replicação do DNA, secundário aos efeitos na superfície do epitélio decorrentes do aumento da frequência de divisões celulares no tecido (KARIN et al., 2006; ABNET et al., 2005). A atividade ocupacional tem merecido destaque nos estudos em oncologia, nos quais o nexo-causal associa fatores etiológicos para o CCE de laringe, tais como: exposição ocupacional ao amianto, fumos de solda, sílica cristalina livre respirável, fuligem (de carvão mineral, coque, madeira e óleo combustível), fumos em geral e contato com animais (INCA, 2011).

A carência de folato, presente em frutas e vegetais e o elevado consumo de carne vermelha estão associados ao aumento do risco de vários tipos de câncer, entre eles o CCE de laringe, pois existem carcinógenos que podem interferir na síntese, reparo e metilação do DNA (DUTHIE, 2011). Por outro lado, a dieta rica em cereais integrais, frutas e verduras, e pobre em alimentos processados, associada a um estilo de vida saudável pode proteger o indivíduos contra danos oxidantes no DNA, uma vez que esses alimentos possuem propriedades antioxidantes e anticarcinogênicas protetoras (PAVIA et al., 2006; PRADO et al., 2010;).

Uma pequena parcela de pacientes com CCE de laringe, cerca de 10%, são indivíduos que nunca fumaram ou beberam ou tiveram exposição significativa a esses fatores

de risco, ambientais e/ou ocupacionais. No entanto este grupo de pacientes sofreu forte influência de eventos como a infecção oral pelo HPV e a herança genética no desenvolvimento do CCE de laringe (D'SOUZA et al., 2007).

2.6 ASPECTOS GENÉTICO-MOLECULARES

Dentre os fatores de ordem molecular e genética descritos como predisponentes e que elevam a suscetibilidade individual ao desenvolvimento de neoplasias malignas estão: os genes *p53*, *TP21* e a *TP16*, *telomerase*, *bcl-2*, entre outros, como a presença ou associação de vírus oncogênicos, como o HPV e o EBV (*Epstein-Barr Virus*) (WALL et al., 2007; VENTURY et al., 2004; FELLER et al., 2009; WHO, 2012).

A biotransformação de xenobióticos, como tabaco e álcool, envolvem reações bioquímicas específicas, em que cada etapa conta com a participação de cascatas enzimáticas altamente ordenadas. Uma anormalidade nos genes codificadores da produção enzimática responsável pela biotransformação desses xenobióticos pode gerar alteração quanto a sua biodisponibilidade e excreção (AUDI, 2000).

Um grupo de genes responsável pela codificação dessas enzimas que ajudam na eliminação de xenobióticos são os do sistema citocromo P450. Porém, ao que parece, o processo é extremamente complexo, uma vez que existem dezenas de polimorfismos da família citocromo P450 (AUDI, 2000).

As variações mais comuns entre os indivíduos são do tipo Polimorfismo de um Único Nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphisms* - *SNP*), nas quais a diferença encontrada envolve uma única base no DNA que, durante o processo de codificação, poderá ou não dar origem a uma enzima (NURFADHLINA et al., 2006). Fatores raciais têm sido importantes para detectar a frequência de um determinado polimorfismo estudado. Assim, alguns polimorfismos podem sofrer grandes variações quando comparados entre populações distintas (SORIANO et al., 2011).

Uma nomenclatura especial foi desenvolvida para o Sistema Citocromo P450, das mais de 700 famílias de *CYP*, cerca de 110 estão presentes em animais. De acordo com *The*

Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database, foram descritas até o ano de 2007 nove famílias e 29 subfamílias. Atualmente, são descritas 18 famílias e mais de 40 subfamílias (SIM; INGELMAN-SUNDBERG, 2001; AYESH, et al., 1984).

Estudos indicam que a patogênese de um câncer tem origem e progresso clínico distintos. A agregação familiar tem sido considerada co-responsável pelos polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, como os que incluem as enzimas da superfamília Citocromo P450 (*CYP450*), as *Glutathione S-Transferases* (*GSTs*) ou o polimorfismo do gene *p53*, importante supressor de tumor (TSANTOULIS et al., 2007; UPILE et al., 2012; INCA, 2012; FRANÇA et al., 2012).

O etilismo é outro fator de grande relevância para a carcinogênese laríngea. O uso abusivo do álcool está amplamente relacionado à supressão imunológica e à desnutrição, aumentando consideravelmente a suscetibilidade aos carcinógenos ambientais como o tabaco. O tabagismo e o etilismo, quando associados, possuem uma forte relação sinérgica de dose-resposta aumentando o risco relativo de câncer laríngeo, especialmente no desenvolvimento de tumores supraglóticos (NORONHA & DIAS, 1997). A exposição ao vapor de ácidos inorgânicos fortes é um carcinógeno ocupacional conhecido para o câncer de laringe. A evidência associando a exposição a asbestos e cânceres de laringe são controversos. Inúmeros agentes adicionais, incluindo níquel, cromo, HPAs e pó de madeira têm sido implicados na iniciação e promoção de câncer laríngeo (MARCZYNSKI et al., 2000; AUSTIN & REYNOLDS, 1996).

Alguns genes humanos têm relação direta com o genoma viral do HPV, amplamente associado ao desenvolvimento de tumores cervicais, como colo uterino, e ao desenvolvimento de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Os oncogenes virais *E6* e *E7* encontrados integrados ao genoma de células cervicais cancerosas, resultam na estabilidade da expressão das oncoproteínas *e6* e *e7* dos HPVs de alto risco conhecidas pelo seu envolvimento na iniciação e manutenção de várias neoplasias cervicais. Basicamente, a ligação de *e6* a *p53*

estimula a degradação de *p53* celular, enquanto que a proteína *e7* altera o controle do crescimento celular ligando-se a proteína *rb*, inibindo a sua função. A perda da função de supressão tumoral dos produtos dos genes *TP53* e *RB* podem contribuir significativamente para a carcinogênese (CEROVAC et al., 1996; KARLSEN et al., 1996; NAIR & PILLAI, 2005; NIV et al., 2000; NODA et al., 1998).

A agregação familiar dos cânceres da laringe tem sido descrita em vários estudos, que sugerem um polimorfismo genético das enzimas metabolizadoras de agentes carcinógenos (DALTON et al., 2000; UNO et al., 2001). Adicionalmente, a expressão dessas enzimas pode ser também relevante, particularmente para os tumores de cabeça e pescoço, onde a dieta, o fumo, o álcool, a infecção por HPV ou a inflamação são capazes de induzir a atividade de enzimática específica no órgão alvo. As enzimas que metabolizam agentes carcinogênicos encontrados no tabaco, no álcool e nos produtos químicos agregados aos alimentos estão comumente relacionadas ao processo de carcinogênese da laringe (SANTIAGO, 2002; ANKATHIL et al., 1996; FOULKES et al., 1995).

Variações genéticas que são responsáveis pela síntese de enzimas envolvidas no metabolismo da nicotina podem influenciar significativamente no comportamento do hábito de fumar, no metabolismo das drogas de uma maneira geral, e também na ativação de substâncias carcinogênicas encontradas na fumaça do tabaco (WHO, 2012). É desconhecida a razão para a considerável diversidade na carcinogênese, comportamento clínico e invasão dos tumores nos diferentes sítios anatômicos, mas provavelmente está relacionada a alterações funcionais de diferentes conjuntos de genes. Apesar da elevada frequência da doença e da diversidade no comportamento biológico, ainda não estão completamente estabelecidas quais alterações genéticas estão envolvidas na transformação ou progressão das lesões de cabeça e pescoço (JEMAL et al., 2011).

O processo de carcinogênese dá-se em várias fases e baseia-se na transição de uma célula normal para uma célula pré-maligna que prolifera de forma independente. Esta transição

acarreta uma variedade de alterações cumulativas que gradualmente vão aumentando o potencial de malignidade celular. Assim se dá a transição sequencial de hiperplasia, para displasia ligeira, displasia moderada, displasia severa e câncer (SANTOS et al., 2011; TSANTOULIS et al., 2007).

A carcinogênese divide-se em quatro fases distintas: Iniciação - provoca alterações celulares irreversíveis como resultado da ação dos agentes carcinogênicos sobre o DNA celular; Promoção - causa uma frequente divisão das células iniciadas; Transformação maligna - o controle fisiológico da proliferação celular e de variadas atividades biológicas é perdido, devido ao acúmulo de mutações em genes que controlam a integridade do DNA durante os processos de divisão e de transcrição; Progressão - devido a uma sequência de alterações que vão surgindo, as células malignas obtêm potencial metastático e invasor dos tecidos vizinhos (SANTOS et al. 2011).

Com o declínio nas taxas de mortalidade e fecundidade, estima-se que o Brasil, no ano de 2025, terá a sexta população mais idosa do mundo. Medidas de prevenção e diagnóstico precoce para a doença são, portanto, emergenciais. Os tumores de cabeça e pescoço, têm uma alta incidência no Brasil e a taxa de sobrevida de cinco anos permanece uma das menores entre os principais tipos de câncer (INCA, 2014).

Polimorfismos em genes que metabolizam xenobióticos e em genes de reparo do DNA podem alterar o resultado da exposição e, a frequência de alguns destes polimorfismos diferem significativamente em diferentes grupos étnicos e/ou populações. Hábitos culturais ou formas diferentes de exposição aos agentes agressores também podem diferir entre estes grupos. Isso sugere que a ancestralidade, pode também ter influência sobre a suscetibilidade ao CECCP (INCA, 2013).

Por isso, torna-se fundamental a realização de estudos genéticos para um melhor conhecimento do perfil biológico de pacientes com a doença. A maior parte dos estudos moleculares é realizada em tumores de diferentes localizações anatômicas, o que dificulta o

estabelecimento de correlações entre os achados genéticos e os parâmetros histopatológicos.

O papel da predisposição genética no carcinoma da laringe, bem como em outros tumores da cabeça e pescoço, tem sido bem documentado através de estudos das síndromes de múltiplos neoplasmas, estudos de múltiplos tumores primários e estudos da história familiar de câncer (TRIZNA & SCHANTZ, 1992; SPITZ et al., 1994; BONDY et al., 1993).

2.6.1. A FAMÍLIA DO GENE CITOCROMO P450 (CYP)

Substâncias como as nitrosaminas, encontradas na fumaça do cigarro, que também são encontradas em produtos industrializados, de modo particular em defumados, assim como podem ser produzidas endogenamente, foram classificadas como pró-cancerígenas, devido ao seu efeito carcinogênico, resultante do processo ativação metabólica. A expressão aumentada dos níveis de *CYP2A3* em alguns tecidos em particular indica a atividade indutora das nitrosaminas (ABDO et al., 2001).

O etanol provoca aumento da permeabilidade das células da mucosa aos agentes carcinógenos contidos no tabaco, assim como entre as nitrosaminas e hidrocarbonetos, pela agressão celular produzida pelos metabólitos de etanol (aldeídos), deficiências nutricionais ou diminuição dos mecanismos locais de defesa. O estudo do álcool na gênese do CCE de laringe mostra que ele atua tanto como fator de risco independente ou como fator sinérgico com o fumo. O etanol inibe o clareance de primeira passagem das nitrosaminas e seletivamente inibe o *CYP 2E1*, um dos principais responsáveis pelo metabolismo no fígado dos ratos, o que aumenta, dessa forma, a exposição do esôfago e da mucosa bucal às nitrosaminas, aumentando alquilação do DNA esofágico (SZYMAŃSKA et al., 2011).

O etanol tem demonstrado um crescente alquilação do DNA em tecidos extrahepáticos, produzido pela exposição às nitrosaminas e uma decrescente alquilação do DNA hepático. Estudos que realizaram a correlação entre mutações nos genes *TP53* e *P16* com polimorfismos de *CYP1A1* e *GSTM1*, demonstrou que a prevalência de mutações no *TP53* foi alta em lesões de CCE de laringe em pacientes que fumavam mais de 30 maços de cigarro por

ano, quando comparado a tumores de pacientes que fumavam um número menor ou igual a 30 maços por ano. Também foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a prevalência de mutações do *TP53* em tumores orais com os polimorfismos do *CYP1A1* e das *GSTM1*, o que não foi observado para a associação destas com a *p16*, demonstrando, assim, que a indução de mutações em genes supressores de tumor pode estar associada à exposição a carcinógenos e a polimorfismos de genes de enzimas que metabolizam xenobióticos (SZYMAŃSKA et al., 2011).

Existem poucos trabalhos publicados na literatura que fazem correlação entre os genes que codificam as enzimas *CYP*, seus possíveis polimorfismos, a expressão dessas proteínas e a influência da sua atividade enzimática na carcinogênese de CCE de laringe, seja tanto para lesões com potencial pré-maligno até para tumores orais com potencial bastante agressivo (LAZARUS et al., 1998; RIBEIRO-PINTO, 2000). A importância do estudo dos fatores de risco para o CCE de laringe justifica-se pela necessidade de se programar atividades preventivas para diminuir sua incidência em regiões e países em que ela ainda se mantém alta, como no Brasil. A ação quimiopreventiva foi descrita como a possível proteção contra a ação nociva dos radicais livres nas células (O_2 , H_2O_2 , OH), resultantes das reações de oxiredução (REGEZI, 2000).

O estresse oxidativo, que consiste no efeito cumulativo dessas espécies reativas do oxigênio, pode levar a mutações e conduzir à carcinogênese. No entanto, até o presente momento, não foi descrita nenhuma intervenção clínica efetiva no processo da carcinogênese que fosse capaz de inibir enzimas *CYP* e/ou induzir a expressão de GSTs (*Glutathione transferase*) e NATs (*N-acetyl transferase*), demonstrando, assim, a necessidade de ser realizada a testagem de produtos naturais ou outros compostos que sejam capazes de provocar ou estimular essas reações (ABDO et al., 2001; RINALDI et al., 2002).

2.6.2 . OS GENES *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*

Vários genes polimórficos que codificam enzimas envolvidas na biotransformação

de carcinógenos têm sido associados ao desenvolvimento do câncer (LEAR et al., 1996). Três genes em particular, *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* que codificam enzimas da fase II pertencentes à família da Glutathione S-transferase (*GSTs*), parecem relevantes para a suscetibilidade ao câncer, pois atuam na destoxificação de metabólitos reativos de substâncias carcinogênicas presentes no ambiente. Os genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* são polimórficos na população humana (WILKINSON et al., 1997; NORPPA, 2003). Indivíduos portadores da deleção do alelo *GSTM1* e/ou do *GSTT1* em homozigose podem apresentar suscetibilidade para desenvolver alguns tipos de neoplasias, principalmente os tumores etiologicamente relacionados aos modos e hábito de vida devido à redução nos processos de detoxificação (BOARD et al., 1990; MILLER et al., 2002; GARCIA-CLOSAS et al., 2005).

O gene *GSTM1* é polimórfico na população humana, pode ter sua expressão anulada devido a uma grande deleção gênica, e dois outros funcionais (*GSTM1A* e *GSTM1B*) (ROSSIT et al., 2000; DRUMMOND et al., 2004). Na população humana o gene *GSTT1* é também polimórfico, podendo apresentar genótipo nulo por deleção. Indivíduos que apresentam genótipo nulo desses genes em homozigose agrupam-se no fenótipo conjugador negativo, uma vez que ocorre perda completa da atividade enzimática, enquanto os que apresentam pelo menos um alelo funcional agrupam-se no fenótipo conjugador positivo (PEMBLE et al., 1994; ROSSIT et al., 2000; DRUMMOND et al., 2004).

Desse modo, a variabilidade individual em genes relacionados aos processos de ativação e detoxificação metabólica parece crucial na suscetibilidade ao CCE de laringe. Diversos autores sugerem a influência dos genótipos nulos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* na carcinogênese em CCE de laringe (ROSSIT et al., 2000; DRUMMOND et al., 2004; MINNARD et al., 2006; OUDE et al., 2006).

2.6.3. GENE *TP53*

Uma importante categoria de genes envolvidos no processo de carcinogênese é conhecida como genes supressores tumorais que agem normalmente como reguladores

negativos da proliferação celular. Um dos principais genes representantes desta categoria é o gene *TP53* cuja mutação ou inativação está implicada no surgimento do câncer (OLIVEIRA, 2005; VAZQUEZ et al., 2008).

O gene *TP53* foi descoberto em 1979, e descrito como o primeiro gene supressor de tumor a ser identificado em um estudo com células transformadas pelo vírus símio 40 (*SV40*), apresentando forte associação ao antígeno *T*, com elevados níveis de expressão em tumores e células alteradas (GALLI et al, 2009). Localizado no braço curto do cromossoma 17 (*17p13.1*), o gene *TP53* possui uma estrutura com 11 éxons e um tamanho de aproximadamente 20 kb. O *TP53* é responsável pela codificação da proteína *p53*, uma fosfoproteína composta por 393 aminoácidos e massa molecular de 53kDa, que faz parte de uma família de genes altamente conservados, a qual inclui pelo menos outros dois membros: *P63* e *P73*. É um fator de transcrição de ligação específico de uma sequência de DNA, está envolvido em muitas funções relacionadas à manutenção da integridade celular após danos ao DNA e controle do ciclo celular e age como principal controle de crescimento e divisão celular. Disfunções desse gene estão envolvidas em muitos tipos de tumores, incluindo CCE de laringe (ORSTED et al., 2007)

O gene *TP53* também promove um *checkpoint* de S para G2, que depende da integridade do domínio c-terminal do gene. Portanto, quando *TP53* sofre mutações, as células com danos no DNA, que por um processo de seleção natural favorável podem desencadear a transformação maligna, escapam do reparo destes danos e de sua destruição, podendo iniciar um clone maligno. Apesar de ser observada principalmente em células somáticas, a importância médica do gene *TP53* é inegável, primeiro porque a detecção de mutações pode ser indicadora do diagnóstico e do prognóstico, segundo porque é um alvo perfeito para prevenção, o que estimula as abordagens de terapia gênica (PARTRIDGE et al., 2007; VAZQUEZ et al., 2008). Adicionalmente, a *p53* é capaz de acionar o reparo de danos causados ao DNA por agentes genotóxicos, desempenha importante papel na angiogênese e regula o estresse oxidativo da célula (ORSTED et al., 2007)

Em adição às mutações, muitos estudos têm focado os polimorfismos do gene *TP53* como fatores de risco na carcinogênese. Estão depositados no banco de dados da *International Agency Research on Cancer* (IARC) sequências nucleotídicas de 14 diferentes tipos polimórficos do gene *TP53*, sendo que um destes polimorfismos acomete o códon 72, no éxon 4 deste gene supressor tumoral. Na realidade, o polimorfismo do códon 72 de *TP53* é um Polimorfismo de um Único Nucleotídeo (*SNP* do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) o qual resulta na expressão da proteína p53 contendo os aminoácidos *Arginina* ou *Prolina*. Estas variantes de p53 apresentam diferentes propriedades bioquímicas e biológicas, e por isso, são bastante pesquisadas no campo da oncologia molecular de diversas neoplasias (IARC, 2012; GALLÌ et al, 2009).

As mutações no gene *TP53* têm sido encontradas em quase todos os tipos de câncer em várias frequências e diferentes em sua natureza. Nas células que apresentam inativação da proteína p53, a célula torna-se incapaz de detectar e restaurar possíveis danos ao DNA, dessa maneira, a divisão celular se mantém sem que ocorra um reparo. Em consequência a isto, a frequência das mutações, rearranjos cromossômicos e aneuploidias são aumentados, e o acúmulo destes eventos mutacionais possa ser causa encoberta para o desenvolvimento de um fenótipo neoplásico e provavelmente, no desenvolvimento de câncer (GLEICH, SALAMONE, 2002). Especula-se que essas variações alteram a estrutura e a função da proteína p53. Por exemplo, o alelo *Pro* induz apoptose com cinética mais lenta e reprime transformações menos eficientes quando comparado ao alelo *Arg* reiterando um aminoácido Arginina (CGC; *Arg72*) e um Prolina (CCC; *Pro72*), correspondendo à arginina/prolina (*Arg72Pro*). O polimorfismo ocorre por simples substituição de uma base no códon que resulta em alteração estrutural da proteína p53. Vários autores têm demonstrado que a presença de *Arg72Arg* confere maior risco de desenvolvimento de tumores, como em cânceres de bexiga, cérvix uterino, mama entre outros (THOMAS et al., 1999).

Em células infectadas pelo HPV, a proteína E6 associada ao câncer liga-se a proteína

p53 e promove sua degradação, através de um sistema ubiquitina proteolítica, alterando a atividade da p53 nos processos de tumorigênese, regulação da transcrição, ativação da telomerase e apoptose, acarretando um descontrole do ciclo celular demonstraram que pacientes os quais eram homozigotos para o alelo Arg apresentavam risco de desenvolver CCE de laringe cerca de sete vezes maior que pacientes homozigotos para Pro. Isto sugere que não apenas a presença de infecção por HPV, mas uma diferença na estrutura da p53 possa ser um importante fator a ser considerado para carcinogênese de CCE de laringe. Isto também implica que a genotipagem dos alelos *Arg72Pro* em pacientes com (*SIL*) possa permitir selecionar pacientes com alto risco para CCE de laringe invasivo, visto que a lesão intraepitelial escamosa seja uma lesão pré-maligna que pode evoluir para o câncer invasivo. Entretanto, em recentes estudos amostras cervicais normais e com lesões de alto e baixo risco, não foi possível associar a presença do polimorfismo do gene *TP53* no códon 72 e a frequência dos alelos *Arg* e *Pro* com o aumento do risco para CCE de laringe (WHIBLEY et al., 2009).

Outro estudo, avaliando 9.219 participantes para o polimorfismo de *TP53*, concluiu que os indivíduos homozigotos para *Pro* tem um aumento médio de 3 anos na sobrevida, quando comparados com os homozigotos para a *Arg* (ORSTED et al., 2007). No tratamento de pacientes com CCE de laringe, o gene *TP53* é considerado um dos fatores mais importantes no mecanismo de morte celular por agentes citotóxicos, e, portanto, tem um papel destacado na resposta radioterapia e à quimioterapia. Estudos moleculares em diferentes tumores sugerem que a variante *Pro* poderia ser particularmente detectada em algumas proteínas *p53* com funções anti-proliferativas. Adicionalmente, a variante *p53Pro* parece conferir uma resposta ineficaz à quimioterapia, resultando na redução da sobrevida relativa e num prognóstico desfavorável para o paciente após a aplicação da terapia antitumoral (VAZQUEZ et al., 2008).

As avaliações do status do polimorfismo de *TP53* frente as variáveis suscetibilidade, resposta terapêutica, mortalidade e sobrevida em indivíduos portadores de câncer e saudáveis, apresentam dados com significância reduzida. Existe uma tendência em considerar o alelo *Arg*

como fator protetor em potencial para a suscetibilidade aos cânceres em geral e que os portadores deste alelo apresentam uma resposta terapêutica eficiente. Por outro lado, pacientes com câncer parecem sobreviver por mais tempo quando apresentam o alelo *Pro* em seus genótipos (VAZQUEZ et al., 2008; PARTRIDGE et al., 2007; ORSTED et al., 2007; RODIER et al., 2007).

O padrão de atividade e capacidade indutora dessa enzima em humanos, relacionada à formação de metabólitos de HPAs capazes de reagir com a molécula de DNA é, portanto, de grande importância para a estimativa do risco de desenvolvimento de câncer. Tais estudos sugerem quais fatores podem aumentar ou diminuir o risco individual no desenvolvimento da resposta do organismo decorrente da exposição aos agentes químicos ambientais. O trabalho justifica-se pela necessidade de associar os fatores genético-moleculares observados em pacientes diagnosticados com CCE de laringe, no Hospital Araújo Jorge (ACCG), segundo hábitos tabagista e etilista. Tais conhecimentos poderão ajudar na elucidação dos diversos mecanismos relacionados ao metabolismo de xenobióticos e da predisposição ao desenvolvimento tumoral, de acordo com o estilo de vida e fatores de risco potencialmente associados.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar as características genótípicas e epidemiológicas do Carcinoma de Células Escamosas (CCE) de Laringe, sua relação com o Papiloma Vírus Humano (HPV) e o perfil polimórfico em pacientes de um Hospital referência no diagnóstico e tratamento de pacientes com câncer no Brasil Central.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os polimorfismos genéticos de *CYP1A1* em grupos de caso- controle dos pacientes diagnosticados com CCE de Laringe pelo Serviço de Cabeça e Pescoço da referida instituição;
- Analisar os polimorfismos genéticos de *GSTM1* e *T1* em grupos de caso- controle dos pacientes diagnosticados com CCE de Laringe pelo Serviço de Cabeça e Pescoço da referida instituição;
- Analisar os polimorfismos genéticos do *TP53* e sua possível associação com a infecção pelo HPV em pacientes diagnosticados com CCE de Laringe pelo Serviço de Cabeça e Pescoço da referida instituição;
- Analisar os dados sócio demográficos, clínicos e estilo de vida dos pacientes diagnosticados com CCE de Laringe pelo Serviço de Cabeça e Pescoço da referida instituição, a fim de buscar uma possível associação entre estes dados e as sobrevidas específicas.

4 MÉTODOS

4.1 TIPO E LOCAL DO ESTUDO

A presente avaliação consiste em estudo caso-controle, retrospectivo, conduzido no LaGene - Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular, LACEN – Laboratório Central Dr Giovanni Cysneiros / Secretaria de Estado da Saúde / Governo do Estado de Goiás e no NPR - Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia / Departamento de Biologia / PUC-GO – Pontifícia Universidade Católica de Goiás em conjunto com o Registro de Câncer de Base Populacional da ACCG -Associação de Combate ao Câncer em Goiás / HAJ - Hospital Araújo Jorge.

4.2 ASPECTOS ÉTICO-LEGAIS

Tanto os indivíduos do grupo controle, quanto os indivíduos do grupo teste receberam informações sobre os objetivos deste estudo e assinaram o termo de consentimento pós-informação e responderam individualmente um questionário, previamente aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Hospital Araújo Jorge / ACCG e da PUC-GO (Anexo 01), com respeito à história individual de exposição a fatores ocupacionais, ambientais e hábitos de vida.

4.3 GRUPO AMOSTRAL

O grupo teste (GT) foi constituído por 63 indivíduos de ambos os sexos. As amostras foram obtidas junto ao Serviço de Cabeça e Pescoço do HAJ e os controles (GC), constituído por 49 indivíduos, foram obtidos fora do HAJ, como sendo indivíduos da mesma comunidade, preferencialmente do Hospital de Urgências de Goiânia - HUGO, do Hospital Geral de Goiânia - HGG e da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia. No HAJ foram selecionados os casos de câncer primário da laringe por ocasião do diagnóstico, anteriormente ao início do

tratamento. O grupo controle, combinado por sexo e idade foi utilizado como um grupo para comparação, quando necessária, com os resultados obtidos nos casos testes.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DAS AMOSTRAS

Todos os indivíduos foram previamente selecionados sob a condição de não terem sido submetidos à radioterapia ou quimioterapia. Foram excluídos os indivíduos cujo DNA não apresentou boa qualidade para a realização das análises moleculares. No caso dos pacientes, também foram excluídos aqueles cujo laudo histopatológico de câncer de laringe (CID-O: C32) da amostra tumoral não confirmou a presença de malignidade. Foram excluídos do estudo indivíduos-controle que apresentem ou já apresentaram qualquer tipo de neoplasia.

4.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Subsequente à entrevista, foram coletados 10mL de sangue periférico heparinizado, colhidos em tubos *falcon* de 14mL, sendo posteriormente processados a 5000.g r.p.m. durante 15 minutos. A partir dessa etapa, o anel leucocitário foi aspirado e armazenado em microtubos, preservados a -20°C, para posterior análise. Dos casos testes, amostras frescas de tecidos (biópsia ou espécime cirúrgico) foram obtidas para posterior análise de identificação e genotipagem do HPV. As amostras de tecido tumoral foram avaliadas por um patologista para confirmar a presença de malignidade, posteriormente, foram armazenadas em frascos estéreis e estocadas em condições ideais de temperatura e conservação (-80°C). A classificação histopatológica foi realizada de acordo com a ICT (do inglês: *International Classification of Tumors*). O estágio clínico foi determinado pelo estadiamento TNM (referente a extensão ou presença de T: tamanho, N: nódulo e M: metástase) do câncer.

4.6 ANÁLISE MOLECULAR E ELABORAÇÃO DOS ARTIGOS

O estudo molecular foi conduzido no LaGene - Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular, LACEN/SES e Núcleo de Pesquisas Replicon, Departamento de Biologia/ Departamento de Biologia/PUC-GO. Os artigos científicos que serão apresentados em RESULTADOS foram elaborados reunindo e dividindo os dados obtidos pelo presente estudo. Primeiramente, no Artigo 01, os dados moleculares para os polimorfismos de *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* foram associados aos dados sócio-demográficos e do estilo de vida dos pacientes investigados. Porém, no Artigo 02, os dados moleculares para o gene *TP53* e a investigação quanto a contaminação do papilomavírus humano (HPV) e os fatores de risco investigados, bem como os dados clínicos. Finalmente, o Artigo 03 apresenta os dados do perfil clínico-epidemiológico com prevalência e sobrevida dos pacientes diagnosticados com CCE de laringe.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicos, epidemiológicos e moleculares, de casos e controles, foram tabulados em planilhas do *software* Excel[®] (2013). A avaliação das frequências alélicas e genotípicas das populações casos e controle, o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e a sua diferenciação gênica e genotípica foi realizada com o auxílio do *software* SPSS[®] (IBM). O teste do X^2 de homogeneidade foi utilizado na comparação entre os dados sócio-demográficos (idade, sexo, hábitos tabagista e etilista). O teste foi realizado em tabelas de contingência 2x2 e 3x2. Adicionalmente, pode-se avaliar a chance de risco entre os marcadores polimórficos de *CYP1A1m1*, *GSTM1/T1* e *TP53* e ainda da presença de HPV em pacientes com câncer da laringe pelo teste de *Odds Ratio*, com intervalo de confiança de 95%. A sobrevida também foi calculada de acordo com os genótipos dos pacientes, para isso foi utilizado o método da Tábua de Vida Atuarial e posteriormente o teste de *logrank* utilizando o *software* GrahPad Prism[®] (Versão 4.0).

5 RESULTADOS

Artigo 01 - Submetido à *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, Medicina 1: Qualis A2, Fator de Impacto (2014): 4.125.

Alcohol and tobacco consumption and the genetic polymorphism of CYP and GST in patients with cancer squamous cell laryngeal

Paulo Marcelo de Farias Vasconcelos,¹ Cláudio Carlos da Silva,^{1,2} Aparecido Divino da Cruz^{1,2 *} and Maria Paula Curado³

* contato: acruz@pucgoias.edu.br

a) Núcleo de Pesquisas Replicon
Department of Biology
Pontifical Catholic University of Goiás
40, 235 Street, Area 4, Block L
Universitário, Goiânia, GO, Brazil
ZIP 74605-050
Phone: +55 62 3946 1385

b) Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene)
Laboratório Central Dr Giovanni Cysneiros (LACEN)
Secretaria de Estado da Saúde de Goiás
40, 235 Street, Area 4, Block L
Universitário, Goiânia, GO, Brazil
ZIP 74605-050
Phone: +55 62 3946 1385

c) Centro Internacional de Pesquisa
A.C. Camargo Cancer Center
204, Pirapitingui Street
Liberdade, São Paulo, SP, Brazil
ZIP 01508-010
Phone: +55 11 2189 5000

Resumo

O estudo dos fatores de risco para o câncer de laringe justifica-se pela necessidade de se propor ações preventivas, visando a diminuição de sua incidência em regiões e países em que ela ainda se mantém alta, como no Brasil. O objetivo deste estudo foi analisar os polimorfismos genéticos de *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* em grupos de caso-controle dos pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de laringe, em pacientes atendidos pelo Hospital Araújo Jorge, serviço de referência em diagnóstico e tratamento de câncer no Brasil Central. Foram analisados ao todo 63 pacientes em um período de 10 anos. Quanto ao gene *CYP1A1* foram observadas frequências alélicas de 58,9% e 56,1%, para o alelo selvagem T e 41,1% e 43,9% para o alelo mutante C, em casos e controles. Para os genes *GSTs* foram encontradas frequências genotípicas positivas observadas para os genes *GSTM1* e *GSTT1* de 41,3% (26/63) e 54,0% (34/63) para os pacientes com carcinomas laríngeos, e de 49,0% (24/49) e 51,0% (25/49) para o grupo controle, respectivamente. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas das variantes alélicas e genotípicas *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* com o carcinoma espinocelular da laringe. A ausência desta verificação, no entanto, não exclui completamente a possibilidade deste gene de exercer alguma influência no desenvolvimento do câncer laríngeo, tendo em vista que haplótipos envolvendo os diversos genes do biometabolismo podem contribuir de forma diferenciada para a carcinogênese.

1 **Introdução**

2 O conjunto de tumores da cavidade oral, faringe e laringe representa cerca de 90% de
3 todos as neoplasias que envolve a região anatômica de cabeça e pescoço (Curado and Hashibe,
4 2009). Segundo a Agência Internacional de Pesquisa contra o Câncer (do inglês: *International*
5 *Agency for Research on Cancer* - IARC), os casos de câncer no mundo deverão aumentar em
6 75% até 2030 (Bray et al., 2012). Porém, o conhecimento da suscetibilidade individual para o
7 desenvolvimento do câncer tem crescido, e muitos estudos têm mostrado a interação gene-
8 ambiente na carcinogênese (Khelifi et al., 2012). Dentre as variações genéticas, os polimorfismos
9 genéticos relacionados aos genes de metabolismo de xenobióticos podem influenciar
10 significativamente no comportamento da resposta à ativação das substâncias carcinogênicas
11 encontradas no tabaco e no álcool (Wall et al., 2007; Feller et al., 2009; WHO, 2012).

12 Estudos epidemiológicos demonstram a associação entre a ingestão de álcool e tabaco
13 com a ocorrência de diferentes tipos de câncer de cabeça e pescoço. Thuler et al. (2013)
14 observaram a partir de uma revisão sistemática, analisando a associação entre consumo de
15 álcool e o desenvolvimento de câncer em diversos estudos publicados, confirmaram esta
16 associação e acrescentou que ainda há um aumento dos riscos de desenvolver câncer de próstata
17 e do sistema nervoso central em homens. Maurya et al. (2015), Kim et al., (2003) e Menezes et
18 al. (2002) demonstraram que o tabagismo está diretamente relacionado à carcinogênese laríngea,
19 expondo este órgão às diversas substâncias químicas e físicas contidas na fumaça do cigarro,
20 derivadas da queima do tabaco. Por outro lado, Roswall and Weiderpass (2015) observaram que
21 não há dados científicos que suportem que o álcool possa causar câncer da cavidade oral,
22 faringe, laringe e esôfago em homens e mulheres, de cólon e reto em homens, e câncer de mama
23 em mulheres.

24 De acordo com Liang et al. (2012) as características genéticas individuais talvez sejam
25 os principais fatores na determinação do efeito de uma substância ou agente agressor como
26 responsável pelo câncer. No caso do tabaco, variações genéticas que são responsáveis pela
27 síntese de enzimas envolvidas no metabolismo da nicotina, podem influenciar
28 significativamente no comportamento do hábito de fumar e também na ativação de substâncias
29 carcinogênicas encontradas na fumaça do tabaco (WHO, 2012). O estudo destas variações pode
30 alterar o resultado da exposição aos agentes carcinógenos e, a frequência de alguns destes
31 polimorfismos diferem significativamente em diferentes grupos étnicos e/ou populações.

32 O tabagismo, isoladamente, é o fator de risco mais relevante que causa câncer no
33 mundo, sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma doença crônica e
34 recorrente causada pela dependência da nicotina (Kumar et al., 2008; WHO, 2011). Indivíduos
35 fumantes têm cerca de três vezes e meia mais chance de um câncer de cavidade oral e laringe.

1 Estudos que estabeleceram uma avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e
2 pescoço, encontraram uma prevalência maior em homens, cor de pele branca, tabagistas e
3 etilistas, sendo que o risco era menor à medida que o hábito fosse adquirido mais tardiamente e
4 conforme aumentava o tempo de ex-fumante (Lee et al., 2008; Gandini et al., 2008; Torrente et
5 al., 2012).

6 Visoni (2009) considerando a exposição crônica a tabaco e álcool, concluíram que
7 mecanismos de excreção podem interferir na biodisponibilidade e no grau de agressão
8 bioquímica e molecular e, por conseguinte, num maior ou menor risco de desenvolver câncer. O
9 consumo abusivo de álcool na região européia é cerca de 20% entre os indivíduos adultos, sendo
10 considerado o maior do mundo segundo a OMS. Já no Brasil este percentual é estimado em 17%
11 dentre os adultos (WHO, 2012). A ingestão de bebidas alcoólicas crescente em ambos os sexos
12 também é um fator preocupante. Um aumento na proporção de mulheres (12,4% para 19,8%)
13 que consomem bebida alcoólica de uma a três vezes por semana foi observado entre 2006 e
14 2009 por estudos envolvendo todas as regiões brasileiras, evidenciando um aumento do
15 consumo, particularmente expressivo, na região Centro-Oeste (MS, 2014).

16 Vários genes já foram descritos como predisponentes, aumentando a suscetibilidade ao
17 desenvolvimento de câncer. Entre eles, estão os genes *TP53*, *P21* e a *P16*, *TELOMERASE*,
18 *BCL-2*, entre outros, além da identificação e associação de vírus oncogênicos, como o HPV
19 (Papiloma vírus humano) e o EBV (*Epstein-Barr Virus*) (Ventury et al., 2004). Uma associação
20 estatisticamente significativa foi observada por Ribeiro-Pinto (2000) entre a prevalência de
21 mutações do *TP53* em tumores orais com os polimorfismos do *CYP1A1* e das *GSTM1*, o que
22 não foi observado para a associação destas com a *P16*, demonstrando, assim, que a indução de
23 mutações em genes supressores de tumor pode estar associada à exposição a carcinógenos e a
24 polimorfismos de genes de enzimas que metabolizam xenobióticos.

25 Adicionalmente, diferenças étnicas em associações de polimorfismos nas enzimas que
26 metabolizam drogas (EMDs), tais como citocromo P450 (*CYP*) e glutathione-S-transferase M1
27 (*GSTM1*), com câncer de cabeça e pescoço têm sido relatados. Varela-Lema et al (2008); Zhuo
28 et al., (2009) relataram, em estudos de meta-análise conjunta, que a variante *CYP1A1*2C* foi
29 associado a câncer de boca e faringe apenas em fumantes. Porém, a variante 2A do mesmo gene,
30 também foi um fator de risco independente para, faringe ou laringe cânceres orais em
31 caucasianos e brancos, mas não em asiáticos. Um estudo realizado por Lu et al., (2011) revelou
32 uma associação significativa de polimorfismos para *CYP2E1* em casos de câncer bucal no Leste
33 Asiático e populações miscigenadas, mas não encontraram nenhuma associação significativa em
34 caucasianos. Outros estudos também não observaram associação entre *GSTM1 (null)* em uma
35 análise conjunta em câncer oral, faringe e laringe em brancos, caucasianos europeus,

caucasianos americanos e asiáticos, porém, uma associação significativa foi observada para as variantes alélicas de *GSTs* e este conjunto de tumores malignos em asiáticos, afro-americanos, africanos, turcos e caucasianos alemães em um estudo de meta-análise e agrupados (Hashibe et al., 2009; Peters et al., 2006; Tripathi and Roy, 2006; Varela-Lema et al, 2008.; Zhuo et al., 2009). Adicionalmente, a combinação de *GSTM1 (null)* e *CYP1A1* foi associada com câncer oral, mas não com câncer de faringe (Varela-Lema et al., 2008).

A importância do estudo dos fatores de risco para o câncer de laringe justifica-se pela necessidade de se propor ações preventivas, visando a diminuição de sua incidência em regiões e países em que ela ainda se mantém alta, como no Brasil. Desta forma, este estudo teve como objetivo analisar os polimorfismos genéticos de *CYP1A1m1*, *m2* e *m4*, em grupos de caso-controle dos pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de laringe em pacientes atendidos pelo Serviço de Cabeça e Pescoço de um Hospital Referência no Brasil Central em diagnóstico e tratamento de câncer.

Material e Métodos

Sujeitos. Foram selecionados para o estudo, pacientes diagnosticados com câncer de células escamosas da laringe, entre janeiro de 1998 a dezembro de 2008, oriundos do Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP) do Hospital Araújo Jorge (HAJ) da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG) localizado na cidade de Goiânia (GO), serviço de referência no diagnóstico e tratamento de câncer da região Central e Norte do Brasil. Durante este período, 63 pacientes foram selecionados para o grupo caso. Adicionalmente, 49 indivíduos foram selecionados fora do HAJ, em outros dois Hospitais da região, como sendo indivíduos da mesma comunidade, porém, sem qualquer diagnóstico recente de qualquer tipo de câncer. No HAJ foram selecionados os casos de câncer primário da laringe por ocasião do diagnóstico, anteriormente ao início do tratamento. O grupo controle, combinado por sexo e idade foi utilizado como um grupo para comparação, quando necessária, com os resultados obtidos nos casos testes.

Ao todo, 112 pacientes aceitaram participar do estudo, tanto os indivíduos do grupo controle, quanto os indivíduos do grupo teste receberam informações sobre os objetivos deste estudo e assinaram o termo de consentimento pós-informação e responderam individualmente um questionário, previamente aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Hospital Araújo Jorge/ACCG, com respeito à história individual de exposição a fatores ocupacionais, ambientais e hábitos de vida. Todos os indivíduos foram previamente selecionados sob a condição de não terem sido submetidos à radioterapia ou quimioterapia.

Foram excluídos os indivíduos cuja extração do DNA não apresentou boa qualidade para a realização das análises moleculares. No caso dos pacientes, também foram excluídos aqueles cujo laudo histopatológico de câncer de laringe (CID-O: C32) da amostra tumoral não confirmou a presença de malignidade, bem como os indivíduos-controle que apresentem ou já apresentaram qualquer tipo de neoplasia. Subsequente à entrevista, 112 amostras foram coletadas 10mL de sangue periférico heparinizado, colhidos em tubos *falcon* de 14mL, sendo posteriormente processados a 5000.g r.p.m. durante 15 minutos. A partir dessa etapa, o anel leucocitário foi aspirado e armazenado em microtubos, preservados a -20°C, para posterior análise. A análise molecular foi conduzida no Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene), do Laboratório Central Dr Giovanni Cysneiros (LACEN), da Secretaria de Estado da Saúde (SES) do Governo do Estado de Goiás e conjunto com o Núcleo de Pesquisas Replicon, do Departamento de Biologia, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC), ambos localizados na cidade de Goiânia (GO) Brasil Central.

Polimorfismo do gene *CYP1A1m1* pela técnica de PCR-RFLP. A extração, o isolamento e a purificação do DNA foram realizados mediante o uso do kit comercial do DNA Genômico Wizard[®] (Promega Corporation, EUA), seguindo-se exatamente todas as instruções do fabricante. Todas as 112 amostras foram submetidas à PCR em 25µL de reação, contendo água Mili-Q, 0.3nmol de *primers* alelos-específicos para a variante *CYP1A1m1*: M1F 5'-CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT-3' (*forward*) e M1R 5'-TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT-3' (*reverse*) (Prodimol[®]), seguindo o protocolo descrito por Hauashi *et al.* (1991), 1U de *Taq DNA polimerase* (Promega[®]), 1X de STR[®] *buffer* (Promega[®]) (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 0,2mM dNTPs e 0,5mM de MgCl₂) e ~100ng de DNA genômico total. Para a amplificação do fragmento de 340pb, da região 3'UTR do gene *CYP1A1* foi utilizado o protocolo de termociclagem sugerido por Hauashi *et al.* (1991), que consistia em uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido por uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Após a amplificação, 10µL do produto de PCR com adição de 3µL de tampão 1X de corrida (0,05% de azul de bromofenol e xileno cianol, 95% de formamida) foram resolvidos em gel de Agarose a 1,5% em TBE (Tris-Borato EDTA) 1X, mediante aplicação de um campo elétrico constante de 10V/cm por 1 hora. Posteriormente, o gel foi submerso em TBE 1X contendo 5µL/mL de Brometo de etídeo (EtBr) por aproximadamente 15 minutos e em seguida as imagens foram capturadas em sistema de vídeo-documentação *ImageMasterVDS*[®] (Amersham Pharmacia Biotech, EUA), para análise da amplificação. Os *amplicons* que apresentaram o fragmento de 340pb foram submetidos à técnica de PCR/RFLP. Para a digestão

enzimática foram utilizados 25µL de solução, que continham água Mili-Q, 1X de tampão da enzima (Promega®), 1U de *MspI* e 10µL de *amplicon*. Posteriormente, as amostras foram submetidas à digestão enzimática por 12h à 37°C. Para a visualização dos fragmentos digeridos, foram utilizadas as mesmas condições de eletroforese anteriormente descritas.

Os *primers* utilizados amplificam um fragmento de 340pb referente ao genótipo homozigoto T/T do gene *CYP1A1m1*, o qual não sofre ação da enzima de restrição *MspI*, originando uma única banda de 340pb. O genótipo homozigoto C/C possui sítios para a enzima de restrição em ambos os alelos, gerando dois fragmentos de 200pb e 140pb. O genótipo heterozigoto T/C corresponde às três bandas de 340, 200 e 140pb, onde apenas um dos alelos é clivado (Figura 1).

Polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* pela técnica de PCR Multiplex. Para a análise dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1*, todas as 112 amostras foram submetidas à PCR em 25µL de reação, seguindo o protocolo proposto por Abdel-Rahma *et al.* (1996), contendo água Mili-Q, 0.15nmol de cada *primer* alelo-específico (Prodimol®), sendo o *primer* RH92600, 5'-TCA TAT GCA AAA CAG CTT CCC-3' (*forward*) e 5'-CTG GTC CTT CAA GCC TGT ATG-3' (*reverse*). Para o gene *GSTM1* foram usados os *primers*, M1F: 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3' (*forward*) e M1R: 5'-GTT GGG CTA AAT ATA CGG TGG-3' (*reverse*). Para o gene *GSTT1* foram usados os *primers*, T1F: 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3' (*forward*) e T1R: 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3' (*reverse*), 1U de Taq DNA polimerase (Promega®), 1X de STR® *buffer* (Promega®) (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 0,2mM dNTPs e 0.5mM de MgCl₂) e ~100ng de DNA genômico total.

Para a amplificação dos fragmentos de 135pb (*RH92600*), 215pb (*GSTM1*) e 480pb (*GSTT1*) foi utilizado o protocolo de termociclagem sugerido por Abdel-Rahma *et al.* (1996), com adaptações, que consistia em uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido por uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Posteriormente, 10µL do produto de PCR com adição de 3µL de tampão 1X de corrida (0,05% de azul de bromofenol e xileno cianol, 95% de formamida) foram resolvidos em gel de Agarose a 1,5% em TBE 1X, mediante aplicação de um campo elétrico constante de 10V/cm por 1 hora. Posteriormente, o gel foi submerso em TBE 1X contendo 5µL/mL de Brometo de etídeo (EtBr) por aproximadamente 15 minutos e em seguida as imagens foram capturadas em sistema de vídeo-documentação *ImageMasterVDS*® (Amersham Pharmacia Biotech, EUA), para análise da amplificação. O *primer* *RH92600* amplifica uma região de microssatélite de 135pb localizado em 6q13, usado como controle

endógeno da reação. Os fragmentos de 215 e 480pb foram observados, respectivamente, nos indivíduos *GSTM1* e *GSTT1* positivos. A ausência de amplificação *GSTM1* (215pb) ou *GSTT1* (480pb), na presença de controle interno, indicou os respectivos genótipos nulos para cada gene, ou para ambos (Figura 1).

Análise Estatística. A distribuição das características demográficas e uso de substâncias cancerígenas foram examinadas usando o teste do χ^2 . Para genótipos, primeiramente, foram realizados o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg. As associações entre doenças e genótipos foram avaliadas através do cálculo de *Odds Ratio* (OR) e Intervalo de Confinça (IC) de 95%, adicionalmente, foi realizado o teste de Tendência de acordo com os intervalos de tempo. O *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Análise da suscetibilidade alélica do gene *CYP1A1m1*

A média da idade observada para os pacientes com CEC da laringe foi de 58,1 (DP $\pm$ 10,3), próxima da média observada para o grupo controle de 56,6 (DP $\pm$ 9,6). De acordo com o resultado do teste de χ^2 (tabelas de contingência 2x3) os intervalos de idade entre os grupos caso e controle não apresentaram diferença estatística ($\chi^2=2,49$; $p= 0,28$), indicando que o pareamento por idade foi adequado. A frequência de homens e mulheres também foi homogeneamente distribuída entre os grupos de pacientes e controles, indicando que o pareamento por sexo foi adequado ($\chi^2=2,92$; $p= 0,12$) (Tabela 1). As frequências alélicas do gene *CYP1A1* para os alelos T e C foram 58,9% e 41,1% para os pacientes com carcinomas laríngeos, e de 56,1% e 43,9% para o grupo controle, respectivamente. Pelo teste do χ^2 , a diferença alélica entre as populações não se mostrou significativa, tendo $p = 0,79$ ($\chi^2 = 0,16$; GL= 1 e IC= 95%). A distribuição das respectivas frequências encontra-se na Tabela 2.

De acordo com o teste de Hardy-Weinberg observou-se que as populações não se encontram em equilíbrio para a variante *m1* do gene *CYP1A1*. Ao ser aplicado o teste de χ^2 , a hipótese de nulidade foi aceita, pois $p > 0,05$ ($\chi^2 = 0,19$; GL = 2; IC = 95%). A distribuição das frequências genotípicas observadas e esperadas encontra-se na Tabela 3. Afim de verificar se a presença dos genótipos T/T, T/C e C/C possui relação com o risco do desenvolvimento do câncer laríngeo, foi aplicado o teste *Odds Ratio*. Adicionalmente, foram associados aos genótipos, as variáveis sexo, etilismo e tabagismo (Tabela 4). De acordo com o teste, o perfil

1 genotípico não apresentou risco entre os pacientes com câncer da laringe, nem mesmo
2 associados às variáveis sexo, etilismo e tabagismo.

3 Foi verificada a associação entre o genótipo e a idade do paciente no momento do
4 diagnóstico associando ao risco do desenvolvimento do carcinoma laríngeo, utilizando o Teste
5 de Tendência. Os resultados sugerem que não há relação entre o intervalo de tempo e o
6 desenvolvimento do câncer de laringe nos pacientes estudados. A distribuição das frequências
7 genotípicas em relação à idade em intervalos de tempo e os respectivos valores de A e p podem
8 ser observados na Tabela 5.

9 **Análise da suscetibilidade alélica dos genes *GSTM1* e *GSTT1***

10 A média de idade observada para os pacientes com CEC da laringe foi de 58,1
11 (DP±10,3), próxima da média observada para o grupo controle de 56,6 (DP±9,6). De acordo
12 com o resultado do teste de χ^2 (tabelas de contingência 2x3) os intervalos de idade entre os
13 grupos caso e controle não apresentaram diferença estatística ($\chi^2=2,49$; $p= 0,28$), indicando que
14 o pareamento por intervalo de idade foi adequado. A frequência de homens e mulheres também
15 foi homogeneamente distribuída entre os grupos de pacientes e controles, indicando que o
16 pareamento por sexo foi adequado ($\chi^2=2,92$; $p= 0,12$) (Tabela 1).

17 As frequências genotípicas positivas observadas para os genes *GSTM1* e *GSTT1* foram
18 de 41,3% (26/63) e 54,0% (34/63) para os pacientes com carcinomas laríngeos, e de 49,0%
19 (24/49) e 51,0% (25/49) para o grupo controle, respectivamente. Para a avaliação do genótipo
20 *GSTM1* (nulo) e *GSTT1* (nulo), os pacientes do grupo caso apresentaram 58,7% (37/63) e 46,0%
21 (29/63) de genótipos nulos para *GSTM1* e *GSTT1*, enquanto que os pacientes do grupo controle
22 apresentaram 51,0% (25/49) e 40,8% (20/49). Pelo teste do χ^2 , a diferença alélica entre as
23 populações não se mostrou significativa para o genótipo *GSTM1* (nulo), tendo $p = 1,19$ ($\chi^2 =$
24 $0,27$; GL= 1 e IC= 95%). O mesmo foi observado para o genótipo *GSTT1* (nulo), tendo $p = 0,54$
25 ($\chi^2 = 0,55$; GL= 1 e IC= 95%). A distribuição das respectivas frequências encontra-se na Tabela
26 6.

27 Para verificar se a presença dos genótipos nulos pode ter relação com o risco do câncer
28 da laringe, foi aplicado o teste *Odds Ratio* em tabela de contingência 2 x 2 (Tabela 7).
29 Adicionalmente, foram associados aos genótipos as variáveis sexo, tabagismo e etilismo. De
30 acordo com o teste, nenhum dos genótipos dos pacientes oferece risco de câncer laringe, nem
31 mesmo associados às variáveis sexo, etilismo e tabagismo (Tabela 8). Foi verificada a
32 associação entre o genótipo nulo dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e a idade no momento do
33 diagnóstico relacionado ao risco de câncer da laringe, utilizando o Teste de Tendência. Foram
34 utilizadas tabelas de contingência 2 x k, onde foram inseridas as frequências absolutas dos
35

indivíduos em relação ao genótipo e à idade em intervalos de tempo. Os resultados sugerem que não há relação entre o intervalo de tempo e o desenvolvimento do câncer de laringe nos pacientes estudados. A distribuição das frequências genótípicas em relação à idade em intervalos de tempo e os respectivos valores de A e p encontram-se na Tabela 9.

Discussão

O presente estudo buscou analisar os polimorfismos genéticos de *CYP1A1m1*, *GSTM1* e *T1* associados as variáveis sexo, idade e ao consumo de substâncias pré-cancerígenas, como tabaco e álcool, comparando grupos caso e controle, de pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de laringe, pelo Serviço de Cabeça e Pescoço de um hospital de referência no diagnóstico e tratamento de câncer no Brasil Central, Hospital Araújo Jorge (Goiânia, GO, Brasil). Diante deste cenário, o estudo de alguns indivíduos ou pacientes com câncer podem apresentar suscetibilidade aumentada para o desenvolvimento da doença de acordo com as diferenças individuais no biometabolismo. Alguns estudos identificaram a relação de inúmeros polimorfismos genéticos com as variações na capacidade de metabolização de xenobióticos, sendo a maioria desses de relevância clínica (Amorim, 2003; González, 1998).

Um estudo conduzido por Hernando-Rodriguez et al. (2012) avaliando câncer de cabeça e pescoço, indicou que o tabagismo é um fator de risco importante para este sítio. No entanto, como nem todos os fumantes desenvolvem câncer oral, algumas pessoas devem ser mais suscetíveis a desenvolver esta doença. Esta suscetibilidade individual tem sido relacionada a diferentes variantes genéticas no metabolismo de enzimas. O citocromo P-450 (*CYP*) família de enzimas metabolizam substâncias cancerígenas relacionadas com o tabaco, que produzem metabólitos reativos, que podem causar danos ao DNA (Maurya et al. 2015, Varela-Lema et al. 2008). Devido ao seu papel funcional no metabolismo de compostos relacionados com o tabaco, os polimorfismos genéticos encontrados nos genes que codificam para enzimas *cyp* foram sugeridas para modular o risco de câncer oral e contribuir para a suscetibilidade individual (Hernando-Rodriguez et al., 2012).

O gene *CYP1A1* codifica uma enzima chave no metabolismo de agentes xenobióticos considerada um potencial marcador de suscetibilidade a vários tipos de cânceres, especialmente por estar envolvida com a biotransformação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs), como o benzopireno, um potente carcinógeno presente na fumaça do cigarro (Maurya et al., 2015). Todos os estudos de associação envolvendo o gene *CYP1A1m1*, descritos a seguir, incluindo o presente trabalho, adotam como genótipo considerado de risco o que contém, em heterozigose ou homozigose, os genótipos *CYP1A1* (T/C) ou *CYP1A1* (C/C), que são comparados em relação à frequência do genótipo homozigoto para o genótipo *CYP1A1* (T/T).

Adicionalmente, três genes em particular, *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* parecem relevantes para a suscetibilidade ao câncer, pois atuam na destoxificação de metabólitos reativos de substâncias carcinogênicas presentes no ambiente. Os genes, *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* são polimórficos na população humana (Norppa, 2003). Indivíduos portadores da deleção do alelo *GSTM1* e/ou do *GSTT1* em homozigose podem apresentar suscetibilidade para desenvolver alguns tipos de neoplasias, principalmente os tumores etiologicamente relacionados aos modos e hábito de vida devido à redução nos processos de detoxificação (Miller et al., 2002; Garcia-Closas et al., 2005). Grande parte dos estudos apresentam resultados inconclusivos quanto a associação de polimorfismos de *CYP* ou *GSTM1* (*null*) são positivamente associados com o risco para desenvolver câncer da laringe, faringe, ou a cavidade oral (Marques et al., 2006). As diferenças étnicas em metanálises e agrupados podem ter contribuído para inconsistências na identificação de suscetibilidade genética para o câncer de sítios de cabeça e pescoço nesses estudos (Varela-Lema et al, 2008; Zhuo et al., 2009; Lu et al., 2011).

No presente estudo foram estudados os genótipos de *CYP1A1m1*, *GSTM1* e *T1* em 63 pacientes com carcinomas espinocelular da laringe e em 49 controles. A comparação das frequências obtidas entre os dois grupos indicou ausência de associação positiva ou negativa com a suscetibilidade ao câncer laríngeo, como indicado nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 9. Avaliando a distribuição das frequências genótípicas do gene *CYP1A1m1*, todos os pacientes do grupo caso declaram ser tabagistas, sendo a maioria heterozigotos T/C (53,2%) e homozigotos C/C (32,3%). Dos 36 pacientes etilistas, a maioria também são heterozigotos T/C (25,9%) e homozigotos C/C (19,4%). Tais dados, apesar de estarem associados ao alelo mutante C, são insuficientes para fornecer informações consistentes sobre a relação do tabaco com o desenvolvimento do câncer de laringe nos genótipos avaliados. A relação entre o desenvolvimento da doença e a idade também não apresentou diferença significativa.

Por outro lado, algumas formas variantes do *CYP1A1* demonstraram ser particularmente ativa na metabólica ativação de carcinógenos do fumo do tabaco (Androutsopoulos et al., 2009). Um estudo similar observou o aumento do risco (com de 5 a 12 vezes), em câncer de cavidade oral ou faringe, embora em menor grau, sugere que a interação entre *CYP* entre o fumo do tabaco pode ser importante na determinação do risco de malignidades para estes sublocais também, mesmo que a relação tem sido demonstrada ser mais forte para o câncer de laringe (Choi & Kahyo, 1991). Estudos de metanálises também observaram a diferença de risco para a via oral e o risco de câncer da faringe entre os fumantes de tabaco em casos com genótipos variantes do *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C* ou *GSTM1* (*null*) com relatos do uso de baixos níveis tabaco (Varela-Lema et al., 2008). Adicionalmente, os mesmos autores observaram um aumento do risco de câncer de cavidade oral em casos que

1 realizaram uma combinação de *GSTM1* (*null*) e *CYP1A1**2A, embora não se observou esse
2 efeito com câncer de faringe.

3 O presente estudo ao avaliar a distribuição das frequências genótípicas para *GSTM1* e
4 *GSTT1* nulos não se mostrou diferentes estatisticamente entre pacientes do grupo caso e
5 controle. Não foram observadas associações entre o risco relativo entre os genótipos
6 considerados de risco (*GSTM1* e *GSTT1* nulos) e os genótipos ditos como selvagens (*GSTM1* e
7 *GSTT1* presente). As variáveis sexo e estilo de vida não se mostraram diferentes
8 estatisticamente entre os grupos caso e controle. Não houve diferença estatisticamente
9 significativa entre os intervalos de tempo nas datas do diagnóstico dos pacientes com câncer de
10 laringe quanto aos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulos. Em contrapartida, diversos estudos
11 apontam que o genótipo *GSTM1* nulo foi associado a diversos tipos de cânceres, como o de
12 pulmão (Gaspar et al., 2004); bexiga (Johnson & Evans, 2002); mama (Mitruen et al., 2001) e
13 de cabeça e pescoço (Au et al., 2001). A associação do câncer de cabeça e pescoço com os
14 hábitos tabagismo e etilismo tem sido investigada por muito tempo, relacionando as alterações
15 moleculares com estes hábitos como um papel causal importante na transformação para a
16 malignidade (Singh et al., 2009).

17 Embora o presente estudo mostrou que o ambiente não apresentou modificações no
18 risco para o desenvolvimento de câncer de laringe, deve reconhecer-se que as interações gene e
19 ambiente não são mascaradas pelas variáveis genéticas, com a mesma extensão que os principais
20 efeitos genéticos. Outros fatores de risco podem modificar o risco de câncer, tais como a dieta,
21 estado geral de saúde ou condição socioeconômica, embora, segundo Davey Smith (2011)
22 inúmeras tentativas foram feitas para concentrar dados de status sócioeconômicos semelhantes.
23 Adicionalmente, é importante notar que mutações somáticas em tumores, mecanismos
24 epigenéticos e variantes genéticas de outros genes, como genes de reparo de DNA e supressores
25 de tumor também podem interagir com os hábitos tabagista e etilista e risco diferenciado no
26 desenvolvimento câncer de câncer de cabeça e pescoço (Petitjean et al., 2007; Khlifi et al, 2012;
27 Jia et al., 2014).

28 Em conclusão, o presente estudo não observou evidências de que polimorfismos em
29 genes de metabolismo de xenobióticos (*CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1*) influência na
30 suscetibilidade de câncer de células escamosas de laringe. As diferenças na suscetibilidade a
31 doenças malignas não só podem ser atribuídas exclusivamente a diferenças em alterações
32 genéticas nestes genes, em pacientes acometidos com câncer de laringe, mas também a
33 diferenças na sua interação com fatores de risco ambientais, bem como em alterações em outros
34 genes conhecidos associados a iniciação, promoção e progressão tumoral. O estudo de
35 alterações adicionais em regiões previamente estudadas e a investigação de outros fatores

1 associados aos carcinomas laríngeos poderão vir a ser ferramentas importantes na estimativa do
2 prognóstico da progressão tumoral e, conseqüentemente, na melhoria da qualidade de vida dos
3 pacientes.

5 Referências

- 7 1. Abdel-Rahman, SZ; El-Zein, RA; Anwar, WA; Au, WW. A multiplex PCR procedure for
8 polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.*
9 1996;10:229-233.
- 10 2. Amorim, LMF; Lotsch, PF; Simão, TA; Gallo, CVM; Pinto, LFR. Analysis of CYP1A1 exon 7
11 polymorphisms by PCR-SSCP in a Brazilian population and description of two novel gene
12 variations. *Mutat. Res.* 2004;547:35-40.
- 13 3. Au WW, Oh HY, Grady J, Salama SA, Heo MY. Usefulness of genetic susceptibility and
14 biomarkers for evaluation of environmental health risk. *Environ. and Mol. Mutagenesis*
15 2001;37:215-225.
- 16 4. Bray F, Jemal A, Forman D et al. Global cancer transitions according to the Human Development
17 Index (2008-2030): a population-based study. *The Lancet Oncology* 2012; 13(8):790-801.
- 18 5. Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for
19 therapy. *J Dent Res.* 2008;87(1):14-32.
- 20 6. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin*
21 *Oncol.* 2009; 21(3):194-200.
- 22 7. Davey Smith G. Use of genetic markers and gene-diet interactions for interrogating population-level
23 causal influences of diet on health. *Genes Nutr* 2011;6:27–43.
- 24 8. Feller L. et al. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV- associated oral and
25 oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: Human papillomavirus-mediated
26 carcinogenesis. *Head & Face Medicine* 2010;6(14).
- 27 9. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking
28 and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2008;122(1):155-64.
- 29 10. Garcia-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, et al. NAT2 slow acetylation, GSTM1
30 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and
31 meta-analyses. *Lancet*, 2005;366:649–59.
- 32 11. Gaspar P, Moreira J, Kvitko K, Torrer M, Moreira A, Wiemer T. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1,
33 GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive
34 pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genetics and Molecular Biology* 2004;27:133-
35 138.
- 36 12. González, MV; Alvarez, V; Pello, MF; Menéndez, MJ; Suárez, C; Coto, E. Genetic polymorphism
37 of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase-M1, and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in
38 the susceptibility to head and neck cancer. *J. Clin. Pathol.* 1998;51:294–298.
- 39 13. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, et al. Interaction between tobacco
40 and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the international Head and
41 Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(2):541-50.
- 42 14. Hauashi, S; Watanabe, J; Nakachi, K; Kawajiri, K. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI
43 polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome
44 P450IA1 gene. *J. Biochem.* 1991;110:407-411.
- 45 15. Hernando-Rodriguez M, Rey-Barja N, Marichalar-Mendia X, Rodriguez-Tojo MJ, Acha-Sagredo A
46 and Aguirre-Urizar JM. Role of cytochrome P-450 genetic polymorphisms in oral carcinogenesis.
47 *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2012;41:1–8.
- 48 16. Jia P, Pao W, Zhao Z. Patterns and processes of somatic mutations in nine major cancers. *BMC*
49 *Med Genomics* 2014;7:11.
- 50 17. Johnson, JA & Evans, WE. Molecular Diagnostics as a predictive tool: genetics of drug efficacy
51 and toxicity. *Trends in molecular medicine* 2002;8(6):300-305.
- 52 18. Khlifi R, Rebai A, Hamza-Chaffai A. Polymorphisms in human DNA repair genes and head and
53 neck squamous cell carcinoma. *J Genet* 2012;91:375–384.

19. Kim KM, Kim YM, Shim YS, Kim KH, Chang HS, Choi JO. Epidemiologic survey of head and neck cancers in Korea. *Journal of Korean Medical Science* 2003;18:80-7.
20. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(19):3128-37.
21. Lee YC, Boffetta P, Sturgis EM, Wei Q, Zhang ZF, Muscat J, et al. Involuntary smoking and head and neck cancer risk: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(8):1974-81.
22. Liang C, Marsit CJ, Houseman EA, Butler R, Nelson HH, McClean MD, et al. Gene-environment interactions of novel variants associated with head and neck cancer. *Head Neck.* 2012;34(8):1111-8.
23. Lu D, Yu X, Du Y. Meta-analyses of the effect of cytochrome P450 2E1 gene polymorphism on the risk of head and neck cancer. *Mol Biol Rep* 2011;38:2409-2416.
24. Marques CF, Koifman S, Koifman RJ, Boffetta P, Brennan P, Hatagima A. Influence of CYP1A1, CYP2E1, GSTM3 and NAT2 genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: results from a case-control study in Rio de Janeiro. *Oral Oncology* 2006;42:632-637.
25. Maurya SS, Katiyar T, Dhawan A, Singh S, Jain SK, Pant MC and Parmar D. Gene-Environment Interactions in Determining Differences in Genetic Susceptibility to Cancer in Subsites of the Head and Neck. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2015;56:313-321.
26. Menezes, AMB; Horta, BL; Oliveira, ALB; Kaufmann, RAC; Duquia, R; Diniz, A; Motta, LH; Centeno, MS; Estanislau, G; Gomes, L. Risco de câncer de pulmão, laringe e esôfago atribuível ao fumo. *Rev Saúde Pública* 2002;36(2):129-34.
27. Miller PD, Liu G, De Vivo I, Lynch TJ, Wain JC, Su L and Christiani DC. Combination of the variant genotype of GSTP1, GSTM1 and, p53 are associated with an increased lung cancer risk. *Cancer Res.* 2002;62:2819-2823.
28. Ministério da Saúde. Brasil. Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.
29. Mitruen K, Jourenkova N, Kataja V, Eskelinen M, Kosma V, Benhamou S, Vainio H, Uusitupa M, Hirvonen A. Glutathione *S*-transferase *M1*, *M3*, *P1*, and *T1* genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. *Can. Biom. Prev.* 2001;10(3):229-256.
30. Norppa H. Genetic susceptibility, biomarkers response, and cancer. *Mutat Res.* 2003; 544:339-348.
31. Peters ES, McClean MD, Marsit CJ, Luckett B, Kelsey KT. Glutathione *S*-transferase polymorphisms and the synergy of alcohol and tobacco in oral, pharyngeal, and laryngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2196-2202.
32. Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: Functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 2007;26:2157-2165.
33. Ribeiro Pinto LF. Differences between isoamyl alcohol and ethanol on the metabolism and DNA ethylation of N-nitrosodiethylamine in the rat. *Toxicology, Limerick* 2000;151(1/3):73-79.
34. Roswall N & Weiderpass E. Alcohol as a risk factor for cancer: existing evidence in a global perspective. *Journal of Preventive Medicine and Public Health* 2015;48:1-9.
35. Singh AP, et al., Polymorphism in cytochrome P4501A1 is significantly associated with head and neck cancer risk, *Cancer Investig.* 2009;27(8):869-876.
36. Thuler LC, de Menezes RF, Bergmann A. Cancer cases attributable to alcohol consumption in Brazil. *Alcohol* 2016 Aug;54:23-6.
37. Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M Jr, Dikkers FG, Rinaldo A, Takes RP, et al. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck.* 2011;33(4):581-6.
38. Tripathy CB, Roy N. Meta-analysis of glutathione *S*-transferase *M1* genotype and risk toward head and neck cancer. *Head Neck* 2006;28:217-224.
39. Varela-Lema L, Taioli E, Ruano-Ravina A, Barros-Dios JM, Anantharaman D, Benhamou S, Boccia S, Bhisey RA, Cadoni G, Capoluongo E, et al. Meta-analysis and pooled analysis of GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms and oral and pharyngeal cancers: A HuGE-GSEC review. *Genet Med* 2008;10:369-384.
40. Venturi BRM, Pamploma ACF, Cardoso AS. Carcinoma de células escamosas da cavidade oral em pacientes jovens e sua crescente incidência: revisão de literatura. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2004;70(5): 679-86.

41. Visoni SBC. O papel das enzimas CYP2A na susceptibilidade ao câncer de esôfago e sua regulação [tese]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2009.
42. Wall TL, Schoedel K, Ring HZ, Luczak SE, Katsuyoshi DM, Tyndale RF. Differences in pharmacogenetics of nicotine and alcohol metabolism: review and recommendations for future research. *Nicotine Tob Res.* 2007;9 Suppl 3:S459-74.
43. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Vol 100E—Tobacco Smoking [monograph on the Internet]. Lyon: IARC; 2012.
44. World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic, 2011: Warning about the dangers of tobacco. Geneva: WHO, 2011.
45. Zhuo W, Wang Y, Zhuo X, Zhu Y, Wang W, Zhu B, Li D, Chen Z. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk: Association studies via evidence-based meta-analyses. *Cancer Invest* 2009;27:86–95.

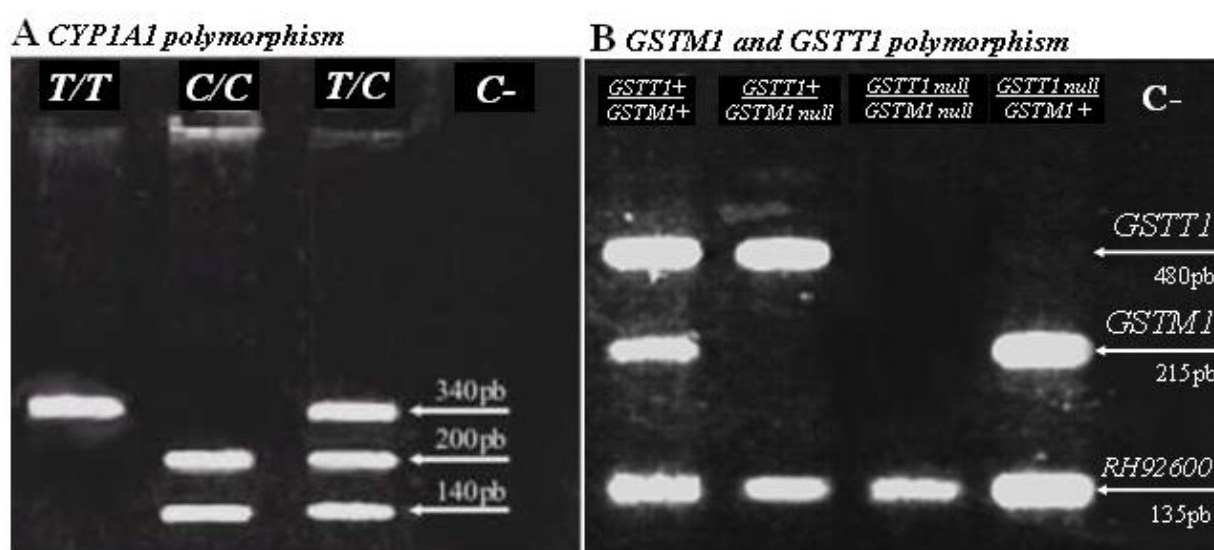


Figure 1. The PCR-RFLP analyses result of *CYP1A1* (A) and *GSTM1/GSTT1* (B) polymorphisms.

A. *CYP1A1* polymorphism, the T allele was not cleaved by *MspI* and had a single band with a fragment of 340 bp. The C allele was cleaved by *MspI* and yielded two small fragments (200 and 140 bp). The heterozygote had three bands. B. The *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms, the band with fragment of 480bp indicates the presence of the *GSTT1* gene (*GSTT1*+), but the absence of this fragment indicates a *GSTT1 null* genotype. The band with fragment of 215pb gene *GSTM1* (*GSTM1*+) and the absence this fragment indicates the *GSTM1 null* genotype. The band with fragment of 135pb indicates the presence of endogenous human DNA in the sample.

Table 1. Demographic characteristics of larynx cancer cases and controls

Characteristics	Cases (<i>n</i> = 63) <i>n</i> (%)	Controls (<i>n</i> = 49) <i>n</i> (%)	χ^2	<i>P</i> value
Age (y)				
< 40	2 (3.2)	1 (2.0)	2.49	0.28
40 – 60	33 (52.4)	31 (63.3)		
> 60	28 (44.4)	17 (34.7)		
Sex				
Female	15 (23.8)	7 (14.3)	2.92	0.12
Male	48 (76.2)	42 (85.7)		

Table 2. *CYP1A1* allelic and genotypic frequency of larynx cancer cases and controls

Frequency	Cases (n = 63) %	Controls (n = 49) %	χ^2	P value
Allele				
T	58.9	56.1	0.16	0.79
C	41.1	43.9		
Genotype				
T/T	21.5	15.4	0.19	0.90
T/C	30.0	24.1		
C/C	10.5	9.4		

Table 3. *CYP1A1* genotype frequency based OR in larynx cancer cases and controls

Genotype	Cases		Controls		OR ^a (95% CI)	P value
	GR*	GNR*	GR	GNR		
T/C	33	20	27	14	0.86 (0.36-2.00)	0.86
C/C	9	20	8	14	0.79(0.24-2.54)	0.92
(T/C + C/C)	42	20	35	14	0.08(0.37-1.90)	0.83

* GR = genotype risk; GNR = genotype no risk.

^a OR, adjusted *odds ratio*; 95% CI (confidence interval).

Table 4. *CYP1A1* genotypic frequency adjusting for sex, cigarette smokers and alcohol drinkers based OR in larynx cancer cases and controls

Characteristics	Genotype	OR ^a (95% CI)	P value
Male	T/T x T/C	1.04(0.31-3.44)	0,81
	T/C x C/C	0.64(0.17-2.35)	0,74
	T/C x C/C	0.62(0.23-1.60)	0,45
Female	T/T x T/C	0.60(NR)	0.71
	T/C x C/C	2.00(NR)	0.81
	T/C x C/C	3.33(NR)	0.52
Cigarette smokers	T/T x T/C	0.93(0.29-2.90)	0.86
	T/C x C/C	0.96(0.29-3.18)	0.80
	T/C x C/C	1.03(0.43-2.48)	0.88
Alcohol drinkers	T/T x T/C	0.78(0.24-2.54)	0.91
	T/C x C/C	0.59(0.16-2.18)	0.64
	T/C x C/C	0.75(0.24-2.34)	0.84

* NR: not rated.

^a OR, adjusted *odds ratio*; 95% CI (confidence interval).

Table 5. Genotypic frequencies of *CYP1A1* distributed in relation to age at time intervals

Genotype	Age (y)			A*	X ²	P value
	30 - 49	50 - 69	70 - 89			
T/T x T/C	3	5	1	-1.14	0.56	0.45
	6	23	4			
T/T x C/C	3	5	1	-0.75	0.17	0.67
	7	8	5			
T/C x C/C	6	23	4	0.49	0.04	0.82
	7	8	5			

*area of coverage of the tendency test

Table 6. *GSTM1* and *T1* genotypic frequency of larynx cancer cases and controls

Frequency	Cases (n = 63) n (%)	Controls (n = 49) n (%)	χ^2	P value
<i>GSTM1</i>				
<i>present</i>	26(41.3)	24(49.0)	0.27	0.19
<i>null</i>	37(58.7)	25(51.0)		
<i>GSTM1</i>				
<i>present</i>	34(54.0)	29(59.2)	0.55	0.54
<i>null</i>	29(46.0)	20(40.8)		

Table 7. *GSTM1* and *T1* genotype frequency based OR in larynx cancer cases and controls

Genotype	Cases		Controls		OR ^a (95% CI)	P value
	GR*	GNR*	GR	GNR		
<i>GSTM1</i>	37	26	25	24	1.36(0.64-2.89)	0.53
<i>GSTT1</i>	29	34	20	29	1.23(0.58-2.63)	0.71

* GR = genotype risk; GNR = genotype no risk.

^a OR, adjusted *odds ratio*; 95% CI (confidence interval).

Table 8. *GSTM1* and *T1* genotypic frequency adjusting for sex, cigarette smokers and alcohol drinkers based OR in larynx cancer cases and controls

Characteristics	Genotype	OR ^a (95% CI)	P value
Male	<i>GSTM1 (present x null)</i>	0.64(0.28-1.49)	0.42
	<i>GSTT1 (present x null)</i>	0.65(0.28-1.53)	0.44
Female	<i>GSTM1 (present x null)</i>	1.66(0.24-11.57)	0.96
	<i>GSTT1 (present x null)</i>	2.85(0.41-19.64)	0.53
Cigarette smokers	<i>GSTM1 (present x null)</i>	0.68(NR)	0.87
	<i>GSTT1 (present x null)</i>	3.92(0.38-39.92)	0.47
Alcohol drinkers	<i>GSTM1 (present x null)</i>	0.54(0.19-1.50)	0.35
	<i>GSTT1 (present x null)</i>	0.59(0.21-1.64)	0.45

* NR: not rated.

^a OR, adjusted *odds ratio*; 95% CI (confidence interval).

Table 9. Genotypic frequencies of *CYP1A1* distributed in relation to age at time intervals.

Genotype	Age (y)			A*	X ²	P value
	30 - 49	50 - 69	70 - 89			
<i>GSTM1 (present x null)</i>	6	14	6	2,47	0,99	0,31
	10	23	4			
<i>GSTT1 (present x null)</i>	11	18	5	-2,76	1,20	0,27
	5	19	5			

*area of coverage of the tendency test

Artigo 02 – Submetido à *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, Medicina 1: Qualis A2, Fator de Impacto (2014): 4.125.

TP53 polymorphism analysis and HPV infection in cancer of larinx of Central Brazil

Paulo Marcelo de Farias Vasconcelos,¹ Cláudio Carlos da Silva,^{1,2} Aparecido Divino da Cruz^{1,2} * and Maria Paula Curado³

* contato: acruz@pucgoias.edu.br

a) Núcleo de Pesquisas Replicon
Department of Biology
Pontifical Catholic University of Goiás
40, 235 Street, Area 4, Block L
Universitário, Goiânia, GO, Brazil
ZIP 74605-050
Phone: +55 62 3946 1385

b) Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene)
Laboratório Central Dr Giovanni Cysneiros (LACEN)
Secretaria de Estado da Saúde de Goiás
40, 235 Street, Area 4, Block L
Universitário, Goiânia, GO, Brazil
ZIP 74605-050
Phone: +55 62 3946 1385

c) Centro Internacional de Pesquisa
A.C. Camargo Cancer Center
204, Pirapitingui Street
Liberdade, São Paulo, SP, Brazil
ZIP 01508-010
Phone: +55 11 2189 5000

Resumo

O conhecimento da carcinogênese ativada pelo papilomavírus humano (HPV) e a inativação do gene supressor tumoral *TP53* pela oncoproteína E6 e pela inativação da apoptose celular conduz a um crescimento preferencial das células afetadas que se caracteriza por um incremento progressivo e descontrolado do câncer. O objetivo do presente estudo foi de avaliar uma possível associação do polimorfismo genético do gene *TP53* (códon 72), relativos à infecção pelo HPV em grupos de caso-controle dos pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas (CCE) de laringe em pacientes atendidos pelo Serviço de Cabeça e Pescoço de um Hospital Araújo Jorge, referência no Brasil Central em diagnóstico e tratamento de câncer. Ao todo, 112 pacientes foram avaliados, sendo 63 do grupo caso. Foi avaliado o polimorfismo do códon 72 (*Arg* ou *Pro*) do gene *TP53* e adicionalmente, amostras de biópsias frescas foram submetidas a identificação e genotipagem do HPV. O estudo revelou que indivíduos *Pro/Pro* desenvolveram câncer da laringe mais tardiamente do que os pacientes *Arg/Arg* e *Arg/Pro*. Adicionalmente, comparando os grupos caso e controle, foi observado um risco maior de 2.7 vezes de desenvolver câncer de laringe com a presença do genótipo *Arg/Pro*. A frequência do genoma do HPV foi de 3% das amostras analisadas (HPV11 e 16/45). Alterações adicionais em regiões previamente estudadas e a investigação de outros fatores associados aos carcinomas laríngeos poderão vir a ser ferramentas importantes na estimativa do prognóstico da progressão tumoral e, consequentemente, na melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

1 **Introdução**

2 Os tumores de cabeça e pescoço pela expressividade, incidência, morbidade,
3 mortalidade e alta letalidade, representam um relevante problema de saúde pública mundial,
4 particularmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil. O conjunto de tumores da
5 cavidade oral, faringe e laringe representam cerca de 90% de todos as neoplasias que envolve a
6 região anatômica de cabeça e pescoço (Curado & Hashibe, 2009). Segundo a Agência
7 Internacional de Pesquisa contra o Câncer (do inglês: *International Agency for Research on*
8 *Cancer* - IARC), os casos de câncer no mundo deverão aumentar em 75% até 2030 (Bray et al.,
9 2012). Porém, um melhor entendimento dos papéis dos genes supressores de tumor e dos
10 oncogenes nos mecanismos relacionados com os processos de diferenciação celular, podem
11 contribuir para uma melhor compreensão da gênese dos carcinomas de cabeça e pescoço e
12 consequentemente, para redução da incidência e mortalidade provocadas por esta doença.

13 O conhecimento da suscetibilidade individual para o desenvolvimento do câncer tem
14 crescido, e muitos estudos têm mostrado a interação gene-ambiente na carcinogênese (MS,
15 2014). Polimorfismos em genes de reparo do DNA podem alterar o resultado da exposição e, a
16 frequência de alguns destes polimorfismos diferem significativamente em diferentes grupos
17 étnicos e/ou populações. Hábitos culturais ou formas diferentes de exposição aos agentes
18 agressores também podem diferir entre estes grupos (MS, 2012). Uma importante categoria de
19 genes envolvidos no processo de carcinogênese é conhecida como genes supressores tumorais
20 (GST) ou TSG (do inglês, *Tumor suppressor genes*) que agem normalmente como reguladores
21 negativos da proliferação celular. Um dos principais genes representantes desta categoria é o
22 gene *TP53* cuja mutação ou inativação está implicada no surgimento do câncer (Vazquez et al.,
23 2008).

24 O gene *TP53* também promove um *check point* de S para G2, que depende da
25 integridade do domínio c-terminal do gene. Portanto, quando *TP53* sofre mutações, as células
26 com danos no DNA, escapam do reparo destes danos e de sua destruição, podendo iniciar um
27 clone maligno. Apesar de ser observada principalmente em células somáticas, a importância
28 médica do gene *TP53* é inegável, primeiro porque a detecção de mutações pode ser indicadora
29 do diagnóstico e do prognóstico, segundo porque é um alvo perfeito para prevenção, o que
30 estimula as abordagens de terapia gênica (Partridge et al., 2007; Vazquez et al., 2008).

31 Em adição às mutações, alguns estudos têm focado os polimorfismos do gene *TP53*
32 como fatores de risco na carcinogênese. Estão depositados no banco de dados da *International*
33 *Agency Research on Cancer* (IARC) sequências nucleotídicas de 14 diferentes tipos
34 polimórficos do gene *TP53*, no qual, inúmeros tipos de câncer, a maioria mutações no gene
35 *TP53* em câncer de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) são mutações missense,

frequentemente ocorrendo dentro da região central da proteína, que serve como o domínio de ligação entre a *p53* e o DNA. Dados atualizados demonstraram que, embora o espectro de mutações do gene *TP53* são do tipo missense, várias mutações missense como os códons R248, R273, G245, R175, R282, e H179, são as mais mutações do tipo *hotspot* prevalentes em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, sendo que um destes polimorfismos acomete o códon 72 no éxon 4 deste gene supressor tumoral (Pickering et al., 2013). O polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* é um polimorfismo de único nucleotídeo (*SNP* do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) o qual resulta na expressão da proteína *p53* contendo arginina ou prolina no resíduo de posição 72. Estas variantes de *p53* apresentam diferentes propriedades bioquímicas e biológicas, e por isso, são bastante pesquisadas no campo da oncologia molecular de diversas neoplasias (Galli et al, 2009; IARC, 2012).

As mutações no gene *TP53* têm sido encontradas em quase todos os tipos de câncer em várias frequências e diferentes em sua natureza (Zhou et al. 2016; Gleich, 2002). O polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* tem sido investigado extensivamente para associação com vários cânceres em todo o mundo (Bergamaschi et al., 1999). Vários autores têm demonstrado que a presença de Arg72Arg confere maior risco de desenvolvimento de tumores, como em cânceres de bexiga, cérvix uterino, mama entre outros (Thomas et al., 1999). Neste contexto, células infectadas pelo papilomavírus humano (HPV), a proteína E6 associada ao câncer liga-se a proteína *p53* e promove sua degradação, através de um sistema ubiquitina proteolítica, alterando a atividade da *p53* nos processos de tumorigênese, regulação da transcrição, ativação da telomerase, e apoptose, acarretando um descontrole do ciclo celular demonstraram que pacientes os quais eram homozigotos para o alelo *Arg* apresentavam risco de desenvolver câncer, cerca de sete vezes maior que pacientes homozigotos para *Pro*. Isto sugere que não apenas a presença de infecção por HPV, mas uma diferença na estrutura da *p53* possa ser um importante fator a ser considerado para carcinogênese de CCECP.

Entretanto, em recentes estudos amostras cervicais normais e com lesões de alto e baixo risco, não foi possível associar a presença do polimorfismo da *p53* no códon 72 e a frequência dos alelos *Arg* e *Pro* com o aumento do risco para câncer de cabeça e pescoço (Zhou et al. 2013; Whibley et al., 2009). Estes dados sugerem que é improvável a associação entre polimorfismo da *p53* no códon 72 com o desenvolvimento de neoplasias cervicais associadas ao HPV. Entretanto, é válido ressaltar que os resultados controversos encontrados a respeito da associação entre o polimorfismo da *TP53* e CCECP possam ocorrer devido a diversos fatores, como diferenças no polimorfismo da *TP53* entre os grupos étnicos, tamanho da amostra, escolha do controle utilizado, e fonte de obtenção de DNA (Thomas et al., 1999; Whibley et al., 2009).

Alguns estudos encontraram evidências de que os pacientes com CCECP apresentam,

1 preferencialmente, na perda de heterozigose, a deleção do alelo *Pro* e que o alelo *Arg* e
2 associação a uma redução significativa na taxa de morte de oncócitos por apoptose. Porém em
3 outros estudos que objetivaram avaliar a longevidade individual associada ao polimorfismo do
4 gene *TP53* no códon 72, concluíram que as pessoas com genótipo homozigoto para *Pro*
5 apresentaram uma sobrevida relativa cerca de 1,4 vezes maior do que os genótipo homozigotos
6 para *Arg*. Assim, sugere-se que o genótipo *Pro/Pro* confere benefícios significativos para a
7 sobrevida de pacientes com câncer (Schneider-Stock et al., 2004; Donehower, 2005). Orsted et
8 al. (2007) estudando 9.219 indivíduos avaliaram o polimorfismo de *TP53* códon 72, concluíram
9 que os indivíduos *Pro/Pro* têm um aumento médio de 3 anos na sobrevida, quando comparados
10 com os homozigotos para a *Arg/Arg*.

11 Além disso, o estudo do vírus do papiloma humano (HPV) associado ao câncer de
12 cabeça e pescoço tem características epidemiológicas distintas, pois provavelmente, os pacientes
13 não-fumantes, e usuários de álcool são frequentemente, mais jovens do que aqueles que não
14 estão infectados com o HPV, e certos comportamentos sexuais aumentam a exposição ao HPV
15 estão correlacionados com o desenvolvimento de HPV com câncer de cabeça e pescoço (Zhou et
16 al., 2016). O HPV tem sido amplamente associado ao desenvolvimento de tumores cervicais,
17 como colo uterino, e ao desenvolvimento de CCECP. Os oncogenes virais E6 e E7 encontrados
18 integrados ao genoma de células cervicais cancerosas, resultam na estabilidade da expressão das
19 oncoproteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco conhecidas pelo seu envolvimento na iniciação e
20 manutenção de várias neoplasias cervicais. Basicamente, a ligação de E6 a *p53* estimula a
21 degradação de *p53* celular, enquanto que a proteína E7 altera o controle do crescimento celular
22 ligando-se a proteína *rb*, inibindo a sua função. A perda da função de supressão tumoral dos
23 produtos dos genes *TP53* e *RB* podem contribuir significativamente para a carcinogênese (Nair
24 & Pillai, 2005).

25 Estudos têm demonstrado que nos carcinomas de laringe parece apresentar dois
26 comportamentos biológicos diferentes desse tipo de neoplasia: uma relacionada a fatores como
27 álcool e tabaco, e outra relacionada ao papilomavírus humano. Além desses, pode-se dizer que
28 características genéticas individuais talvez sejam os principais fatores na determinação do efeito
29 de uma substância ou agente agressor como responsável por uma neoplasia maligna (Audi et al.,
30 2000; Syrjänen, 2005; Liang et al., 2012). Estudos demonstram que dadas as semelhanças em
31 termos epiteliais da região genital com a cavidade oral (escamoso e estratificado), em quase
32 todos os cânceres do cólo do útero, do trato ano-genital e CCECP provocados por HPV,
33 verifica-se a presença dos subtipos de HPV mais oncogênicos, 16 e 18 (Ragin et al., 2007). A
34 IARC avaliou a carcinogenicidade do HPV e concluiu que há evidências suficientes sobre o
35 papel do HPV 16 na carcinogênese do CEC de laringe, além de evidências sobre o HPV

1 enquanto carcinógeno na laringe (Pinto et al., 2011; Chaturvedi, 2012).

2 Quando comparamos os outros tipos de câncer, a carcinogênese induzida pelo HPV é
3 um processo complexo caracterizado por alterações nos genes que codificam genes supressores
4 tumorais e por modificações epigenéticas. O conhecimento da carcinogênese ativada pelo HPV
5 e a inativação do gene supressor tumoral *TP53* pela oncoproteína E6 e pela inativação da
6 apoptose, com a consequente instabilidade genômica agravada por efeitos aditivos de um ou
7 mais cofatores conduz a um crescimento preferencial das células afetadas que se caracteriza por
8 um incremento progressivo e descontrolado do câncer (Feller et al., 2010; Faridi et al., 2011). O
9 papel da predisposição genética no carcinoma da laringe, bem como em outros tumores da
10 cabeça e pescoço, tem sido bem documentado através de estudos das síndromes de múltiplos
11 neoplasmas, estudos de múltiplos tumores primários e estudos da história familiar de câncer
12 (Zhou et al., 2016). O objetivo do presente estudo foi de avaliar uma possível associação do
13 polimorfismo genético do gene *TP53* (códon 72), relativos à infecção pelo HPV em grupos de
14 caso-controle dos pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de laringe em
15 pacientes atendidos pelo Serviço de Cabeça e Pescoço de um Hospital Referência no Brasil
16 Central em diagnóstico e tratamento de câncer.

17 **Material e Métodos**

18 **Sujeitos.** Pacientes diagnosticados com câncer de células escamosas da laringe, entre
19 janeiro de 1998 a dezembro de 2008, oriundos do Registro de Câncer de Base Populacional
20 (RCBP) do Hospital Araújo Jorge (HAJ) da Associação de Combate ao Câncer em Goiás
21 (ACCG) localizado na cidade de Goiânia (GO), serviço de referência no diagnóstico e tratamento
22 de câncer da região Central e Norte do Brasil. Durante este período, 63 pacientes foram
23 selecionados para o grupo caso. Adicionalmente, 49 indivíduos foram selecionados fora do
24 HAJ, em outros dois Hospitais da região, como sendo indivíduos da mesma comunidade, porém,
25 sem qualquer diagnóstico recente de qualquer tipo de câncer. No HAJ foram selecionados os
26 casos de câncer primário da laringe por ocasião do diagnóstico, anteriormente ao início do
27 tratamento. O grupo controle, combinado por sexo e idade foi utilizado como um grupo para
28 comparação, quando necessária, com os resultados obtidos nos casos testes.

29 Ao todo, 112 pacientes aceitaram participar do estudo, tanto os indivíduos do grupo
30 controle, quanto os indivíduos do grupo teste receberam informações sobre os objetivos deste
31 estudo e assinaram o termo de consentimento pós-informação e responderam individualmente
32 um questionário, previamente aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa envolvendo seres
33 humanos do Hospital Araújo Jorge/ACCG, com respeito à história individual de exposição a
34 fatores ocupacionais, ambientais e hábitos de vida. Todos os indivíduos foram previamente
35

selecionados sob a condição de não terem sido submetidos à radioterapia ou quimioterapia. Foram excluídos os indivíduos cujo DNA não apresentou boa qualidade para a realização das análises moleculares. No caso dos pacientes, também foram excluídos aqueles cujo laudo histopatológico de câncer de laringe (CID-O: C32) da amostra tumoral não confirmou a presença de malignidade. Foram excluídos do estudo indivíduos-controle que apresentem ou já apresentaram qualquer tipo de neoplasia. Subsequente à entrevista, 112 amostras foram coletadas 10mL de sangue periférico heparinizado, colhidos em tubos *falcon* de 14mL, sendo posteriormente processados a 5000.g r.p.m. durante 15 minutos. A partir dessa etapa, o anel leucocitário foi aspirado e armazenado em microtubos, preservados a -20°C, para posterior análise. Biópsias frescas foram obtidas dos pacientes do grupo caso, no momento da cirurgia no qual o cirurgião retirou amostras da lesão, para avaliação da presença e genotipagem de HPV. As amostras foram coletadas em tubos falcon e acondicionadas em freezer, preservados a -20°C. A análise molecular foi conduzida no Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene), do Laboratório Central Dr Giovanni Cysneiros (LACEN), da Secretaria de Estado da Saúde (SES) do Governo do Estado de Goiás e conjunto com o Núcleo de Pesquisas Replicon, do Departamento de Biologia, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC), ambos localizados na cidade de Goiânia (GO) Brasil Central.

Polimorfismo do gene *TP53* códon 72

A extração, o isolamento e a purificação do DNA foram obtidos pelo kit comercial do DNA Genômico Wizard[®] (Promega Corporation, EUA), seguindo-se exatamente todas as instruções do fabricante. As amostras foram submetidas à duas reações de PCR com os *primers* para genotipagem dos alelos *Arg* e *Pro* seguindo a técnica proposta por Sourvinos et al. (2001). Para controle interno da reação, o *primer* de microsatélite *D8S135* foi utilizado para controle endógeno de DNA. As 112 amostras foram submetidas à PCR em 25µL de reação, contendo água Mili-Q, 0.3nmol de *primers* alelos-específicos, para o alelo *Arg*, *p53+F*: 5'-TCC CCC TTG CCG TCC CAA-3' (*forward*) e *ArgR*: 5'-CTG GTG CAG GGG CCA CGC-3' (*reverse*), o alelo *Pro*, *p53Pro+*: 5'- GCC AGA GGC TGC TCC CCC-3' (*forward*) e *p53R*: 5'-CGT GCA AGT CAC AGA CTT-3' (*reverse*), *D8S135* (*primer microsatélite*): 5'-GGG AGG CTT TAT AAT TAT TTA GC-3' (*forward*) e 5'-CTG GGC AAC AGA GTG GGA C-3' (*reverse*) (Prodinol[®]), seguindo a técnica proposta por Sourvinos e colaboradores (2001), 1U de *Taq DNA polimerase* (Promega[®]), 1X de STR[®] *buffer* (Promega[®]) (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 0,2mM dNTPs e 0,5mM de MgCl₂) e ~100ng de DNA genômico total. Os produtos de PCR foram separados em gel de poliacrilamida a 8% (PAGE 8%) em TBE 1X mediante aplicação de um campo elétrico constante de 10V/cm por 2 horas.

1 Como marcador de tamanho molecular, foi utilizado um *ladder* de 50pb (0,025µg/µL) aplicado
2 nas raias iniciais do gel. Para a visualização do DNA amplificado, o gel foi submerso em TBE
3 1X contendo brometo de etídeo (EtBr) por aproximadamente 15 minutos e em seguida as
4 imagens foram capturadas em sistema de vídeo-documentação ImageMasterVDS® (Amersham
5 Pharmacia Biotech, EUA).

6 A interpretação da eletroforese foi feita da seguinte forma: a presença de uma banda de
7 177pb caracteriza um indivíduo homozigoto para *Pro*; a presença de uma banda de 144 pb
8 caracteriza um indivíduo homozigoto para *Arg*. Duas bandas, uma de 177 pb e outra de 144 pb
9 caracteriza um indivíduo heterozigoto *Arg/Pro* (Figura 01).

11 **Identificação e genotipagem do HPV**

12 A extração, o isolamento e a purificação do DNA foram obtidos pelo kit comercial do
13 DNA Genômico Wizard® (Promega Corporation, EUA), seguindo-se exatamente todas as
14 instruções do fabricante. As amostras foram submetidas a reações de PCR com os *primers* para
15 identificação e genotipagem do HPV, proposta por (Karlsen et al., 1996). Para a realização da
16 PCR foram utilizadas amostras DNA de biópsias frescas de pacientes diagnosticados com
17 câncer de laringe, no qual foram testados os *primers* genéricos *MY09*: 5'- CGT CCA AGA
18 GGA TAC TGA TC-3' (*forward*) e *MY11*: 5'-GCC CAG GGT CAT AAC AAT GG-3'
19 (*reverse*), *GP05* 5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3' (*forward*) e *GP06* 5'-GAA
20 AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3' (*reverse*) e *primers* alelos específicos *HPV06*: 5'-
21 CAC GTC TGC AAC GAC CAT AG-3' (*forward*) e 5'-CCA TGA AAT TCT AGG CAG CA-
22 3' (*reverse*), *HPV11*: 5'- CGC AGA GAT ATA TGC ATA TGC-3' (*forward*) e 5'-AGT
23 TCT AAG CAA CAG GCA CAC-3' (*reverse*), *HPV16*: 5'-TCA AAG CCA CTG TGT CCT
24 GA-3' (*forward*) e 5'-CGT GTT CTT GAT GAT CTG CAA-3' (*reverse*), *HPV18*: 5'-
25 CCG AGC ACG ACA GGA ACG ACT-3' (*forward*) e 5'-TCG TTT TCT TCC TCT GAG
26 TCG CTT-3' (*reverse*), *HPV33*: 5'-AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG-3' (*forward*) e 5'-
27 ACA CAT AAA CGA ACT GTG GTG-3' (*reverse*), *HPV35*: 5'-CCC GAG GCA ACT GAC
28 CTA TA-3' (*forward*) e 5'-GGG GCA CAC TAT TCC AAA TG-3' (*reverse*), *HPV45*: 5'-ACC
29 AGA TTT GTG CAC AGA AT-3' (*forward*) e 5'-TTT TTT CCA GTG TCT CTC CA-3'
30 (*reverse*), *HPV58*: 5'- GGA CAT TGC ATG ATT TGT GT-3' (*forward*) e 5'-TTT CTT GTG
31 GAC ACA ATG GT-3' (*reverse*). O marcador *D8S135*: 5'-GGG AGG CTT TAT AAT TAT
32 TTA GC-3' (*forward*) e 5'-CTG GGC AAC AGA GTG GGA C-3' (*reverse*).

33 Os amplicons foram separados em gel de poliacrilamida a 8% (PAGE 8%) em TBE 1X
34 mediante aplicação de um campo elétrico constante de 10V/cm por 2 horas. Como marcador de
35 tamanho molecular, foi utilizado um *ladder pGem* (0,025µg/µL) aplicado nas raias iniciais do

gel. Para a visualização do DNA amplificado, o gel foi submerso em TBE 1X contendo brometo de etídeo (EtBr) por aproximadamente 15 minutos e em seguida as imagens foram capturadas em sistema de vídeo-documentação ImageMasterVDS® (Amersham Pharmacia Biotech, EUA). A interpretação da eletroforese foi feita da seguinte forma: a presença de uma banda de 450pb (MY09/11) e/ou GP05/GP06 (140pb) caracteriza um indivíduo com o genótipo do HPV presente na amostra de biópsia fresca (Figura 01). Posteriormente, cada amostra foi submetida a PCR de genotipagem específica para os HPV's 06, 11, 16, 18, 33, 35, 45 e 58.

Análise estatística

A distribuição das características demográficas e a presença de HPV nas amostras cancerígenas examinadas utilizando o teste do χ^2 . Para genótipos, primeiramente, foram realizados o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg. As associações entre doenças e genótipos foram avaliadas através do cálculo de *Odds Ratio* (OR) e Intervalo de Confinça (IC) de 95%, adicionalmente, foi realizado o teste de Tendência de acordo com os intervalos de tempo. O *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

A média da idade observada para os pacientes com CEC da laringe foi de 58,1 (DP $\pm$ 10,3), próxima da média observada para o grupo controle de 56,6 (DP $\pm$ 9,6). De acordo com o resultado do teste de χ^2 (tabelas de contingência 2X3) os intervalos de idade entre os grupos caso e controle não apresentaram diferença estatística ($\chi^2=2,49$; $p= 0,28$), indicando que o pareamento por idade foi adequado. A frequência de homens e mulheres também foi homogeneamente distribuída entre os grupos de pacientes e controles, indicando que o pareamento por sexo foi adequado ($\chi^2=3,72$; $p= 0,20$) [Tabela 1].

As frequências alélicas do gene *TP53* para os alelos *Arg* e *Pro* foram de 63,5% e 36,5% para os pacientes com carcinomas laríngeos, e de 68,4% e 31,6% para o grupo controle, respectivamente. Pelo teste do χ^2 , a diferença alélica entre as populações não se mostrou significativa, tendo $p = 0,54$ ($\chi^2 = 0,56$; GL= 1 e IC= 95%). A distribuição das respectivas frequências encontra-se na Tabela 2. De acordo com o teste de Hardy-Weinberg observou-se que as populações não se encontram em equilíbrio para o códon 73 do gene *TP53*. Ao ser aplicado o teste de χ^2 , a hipótese de nulidade foi rejeitada, pois $p < 0,05$ ($p= 0,04$; $\chi^2 = 6,18$; GL = 2; IC = 95%). A distribuição das frequências genotípicas observadas e esperadas encontra-se na Tabela 2. A fim de verificar se a presença dos genótipos *Arg/Arg*, *Arg/Pro* e *Pro/Pro* possui

relação com o risco no desenvolvimento do câncer laríngeo, foi aplicado o teste *Odds Ratio* (Tabela 3). Os dados indicaram diferença estatisticamente significativa ($p=0.02$), quando foi comparado *Arg/Pro* entre grupos caso e controle, indicando que o risco de desenvolver câncer de laringe com a presença do genótipo *Arg/Pro* foi 2.7 vezes (IC= 1.21-5.82). Outra análise realizada foi a associação dos genótipos com as variáveis sexo, tabagismo e etilismo (Tabela 4). De acordo com o teste, o perfil genotípico não apresentou risco entre os pacientes com câncer da laringe, nem mesmo associados às variáveis sexo, etilismo e tabagismo.

Foi verificada a associação entre genótipo *Arg/Pro* e idade do paciente, no momento do diagnóstico. Adicionalmente, tal observação também foi associada ao risco do desenvolvimento do carcinoma laríngeo, utilizando o Teste de Tendência. Os resultados sugerem que houve relação entre o intervalo de tempo e o desenvolvimento do câncer de laringe nos pacientes estudados, comparando os genótipos *Arg/Pro* x *Pro/Pro*, com um aumento dos pacientes heterozigotos com idade < 69 anos. A distribuição das frequências genotípicas em relação à idade em intervalos de tempo e os respectivos valores de A e p podem ser observados na Tabela 5.

As amostras de DNA e biópsias frescas dos pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de laringe foram submetidas a pesquisa do genoma viral o papilomavírus humano (HPV). Foram identificadas duas amostras positivas (3%) para o HPV, sendo genotipados: uma amostra com o HPV 11, de baixo risco oncogênico para a região de cabeça e pescoço; e a outra amostra foram identificados os HPVs 16 e 45 de alto risco oncogênico, indicando uma co-infecção no paciente analisado. Os dois pacientes apresentaram polimorfismo de risco para o gene *TP53* (*Arg/Arg*).

Discussão

O presente estudo buscou analisar o polimorfismo genético de *TP53* códon 72 associado as variáveis sexo, idade e a infecção com o papilomavírus humano (HPV), comparando grupos caso e controle, de pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de laringe, pelo Serviço de Cabeça e Pescoço de um hospital de referência no diagnóstico e tratamento de câncer no Brasil Central, Hospital Araújo Jorge (Goiânia, GO, Brasil). Adicionalmente, vários trabalhos na literatura sugerem que fatores inerentes ao próprio indivíduo, incluindo os polimorfismos genéticos podem conferir diferenças individuais na ocorrência do câncer. Desde que Harris et al. (1986) caracterizaram o polimorfismo do códon 72 de *TP53*, vários trabalhos foram realizados na tentativa de associar este polimorfismo como um fator de suscetibilidade e também como um fator preditivo a diversos cânceres. Esta intensa busca foi ainda mais acentuada quando Thomas et al. (1999), verificaram diferenças

1 discrepantes na bioquímica e na biologia das isoformas *Arg* e *Pro*. A partir de então, as
2 pesquisas realizadas nesta área tem demonstrado resultados controversos.

3 O presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel do polimorfismo do códon 72
4 de *TP53* tanto na suscetibilidade quanto no prognóstico do câncer da laringe. Para isso,
5 primeiramente as variantes *Arg* e *Pro* foram genotipadas a partir de amostras de sangue
6 periférico de 63 pacientes com carcinomas espinocelulares da laringe e de 49 indivíduos
7 saudáveis, os quais foram selecionados aleatoriamente da população para constituir o grupo
8 controle. Com a genotipagem foi possível avaliar as frequências alélicas e genotípicas dos dois
9 grupos. As frequências alélicas de para *p53Arg* nos casos e controles foram de 63,5% e 68,4%,
10 enquanto que de *p53Pro* foram de 36,5% e 31,6%, respectivamente. Não houve diferença
11 estatisticamente significativa ($p=0,79$) nas frequências alélicas entre os dois grupos analisados,
12 sugerindo que não houve associação entre o polimorfismo do códon 72 de *TP53* com a
13 suscetibilidade ao câncer da laringe.

14 Por outro lado, aplicando o teste de Hardy-Weinberg observou-se que as populações
15 não se encontram em equilíbrio para o códon 73 do gene *TP53*, o que pode ser justificado pelo
16 tamanho limitado das amostras, no entanto, apresentou o genótipo *Arg/Pro* como o mais
17 prevalente no grupo caso, do que no grupo controle ($p= 0,04$). Estes dados corroboram com
18 Inserra et al. (2003) que também encontraram uma maior prevalência do alelo *p53Arg* e de seu
19 genótipo homozigoto em diferentes grupos étnicos da América como brancos não-espânicos,
20 mexicanos, afro-americanos, asio-americanos e americanos nativos. Adicionalmente, ao
21 observarmos uma possível associação dos genótipos *TP53* com o risco no desenvolvimento do
22 câncer laríngeo, o teste *Odds Ratio* indicou uma diferença estatisticamente significativa
23 ($p=0.02$), quando comparamos *Arg/Pro* entre grupos caso e controle, indicando que o risco de
24 desenvolver câncer de laringe com a presença do genótipo *Arg/Pro* foi 2.7 vezes (IC= 1.21-
25 5.82).

26 Por outro lado, não foi observada associação entre polimorfismo de *TP53* e o risco de
27 desenvolver CCE de laringe, para os hábitos tabagistas e etilistas. Nenhuma associação entre o
28 polimorfismo somado às variáveis sexo, tabagismo e etilismo foi estatisticamente comprovada
29 como risco de câncer laríngeo ($p>0,05$). No entanto, com a aplicação do teste de Tendência foi
30 observado que pacientes homozigotos *Pro/Pro* apresentaram um surgimento do câncer da
31 laringe mais tardiamente do que os pacientes homozigotos *Arg/Arg* e heterozigotos ($p= 0.04$).
32 Isso pode ser justificado pelo fato de que mutações no alelo *Arg* são comumente detectadas em
33 carcinomas de células escamosas (Sheel et al., 2016; Schneider-Stock et al., 2004; Bergamaschi
34 et al., 2003) e que em detrimento da perda ou inativação deste alelo confere um importante
35 passo na carcinogênese já que a variante *Arg* apresenta uma atividade apoptótica mais eficiente

do que *p53Pro*. Apesar da isoforma *Arg* possuir um melhor poder apoptótico conforme demonstrado por diversos estudos (Dumont et al., 2003; Bergamaschi et al., 2003; Thomas et al., 1999) o que poderia garantir ao paciente um melhor prognóstico da doença, no presente trabalho nenhuma conclusão a respeito foi evidenciada.

O fato da presença do alelo *Arg*, segundo Schneider-Stock *et al.* (2004) e Bergamaschi *et al.* (2003), implicar em uma maior eficiência no controle apoptótico, por outro lado, a inativação deste alelo e consequentemente, o seu gene, em pacientes diagnosticados com câncer, faz com estes indivíduos sejam mais suscetíveis a infecção e a promoção viral do HPV observados em CCEs. Neste contexto, os dois pacientes que tiveram o HPV identificado e genotipado no presente estudo, possuem o genótipo *Arg/Arg*. Tal ocorrência corrobora diversos estudos que associam mutações no gene *TP53* e a suscetibilidade a presença do HPV (Schneider-Stock et al., 2004; Donehower, 2005).

O aumento recente da prevalência de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) entre os pacientes jovens tem sido atribuída à crescente prevalência de HPV infecção, especialmente da orofaringe, e é colocada a hipótese de refletir a mudança de comportamentos sexuais, sobretudo o aumento da prática de sexo oral, sem o uso de preservativo, nas últimas décadas (D'Souza et al., 2007; Hocking et al., 2011). A prevalência do HPV em CCECP apresentaram prevalência de 10% a 90%, dependendo do local do tumor (Antonsson et al., 2015). Os autores observaram ainda que a frequência média da presença do DNA viral em CCECP foi de 20%, com diferenças substanciais entre as regiões anatômicas. Como esperado, observou-se a prevalência de HPV mais elevado em CCE de orofaringe e menor na laringe. A prevalência do HPV em estudos CCECP anteriores variaram de 20% a 90%, dependendo da região geográfica e local do tumor (Hong et al., 2010; Nasman et al., 2009; Gillison et al., 2008; Pintos et al., 2008; Anaya-Saavedra et al., 2008; Mork et al., 2001). Hansson et al. (2008) e Nasman et al. (2009) observaram que a prevalência de HPV foi mais elevada em CCE de orofaringe, especialmente em tonsilas de pacientes jovens, não-fumantes.

Os tipos de HPV de alto risco também foram encontrados em CCEs de assoalho da boca e da língua (prevalência de HPV 20-30%), mas geralmente são menos prevalente do que em tumores de orofaringe e amígdalas (50-90%) (Nasman et al., 2008). A prevalência do HPV de tumores CCECP tem sido relatada a ser mais baixa (10-20%) no Canadá e de um estudo sueco (Mork et al., 2001; Pintos et al., 2008), e mais elevada (<50%) foi relatada nos Estados Unidos e na América do Sul (D'Souza et al., 2007; Gillison et al., 2008; Anaya-Saavedra et al., 2008).

Inúmeras evidências de que os pacientes com CEC apresentam, preferencialmente, na perda de heterozigose, a deleção do alelo *Pro* e que o alelo *Arg* e associação a uma redução significativa na taxa de morte de oncócitos por apoptose. Porém em outros estudos que

objetivaram avaliar a longevidade individual associada ao polimorfismo do gene *p53* no códon 72, concluíram que as pessoas com genótipo homozigoto para *Pro* apresentaram uma sobrevida relativa cerca de 1,4 vezes maior do que os genótipo homozigotos para *Arg*. Assim, sugere-se que o genótipo *Pro/Pro* confere benefícios significativos para a sobrevida de pacientes com câncer (Schneider-Stock et al., 2004; Donehower, 2005). Outro estudo, avaliando 9.219 participantes para o polimorfismo de *TP53*, concluiu que os indivíduos homozigotos para *Pro* tem um aumento médio de 3 anos na sobrevida, quando comparados com os homozigotos para a *Arg* (Orsted et al., 2007).

Em conclusão, o estudo do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* revelou que indivíduos *Pro/Pro* desenvolveram câncer da laringe mais tardiamente do que os pacientes *Arg/Arg* e *Arg/Pro*. Adicionalmente, comparando os grupos caso e controle, foi observado um risco maior de desenvolver câncer de laringe com a presença do genótipo *Arg/Pro* de 2.7 vezes. A frequência do genoma do HPV foi de 3% das amostras analisadas (HPV11 e 16/45), todos para indivíduos *Arg/Arg*. Pode-se inferir que o estudo do polimorfismo de *TP53* corroboram com dados publicados na literatura pertinente, que correlacionam a suscetibilidade aumentada para CCE em indivíduos homozigotos para *Arg/Arg* e a maior susceptibilidade destes a carcinogênese vírus-induzida. Alterações adicionais em regiões previamente estudadas e a investigação de outros fatores associados aos carcinomas laríngeos poderão vir a ser ferramentas importantes na estimativa do prognóstico da progressão tumoral e, consequentemente, na melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

Referências

1. Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, Garcia-Cuellar CM, Guido-Jimenez M, Mendez-Martinez R, et al. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. Arch Med Res 2008;39:189-97.
2. Antonsson A, Neale RE, Boros S, Lampe G, Coman WB, Pryor DI, Porceddu SV, Whiteman DC. Human papillomavirus status and p16INK4A expression in patients with mucosal squamous cell carcinoma of the head and neck in Queensland, Australia. Cancer Epidemiol. 2015;39(2):174-81.
3. Audi EA, Pussi FD. Isoenzimas do CYP450 e biotransformação de drogas. Acta Scientiarum. 2000;22(2):599-604.
4. Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiant G, Yulug I, Merlano M, Numico G, Comino A, et al. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. Cancer Cell 2003;3:387-402.
5. Bergamaschi, E; Brustolin, A; DePalma, G. Biomarkers of dose and susceptibility in cyclits exposed to monoaromatic hydrocarbons. Toxicol. Lett. 1999; 108: 241-247.
6. Bray F, Jemal A, Forman D et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. The Lancet Oncology 2012; 13(8): 790-801.
7. Chaturvedi AK. Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. Head Neck Pathol. 2012;6 Suppl 1:S16-24.
8. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. Curr Opin Oncol. 2009; 21(3):194-200.
9. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. N Eng J Med. 2007;356(19):1944-56.

10. Donehower LA. p53: guardian and suppressor of longevity? *Experimental Gerontology* 2005;40(1-2):11-5.
11. Faridi, R. et al. Oncogenic potencial of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology Journal* 2011;8:243.
12. Feller, L. et al. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV- associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: Human papillomavirus-mediated carcinogenesis. *Head & Face Medicine* 2010; 6(14).
13. Galli P, Cadoni G, Volante M, De Feo E, Amore R, Giorgio A, Arzani D, Paludetti G, Ricciardi G, Boccia S. A case-control study on the combined effects of p53 and p73 polymorphisms on head and neck cancer risk in an Italian population. *BMC Cancer* 2009;9:137.
14. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:407–20.
15. Gleich LL, Salamon FN. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer control* 2002;9(5):369-78.
16. Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, et al. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case–control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol* 2005;125:1337–44.
17. Harris N, Brill E, Shohat O et al. Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. *Mol Cell. Biol.* 1986;6(12):4650-4656.
18. Hocking JS, Stein A, Conway EL, Regan D, Grulich A, Law M, et al. Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. *Br J Cancer* 2011;104:886–91.
19. Hong AM, Dobbins TA, Lee CS, Jones D, Fei J, Clark JR, et al. Use of cyclin D1 in conjunction with human papillomavirus status to predict outcome in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer* 2011;128:1532–45.
22. Inserra P. et al. Ethnic variation of the P53 codon 72 polymorphism, HPV persistence, and cervical cancer risk. *Int J STD AIDS*, London 2003;14(12):800-804.
23. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Vol 100E—Tobacco Smoking [monograph on the Internet]. Lyon: IARC; 2012.
24. Karlsen, F; Kalantari, M; Jenkins, A; Pettersen, E; Kristensen, G; Holm, R; Johansson, B; Hagmar, B. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of Human Papillomavirus. *J. Clinical. Microbiol.* 1996; 34(9): 2095-2100.
25. Liang C, Marsit CJ, Houseman EA, Butler R, Nelson HH, McClean MD, et al. Gene-environment interactions of novel variants associated with head and neck cancer. *Head Neck.* 2012;34(8):1111-8.
26. Ministério da Saúde. Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tipos de Câncer: Laringe. Rio de Janeiro: INCA, 2012.
27. Ministério da Saúde. Brasil. Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.
28. Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001;344:1125–31.
29. Nair, S & Pillai, MR. Human Papilloma Virus, Cellular Genetics and Susceptibility to Cervical Cancer. *Int. J. Hum. Genet.* 2005;5(1):11-17.
30. Nasman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma. *Int J Cancer* 2009;125:362–6.
31. Orsted DD, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity cancer survival, and risk of cancer in the general population. *The Journal of Experimental Medicine* 2007;204(6):1295-301.
32. Partridge M, Costea DE, Huang X. The changing face of p53 in head and neck cancer. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 2007;36:1123-38.

33. Pickering CR, Zhang J, Yoo SY, et al. Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. *Cancer discovery*. 2013;3(7):10.1158/2159-8290.
34. Pinto FR, Matos LL, Gumz Segundo W, Vanni CM, Rosa DS, Kanda JL. Tobacco and alcohol use after head and neck cancer treatment: influence of the type of oncological treatment employed. *Rev Assoc Med Bras*. 2011;57(2):171-6.
35. Pintos J, Black MJ, Sadeghi N, Ghadirian P, Zeitouni AG, Viscidi RP, et al. Human papillomavirus infection and oral cancer: a case-control study in Montreal, Canada. *Oral Oncol* 2008;44:242-50.
36. Ragin, CCR. et al. The Epidemiology and Risk Factors of Head and Neck Cancer: a Focus on Human Papillomavirus. *Dent Rest J*. 2006;86(2).
37. Scheel A, Bellile E, McHugh JB, Walline HM, Prince ME, Urba S, Wolf GT, Eisbruch A, Worden F, Carey TE, Bradford C. Classification of TP53 mutations and HPV predict survival in advanced larynx cancer. *Laryngoscope*. 2016 Sep;126(9):E292-9.
38. Schneider-Stock R, Mawrin C, Motsch C, Boltze C, Peters B, Hartig R, Buhtz P, Giers A, Rohrbeck A, Freigang B, Roessner A. Retention of the arginine allele in codon 72 of the p53 gene correlates with poor apoptosis in head and neck cancer. *American Journal of Pathology* 2004;164(4):1233-41.
39. Sourvinos G, Rizos E, Spandidos DA. p53 codon 72 polymorphism is linked to the development and not the progression of benign and malignant laryngeal tumours. *Oral Oncol*. 2001;37:572-578.
40. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005;32 Suppl 1:S59-66.
41. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol*. 1999;19:1092-100.
42. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature* 2008;7:979-87.
43. Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(2):95-107.
44. Zhou G, Liu Z and Myers JN. TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *J. Cell. Biochem*. doi:10.1002/jcb.25592.

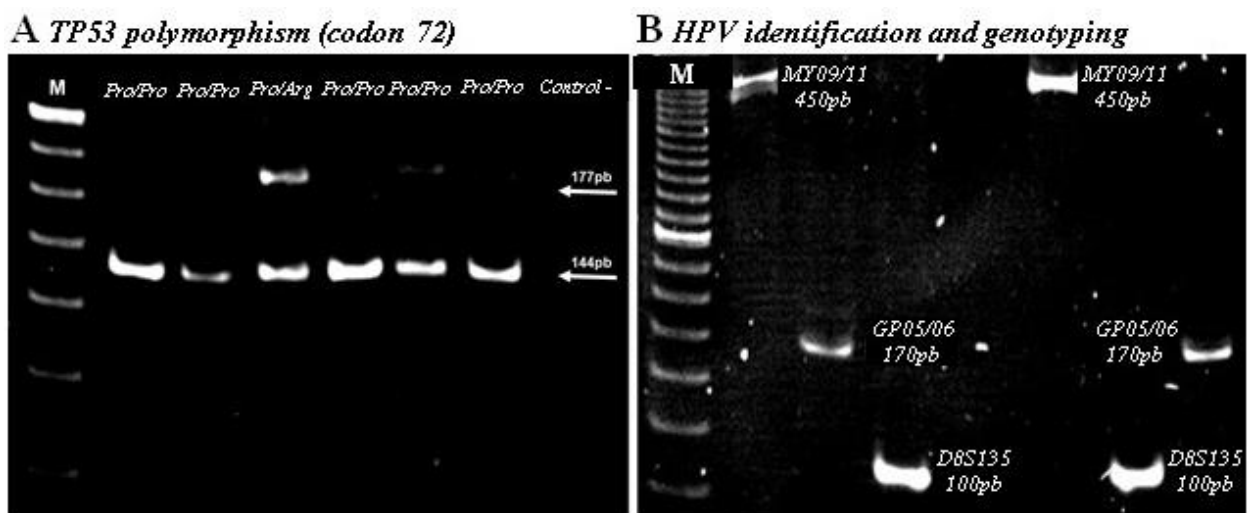


Figure 1. The PCR analyses result of TP53 polymorphism (A) and HPV identification and genotyping (B). A. TP53 polymorphism, the Arg allele had a single band with a fragment of 177 bp. The Pro allele had a single band with a fragment of 144 bp. The heterozygote had two bands. C-: control negative. M: ladder pGem. B. The band with fragment of 450 pb (MY09/11) or 170 pb (GP05/06) indicates the presence of HPV. The band with fragment of 100 pb (D8S135) indicates the presence of endogenous human DNA in the sample.

Table 1. Demographic characteristics of larynx cancer cases and controls

Characteristics	Cases (<i>n</i> = 63) <i>n</i> (%)	Controls (<i>n</i> = 49) <i>n</i> (%)	χ^2	<i>P</i> value
Age (y)				
< 40	2 (3.2)	1 (2.0)		
40 – 60	33 (52.4)	31 (63.3)	2.49	0.28
> 60	28 (44.4)	17 (34.7)		
Sex				
Female	15 (23.8)	7 (14.3)		
Male	48 (76.2)	42 (85.7)	2.92	0.12

Table 2. *TP53* allelic and genotypic frequency of larynx cancer cases and controls

Frequency	Cases (<i>n</i> = 63) %	Controls (<i>n</i> = 49) %	χ^2	<i>P</i> value
Allele				
<i>Arg</i>	63.5	68.4	0.16	0.79
<i>Pro</i>	36.5	31.6		
Genotype				
<i>Arg/Arg</i>	23.0	26.0		
<i>Arg/Pro</i>	34.0	15.0	6.18	0.04*
<i>Pro/Pro</i>	6.0	8.0		

* *P* = 0.04 distribution of genotypic frequency between the cases and controls were statistical difference

Table 3. *TP53* genotype frequency based OR in larynx cancer cases and controls

Genotype	Cases		Controls		OR ^a (95% CI)	<i>P</i> value
	GR*	GNR*	GR	GNR		
<i>Arg/Pro</i>	34	29	15	34	2.70(1.21-5.82)	0.02 ^b
<i>Pro/Pro</i>	6	57	8	41	0.50(1.17-1.67)	0.43
(<i>Arg/Arg</i> + <i>Pro/Pro</i>)	40	23	23	26	2.00(0.92-4.20)	0.12

* GR = genotype risk; GNR = genotype no risk.

^a OR, adjusted *odds ratio*; 95% CI (confidence interval).

^b *P* = 0.02 the risk of developing laryngeal cancer with the presence of the *Arg/Pro* genotype was 2.7 times (CI = 1.21-5.82).

Table 4. *TP53* genotypic frequency adjusting for sex, cigarette smokers and alcohol drinkers based OR in larynx cancer cases and controls

Characteristics	Genotype	OR ^a (95% CI)	<i>P</i> value
Male			
	<i>Arg/Arg</i> x <i>Arg/Pro</i>	0.44(0.18-1.08)	0,11
	<i>Arg/Arg</i> x <i>Pro/Pro</i>	0.78(0.20-3.13)	0,99
	<i>Arg/Pro</i> x <i>Pro/Pro</i>	1.79(0.44-7.25)	0,65
Female			
	<i>Arg/Arg</i> x <i>Arg/Pro</i>	0.19(NR)	0.41
	<i>Arg/Arg</i> x <i>Pro/Pro</i>	5.00(NR)	0.54
	<i>Arg/Pro</i> x <i>Pro/Pro</i>	27.00(NR)	0.07
Cigarette smokers			
	<i>Arg/Arg</i> x <i>Arg/Pro</i>	1.37(NR)	0.72
	<i>Arg/Arg</i> x <i>Pro/Pro</i>	4.40(NR)	0.87
	<i>Arg/Pro</i> x <i>Pro/Pro</i>	3.20(0.29-42.20)	0.93
Alcohol drinkers			
	<i>Arg/Arg</i> x <i>Arg/Pro</i>	0.91(0.31-2.65)	0.91
	<i>Arg/Arg</i> x <i>Pro/Pro</i>	0.65(0.09-4.30)	0.93
	<i>Arg/Pro</i> x <i>Pro/Pro</i>	0.71(0.12-4.45)	0.93

* NR: not rated.

^a OR, adjusted *odds ratio*; 95% CI (confidence interval)

Table 5. Genotypic frequencies of *TP53* distributed in relation to age at time intervals

Genotype	Age (y)			A*	X ²	P value
	30 - 49	50 - 69	70 - 89			
<i>Arg/Arg x Arg/Pro</i>	5	14	4	2.29	0.98	0.32
	10	21	3			
<i>Arg/Arg x Pro/Pro</i>	5	14	4	-1.79	1.51	0.22
	1	2	3			
<i>Arg/Pro x Pro/Pro</i>	10	21	3	-2.75	3.62	0.04 ^a
	1	2	3			

*area of coverage of the tendency test

^a was relation between the time and the development of laryngeal cancer comparing the *Arg/Pro x Pro/Pro* genotypes with an increase in heterozygous patients aged <69 years

Artigo 03 – Submetido à *Clinics – USP*, Medicina 1: Qualis B2, Fator de Impacto (2015): 0.93.

Epidemiological analisys of patients with SCC of the larynx in a reference hospital in the treatment of cancer in Goiás State, Brazil

Paulo Marcelo de Farias Vasconcelos,¹ Cláudio Carlos da Silva,^{1,2} Aparecido Divino da Cruz^{1,2} * and Maria Paula Curado³

* contato: acruz@pucgoias.edu.br

a) Núcleo de Pesquisas Replicon
Department of Biology
Pontifical Catholic University of Goiás
40, 235 Street, Area 4, Block L
Universitário, Goiânia, GO, Brazil
ZIP 74605-050
Phone: +55 62 3946 1385

b) Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene)
Laboratório Central Dr Giovanni Cysneiros (LACEN)
Secretaria de Estado da Saúde de Goiás
40, 235 Street, Area 4, Block L
Universitário, Goiânia, GO, Brazil
ZIP 74605-050
Phone: +55 62 3946 1385

c) Centro Internacional de Pesquisa
A.C. Camargo Cancer Center
204, Pirapitingui Street
Liberdade, São Paulo, SP, Brazil
ZIP 01508-010
Phone: +55 11 2189 5000

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCE) da laringe apresenta-se como uma doença multifatorial e epigenética sendo influenciada por fatores ambientais, comportamentais e inerentes ao indivíduo. O objetivo deste estudo foi avaliar os dados epidemiológicos de pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular da laringe do Hospital Araújo Jorge, Hospital de Referência no diagnóstico e tratamento de câncer no Brasil Central. Foram analisados os dados de 63 prontuários acompanhados num período de 6 anos. O CCE da laringe acomete 3,5 vezes mais os homens, do que as mulheres. Essa relação tende a diminuir, com o passar dos anos devido provavelmente, ao aumento do número de mulheres que apresentam os hábitos tabagista e etilista. Os pacientes com hábitos tabagista e etilista crônicos e concomitantes apresentam uma sobrevida consideravelmente menor, quando comparados aos pacientes que não apresentam tais hábitos em um intervalo de 6 anos. Adicionalmente, a sobrevida geral da laringe foi de aproximadamente 66% em seis anos. Tal observação está diretamente relacionada aos hábitos tabagistas e etilistas concomitantes, reforçando a participação desses fatores na iniciação e progressão do CCE de laringe.

1 INTRODUÇÃO

2 Estudos epidemiológicos demonstram que o câncer constitui um problema de saúde
3 pública mundial, sendo a segunda causa de óbito mais frequente na população adulta, atrás
4 apenas dos distúrbios cardiovasculares, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA). O
5 termo câncer contempla um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento
6 desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras
7 regiões do corpo (Silva, 2003; INCA, 2006). Os tumores de cabeça e pescoço pela
8 expressividade, incidência, morbidade, mortalidade e alta letalidade, representam um relevante
9 problema de saúde pública mundial, particularmente nos países em desenvolvimento, como o
10 Brasil. O conjunto de tumores da cavidade oral, faringe e laringe representam cerca de 90% de
11 todos as neoplasias que envolve a região anatômica de cabeça e pescoço. Os cânceres da
12 cavidade oral e da faringe contribuem com 11% dos casos novos de câncer no mundo, com
13 cerca de 330.000 casos estimados por ano entre os homens e 250.000 entre as mulheres (Curado
14 & Hashibe, 2009).

15 Os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) é o sexto tipo mais
16 comum de câncer com uma estimativa de 575.000 novos casos diagnosticados anualmente
17 (Ferlay et al. 2012; Parkin et al. 2005). As regiões de cabeça e pescoço incluem da cavidade
18 oral, orofaringe, laringe e hipofaringe (Kamangar et al., 2006). A incidência de carcinoma
19 epidermóide, particularmente da orofaringe, aumentou recentemente em pacientes mais jovens,
20 e muitos desses pacientes não relatam uma história de exposição aos fatores de risco clássicos
21 do tabagismo e consumo excessivo de álcool (Leemans et al., 2011). Anualmente 650.000 novos
22 casos de tumores de cabeça e pescoço são diagnosticados e registrados, sendo que cerca de
23 350.000 evoluem para óbito. Estas neoplasias que se originam na cavidade oral, faringe e
24 laringe tem, segundo o INCA e por determinação anatomo-topográfica, atribuição ao trato
25 aerodigestivo superior, representando a quinta maior frequência de câncer entre os homens e a
26 sétima entre as mulheres. O tratamento desta doença promove mudanças importantes que
27 reduzem a qualidade de vida dos indivíduos afetados, suas atividades diárias, e em muitos casos,
28 com consequências severas, podendo chegar ao óbito (Galbiatti et al., 2013).

29 O carcinoma da laringe é responsável por uma incidência, aproximadamente, de
30 170.000 novos casos e de 85.000 mortes por ano no mundo, ocorrendo predominantemente no
31 sexo masculino, que representa cerca de 2% de todos os casos de câncer e 2,2% dos óbitos por
32 câncer (INCA, 2012). Apesar dos constantes progressos na detecção das causas da etiologia,
33 patogênese e no prognóstico dos carcinomas da laringe, o tema ainda necessita de elucidação.
34 Neste cenário, os estudos epidemiológicos e genético-moleculares que investigam mutações
35 associadas aos genes correlacionados à iniciação e progressão dos CCECP, inclusive os

1 laríngenos, consistem em importantes ferramentas para a compreensão dos mecanismos
2 carcinogênicos subjacentes ao desenvolvimento tumoral (INCA, 2014).

3 Em países emergentes, como o Brasil, o CCECP é um problema de saúde pública,
4 responsável por 13% das causas de óbitos para todos os tipos de câncer. A incidência e
5 mortalidade do CCECP deve ser realizada de acordo com os sítios anatômicos. Os padrões de
6 incidência do câncer espelham, muitas vezes, a distribuição geográfica dos fatores de risco
7 específicos. O estudo da quantificação do efeito dos diferentes potenciais fatores de risco é
8 oportuno, sendo fundamental o estudo de outros fatores relacionados aos hábitos de vida
9 (Curado, 2000; INCA, 2014). A laringe em sua fisiologia, é o órgão responsável pela geração da
10 voz, pela proteção das vias aéreas inferiores contra substâncias estranhas, facilitando a tosse,
11 mecanismo de expulsão do corpo estranho e no auxílio da deglutição dos alimentos. As
12 patologias que acometem este órgão causam distúrbios fisiológicos, que incorrem em impacto
13 na qualidade de vida do indivíduo (da Silva, 2003).

14 Os pacientes que apresentam câncer laríngeo descrevem os sintomas de odinofagia e
15 rouquidão prolongada, o que sugere tumores na região glótica e subglótica. O câncer
16 supraglótico está, muitas vezes, acompanhado por sinais e sintomas como, alteração na
17 qualidade da voz, disfagia leve, sensação de um caroço na garganta e linfadenopatias. Em
18 situações avançadas, além da rouquidão, podem ocorrer dores na garganta, intensa disfagia e
19 dispnéia (INCA, 2012). O tamanho e a localização do tumor são os parâmetros mais bem
20 observados para o carcinoma da laringe. O tempo que marca o início dos sintomas e a presença
21 de nódulo cervical são os principais fatores que definem o diagnóstico clínico das neoplasias da
22 laringe (Kowalski et al., 2000). O exame loco-regional, dá-se através de exames
23 complementares, como exemplos podemos citar a laringoscopia indireta, a rinoscopia anterior e
24 posterior. Para uma confirmação diagnóstica, a laringoscopia direta com biópsia deve ser
25 realizada quando o exame indireto não permite uma melhor elucidação clínica (Kowalski et al.,
26 2000).

27 O desenvolvimento do CCECP é resultante de múltiplas etapas que envolvem o
28 acúmulo de alterações genéticas moduladas por predisposição e/ou fatores ambientais (tabaco,
29 álcool, inflamação crônica, infecções virais, entre outros), além de mudanças no sistema
30 imunológico, indução de vascularização (incluindo angiogênese) e disseminação das células
31 tumorais (invasão tumoral local e metástases à distância) (Tsantoulis et al., 2007, INCA 2012;
32 França et al., 2012). Estudos indicam que a patogênese do tem origem e progresso clínico
33 distintos e demonstram que nos carcinomas de laringe parece apresentar dois comportamentos
34 biológicos diferentes desse tipo de neoplasia: uma relacionada a fatores como álcool e tabaco, e
35 outra relacionada ao papilomavírus humano. Além desses, pode-se dizer que características

1 genéticas individuais talvez sejam os principais fatores na determinação do efeito de uma
2 substância ou agente agressor como responsável por uma neoplasia maligna (Audi et al., 2000;
3 Syrjänen, 2005; Liang et al., 2012). Atualmente, são utilizadas diferentes modalidades de
4 tratamento para o câncer da laringe: radioterapia, cirurgia e quimioterapia (INCA, 2014).
5 Diversas técnicas cirúrgicas atuais, como a cirurgia robótica, que reduzem a taxa de
6 traqueostomia e permitem recuperação mais rápida da função de deglutição oral e internações
7 mais curtas surgiram nos últimos anos. A mortalidade e morbidade associadas à doença maligna
8 permanecem elevadas, causando impacto sobre a qualidade de vida e o custo de tratamento dos
9 pacientes (Dasgupta et al., 2012; Hans et al., 2012).

10 A sobrevida em 5 anos desses pacientes é de cerca de 50%, permanecendo dessa forma
11 pelos últimos 50 anos. Devido a isso, o conhecimento sobre a epidemiologia, fatores de risco,
12 diagnóstico e tratamento é cada vez mais importante em sua detecção e encaminhamento
13 precoce (Carvalho et al., 2004; Chin et al, 2004; Parkin et al., 2005; Haddad et al, 2008). O
14 objetivo do presente estudo foi de avaliar as características epidemiológicas, aspectos sócio-
15 comportamentais e a suscetibilidade dos pacientes do Carcinoma de Células Escamosas (CCE)
16 de Laringe, em pacientes de um hospital oncológico referência no Centro-Oeste brasileiro.

17 **PACIENTES E MÉTODOS**

18 O presente estudo corresponde a um estudo retrospectivo de pacientes diagnosticados
19 com câncer de células escamosas da laringe, entre janeiro de 1998 a dezembro de 2008, oriundos
20 do Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP) do Hospital Araújo Jorge (HAJ) da
21 Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG) localizado na cidade de Goiânia (GO),
22 serviço de referência no diagnóstico e tratamento de câncer da região Central e Norte do Brasil.
23 Durante este período, 63 pacientes foram selecionados para o grupo caso. No HAJ foram
24 selecionados os casos de câncer primário da laringe por ocasião do diagnóstico, anteriormente
25 ao início do tratamento.

26 Todos pacientes aceitaram participar do estudo que receberam informações sobre os
27 objetivos deste estudo e assinaram o termo de consentimento pós-informação e responderam
28 individualmente um questionário, previamente aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa
29 envolvendo seres humanos do Hospital Araújo Jorge/ACCG, com respeito à história individual
30 de exposição a fatores ocupacionais, ambientais e hábitos de vida. Todos os indivíduos foram
31 previamente selecionados sob a condição de não terem sido submetidos à radioterapia ou
32 quimioterapia. No caso dos pacientes, também foram excluídos aqueles cujo laudo
33 histopatológico de câncer de laringe (CID-O: C32). Os prontuários dos 63 pacientes foram
34 analisados referentes às variáveis: sexo, idade, etnia, profissão, data do diagnóstico, hábitos
35

1 tabagista e etilista, estágio da doença, CID-O, tratamento (radioterapia, quimioterapia e cirurgia)
2 e número de óbitos. Foram consultados a fim de obter os dados para avaliação genético-
3 epidemiológica dos pacientes estudados, na busca de associação entre os fatores sócio-
4 ambientais e dados clínicos. O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Citogenética
5 Humana e Genética Molecular (LaGene), do Laboratório Central Dr Giovanni Cysneiros
6 (LACEN), da Secretaria de Estado da Saúde (SES) do Governo do Estado de Goiás e conjunto
7 com o Núcleo de Pesquisas Replicon, do Departamento de Biologia, da Pontifícia Universidade
8 Católica de Goiás (PUC), ambos localizados na cidade de Goiânia (GO) Brasil Central.

9 10 **Análise Estatística**

11 Os dados sócio-demográficos e epidemiológicos dos pacientes diagnosticados com CCE
12 de laringe, foram tabulados em planilhas do *software* Excel[®] (2013). A sobrevida também foi
13 calculada de acordo com os genótipos dos pacientes, para isso foi utilizado o método da Tábua
14 de Vida Atuarial e posteriormente o teste de *logrank* utilizando o *software* *GrahPad Prism*[®]
15 (Versão 4.0).

16 17 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

18 As frequências quanto aos dados sócio-ambientais e clínicos encontram-se distribuídos
19 na Tabela 1. Foram analisados 63 prontuários, dos quais 77,8% (49/63) são pacientes do sexo
20 masculino e 22,8% (14/63) do sexo feminino. O presente estudo sugere que em Goiânia, de
21 acordo com os pacientes analisados, o CEC de laringe é 3,5 vezes mais frequente em homens,
22 menor do que encontrado por Silva (2003), na mesma cidade. Os dados sugerem que esta
23 relação tende a diminuir devido, provavelmente ao aumento do número de mulheres que
24 apresentam os hábitos tabagista e etilista, visto que estes são os fatores de risco mais fortemente
25 associados aos tumores de laringe (Silva, 2003; Kim *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2002).

26 A média de idade observada no presente estudo foi de 58,1 (DP ± 10.3). A faixa etária de
27 41 a 60 anos apresentou o maior número de pacientes. De acordo com os dados encontrados,
28 52,4% (33/63) pacientes encontram-se na 4^a e 5^a década de vida, sendo que 44,4% (33/63)
29 possuem mais de 60 anos de idade. Foi observada uma sobrevida menor em pacientes
30 diagnosticados ≥ 60 anos de idade, quando comparada a pacientes que apresentavam idade < 60
31 anos, na data do diagnóstico ($p=0,04$). Silva (2003) em sua análise epidemiológica observou que
32 45.1% dos pacientes também se encontravam na faixa etária entre 41 e 60 anos. Segundo o
33 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a população brasileira pode ser dividida,
34 para fins de estudos demográficos em branco, negro, pardo, amarelo e indígena (Caetano, 2004).

1 A população estudada apresentou 62,3% (38/63) pacientes pertencentes ao grupo pardo, 31,1%
2 (19/63) brancos e 6,6% (4/63) negros.

3 A atividade ocupacional foi dividida em três grupos: atividade 1ª (agricultura), atividade
4 2ª (indústria) e atividade 3ª (prestação de serviços). Os dados demonstram que 65,0% (41/63)
5 dos pacientes trabalham no setor 3º, 30,2% (19/63) no setor 1º, sendo 89,5% (17/19) destes
6 lavradores e apenas 4,8% (3/63) dos pacientes relataram trabalhar na indústria. O elevado
7 número de pacientes que atuam na prestação de serviços (setor 3º) pode estar relacionado aos
8 hábitos tabagista e etilista e ainda, exposição rotineira à poluição urbana. Outro fator de risco
9 deve-se ao hábito alimentar, pois consumo de carne vermelha e de alimentos gordurosos tem
10 sido associado a um aumento no risco de câncer neste órgão (Tavani et al., 2000). De acordo
11 com os dados específicos quanto a ocupação, a profissão mais prevalente é a de lavrador com
12 27% (17/63) dos pacientes, seguido de 12 pacientes (19,0%) do lar e 9,5% (6/63) referentes a
13 motoristas em geral, as demais ocupações abrangem 44,5% dos pacientes estudados.

14 Em relação aos hábitos tabagista e etilista, 93,7% (59/63) são fumantes e 58,7% (37/63)
15 são etilistas, sendo todos estes também tabagistas. Predominantemente, o tempo superior a 20
16 anos de exposição a esses dois fatores foi o mais observado entre os pacientes. Apenas 28,6
17 (18/63) pacientes relataram ter algum caso de neoplasia na família. O tempo médio entre a data
18 do diagnóstico e a data do tratamento foi de 7,6 meses, sendo que 51,1% (24/47) dos pacientes
19 apresentaram este intervalo de tempo menor que 6 meses e 48,9% (23/63) demais tiveram a data
20 do tratamento 6 meses após a data do diagnóstico. Tal dado é preocupante levando-se em
21 consideração que alguns casos apresentaram estadiamento elevado e tempo de diagnóstico
22 superior a 6 meses.

23 Em relação às frequências percentuais dos casos de laringe por topografia (CID-O),
24 42,8% (27/63) dos pacientes apresentaram a glote acometida, a supraglote estava envolvida em
25 25,4% (16/63) dos casos e apenas 3,2% (2/63) dos pacientes tinham a subglote como região
26 acometida. Silva (2003), em um trabalho realizado em pacientes diagnosticados com câncer de
27 laringe, no período de 1988 a 1998, relatou a presença da glote como topografia mais acometida
28 para o câncer de laringe com 31% dos casos, sendo que 49% dos seus pacientes apresentaram a
29 classificação C32.9 (Laringe SOE). O presente estudo encontrou apenas 18 (28,6%) pacientes
30 com esta classificação inferindo que o diagnóstico clínico e anatomopatológico se tornaram
31 mais precisos e específicos, quando comparado ao trabalho de Silva (2003), para o mesmo
32 serviço de patologia.

33 O sistema TNM também foi investigado no grupo de pacientes do presente estudo. A
34 divisão dos casos de câncer em grupos, de acordo com os chamados estádios, surgiu a partir do
35 momento em que as taxas de sobrevida eram maiores para os casos no qual a doença era

1 localizada quando comparada com casos que sofreram metástase (MS, 2004). O estágio I e IV
2 apresentou as maiores frequências percentuais, 32,3% (20/62) e 30,6% (19/62),
3 respectivamente. De 1988 a 1998, os estádios III e IV, com frequências de 25% e 18%,
4 respectivamente, foram os mais acometidos entre os casos de câncer de laringe (Silva, 2003),
5 tais dados sugerem que o diagnóstico para o câncer da laringe atualmente, são realizados em sua
6 maioria, na fase inicial da doença, no Estádio I. Quanto ao tratamento realizado nos pacientes
7 com câncer da laringe, a laringectomia foi o principal tratamento realizado em 71,4% (45/63)
8 dos casos, sendo 60% (27/45) a laringectomia total a cirurgia de escolha e 28,9% (13/45) a
9 laringectomia parcial. Todos os pacientes que sofreram a laringectomia total também foram
10 submetidos ao esvaziamento cervical.

11 A Figura 1 apresenta a distribuição das análises da sobrevida (A) geral, (B) sexo, (C)
12 idade, (D) consumo de cigarros e álcool, (E) estadiamento e (F) tipo de tratamento. A sobrevida
13 relativa geral dos 63 pacientes foi estimada em aproximadamente 65,9% num período de 6 anos,
14 com censura de 4,7%. Embora a taxa de sobrevida de 78,9% para o sexo feminino apresenta-se
15 moderadamente elevada em relação ao sexo masculino (61,4%), a diferença observada não foi
16 estatisticamente significativa ($p= 0,85$). A sobrevida relativa estimada para os pacientes de etnia
17 branca foi de 67,9%, sendo maior (81,9%) encontrada no grupo pardo. Ao final de 64 meses a
18 taxa de sobrevida relativa para os negros foi nula. Tal dado deve-se provavelmente, a baixa
19 frequência de negros no grupo estudado (6,3%).

20 A sobrevida relativa estimada para os pacientes que apresentavam os hábitos tabagista e
21 etilista simultâneos (63,5%) foi menor, comparado à sobrevida relativa dos pacientes que não
22 apresentavam tais hábitos (71,3%). As diferenças observadas nas taxas de sobrevida foram
23 estatisticamente significativas ($p= 0,01$). A sobrevida relativa encontrada para os Estádios I e II
24 foi de 71,6% e a dos Estádios III e IV foi de 60,2%. Mesmo com uma diferença entre as
25 sobrevidas, não foi observada relevância estatística significativa entre os Estádios ($p= 0,37$). A
26 sobrevida relativa estimada para os pacientes que foram tratados apenas por cirurgia foi de
27 68,2%, contra 75,1% dos pacientes que foram submetidos além da cirurgia, à quimioterapia e
28 radioterapia. As diferenças observadas nas taxas de sobrevida não foram estatisticamente
29 significativas ($p= 0,78$).

30 Nas últimas décadas, tem se verificado a progressiva ascensão das doenças crônico-
31 degenerativas, dentre elas, o câncer. Estimativas do INCA, para o biênio 2012/2013, foram 518
32 mil novos casos de câncer no Brasil (INCA, 2014). A expectativa de vida de cinco anos é
33 observada em cerca de 50% dos pacientes portadores de CCEs de laringe com metástases
34 linfonodais. Estudos demonstram que pacientes com doença avançada e resposta tumoral à
35 quimioterapia neoadjuvante têm satisfatória taxa de cura. Isto é importante no que se refere ao

1 emprego de uma terapêutica com menor nível de toxicidade (Kadlubar, 2001). Dessa forma, sua
2 prevenção consiste basicamente em programas e medidas de controle ao consumo de tabaco e
3 álcool, que, na verdade, visam à redução de diversas enfermidades. O diagnóstico precoce é o
4 meio mais eficaz de que se dispõe para melhorar o prognóstico do câncer e consequentemente
5 aumentar a taxa de sobrevida. Vale ressaltar, ainda, que, sendo diagnosticado tardiamente, o
6 tratamento provavelmente envolverá cirurgias agressivas (Sassi et al., 2010).

7 A cerca dessas considerações e de que um dos mais importantes objetivos de um
8 sistema de saúde é prover diagnóstico precoce e assistência oportuna a sua população, mais da
9 metade dos casos tem sido diagnosticada em estágios avançados, o que implica em pior
10 prognóstico e diminuição da taxa de sobrevida. Sugerem-se diversas situações que poderiam
11 levar a essa demora: profissionais que não sabem orientar corretamente pacientes; pacientes que
12 não procuram o profissional por medo do diagnóstico ou somente o procuram quando já sofrem
13 alguma restrição alimentar, de fala ou de convívio social (Honorato et al., 2009; Santos et al.,
14 2011). O TNM tem sido a classificação adotada para caracterizar os tumores, propor a terapia e
15 estimar a sobrevida dos pacientes. Contudo, nem mesmo o TNM é capaz de predizer o
16 comportamento biológico individual (Lourenço, 2007; Montoro et al. 2008).

17 Apesar dos recentes avanços no tratamento do CCE, esse ainda tem consequências
18 devastadoras e a sobrevida dos pacientes ainda é considerada pequena, resultado de
19 comorbidades e dos fatores sociais que impactam o sucesso do tratamento, incluindo a baixa
20 adesão, acesso restrito aos cuidados de saúde, e os recursos limitados do paciente (Rodriguez,
21 2010). A avaliação da sobrevida depende de fatores associados, não somente ligados a
22 características individuais, mas também verificados entre os estados brasileiros, reforçam a
23 necessidade de incluir a abordagem e a avaliação das disparidades desses territórios de
24 planejamento como possibilidade de incrementar as ações de saúde voltadas a esses pacientes e,
25 consequentemente, alcançar melhores resultados no cuidado prestado e, portanto, melhores
26 níveis dos indicadores de sobrevida.

27 Em conclusão, o CCE da laringe acometeu 3,5 vezes mais os homens, do que as
28 mulheres. Essa relação tende a diminuir, com o passar dos anos devido provavelmente, ao
29 aumento do número de mulheres que apresentam os hábitos tabagista e etilista. Os pacientes
30 com hábitos tabagista e etilista crônicos e concomitantes apresentam uma sobrevida
31 consideravelmente menor, quando comparados aos pacientes que não apresentam tais hábitos
32 em um intervalo de 6 anos. Adicionalmente, a sobrevida geral da laringe foi de
33 aproximadamente 66% em seis anos. Tal observação está diretamente relacionada aos hábitos
34 tabagistas e etilistas concomitantes, reforçando a participação desses fatores na iniciação e
35 progressão do CCE de laringe.

1 REFERÊNCIAS

1. Audi EA, Pussi FD. Isoenzimas do CYP450 e biotransformação de drogas. *Acta Scientiarum*. 2000;22(2):599-604.
2. Caetano A. A relação entre cor da pele/raça e esterilização no Brasil: Análise dos dados da Pesquisa Nacional sobre Demografia e Saúde. In: Monteiro S; Sansone L. (orgs). *Etnicidade na América Latina: um debate sobre raça, saúde e direitos reprodutivos*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2004;229-247.
3. Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head Neck* 2004;26(1):31-8.
4. Chin D, Boyle GM, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br J Plast Surg* 2004;57(7):595-602.
5. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol*. 2009;21(3):194-200.
6. Curado, MP. Variáveis prognósticas na sobrevida do paciente com câncer glótico inicial – estudo de 72 casos – Hospital Araújo Jorge, Goiânia [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo 2000.
7. Dasgupta S, Dash R, Das SK, Sarkar D, Fisher PB. Emerging strategies for the early detection and prevention of head and neck squamous cell cancer. *J Cell Physiol*. 2012;227(2):467-73.
8. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base
9. França, DCC. et al. Unusual Presentation of Oral Squamous Cell Carcinoma in a Young Woman. *SQU Med J*. 2007;12:13.
10. Galbiatti, A. et al. (2013). Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 79 (Março/Abril 2013).
11. Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Eng J Med*. 2008;359(11):1143-54.
12. Hans S, Badoual C, Gorphe P, Brasnu D. Transoral robotic surgery for head and neck carcinomas. *Eur Arch Otorhino- laryngol*. 2012;269(8):1979-84.
13. Honorato J, Camisasca DR, Dias FL, Faria PAS, Lourenço SQC. Análise de sobrevida global em pa- cientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de boca no ano de 1999. *Rev Bras Epidemiol* 2009; 12:69-81.
14. INCA/MS: Instituto Nacional do Câncer / Ministério da Saúde. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2006.
15. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tipos de Câncer: Laringe. Rio de Janeiro: INCA, 2012.
16. Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.
17. Kadlubar, FF. Concluding remarks: symposium on Genetic Susceptibility to Environmental Toxicants. *Mutation Research* 2001; 482:111-113.
18. Kamangar F, Doros GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006;24:2137–50.
19. Kim, KM; Kim, YM; Shim, YS, Kim, KH, Chang, HS, Choi, Jo. Epidemiologic survey of head and neck cancers in Korea. *Journal of Korean Medical Science* 2003;18:80-7.
20. Kowalski, LP; Miguel, REV; Ulbrich, FS. In: *A Atuação da Fonoaudiologia no Câncer de Cabeça e Pescoço*. São Paulo: Lovise 2000;97-04.
21. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;11:9–22.
22. Liang C, Marsit CJ, Houseman EA, Butler R, Nelson HH, McClean MD, et al. Gene-environment interactions of novel variants associated with head and neck cancer. *Head Neck*. 2012;34(8):1111-8.
23. Lourenço, SQC et al. Classificações Histopatológicas para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral: Revisão de Sistemas Propostos. *Rev. Bras. de Cancerol*. 2007;53(3):325-333.
24. Menezes AMB, Horta BL, Oliveira, ALB, Kaufmann RAC, Duquia R, Diniz A, Motta LH, Centeno MS, Estanislau G, Gomes L. Risco de câncer de pulmão, laringe e esôfago atribuível ao fumo. *Rev Saúde Pública* 2002;36(2):129-34.

25. Ministério da Saúde. 2004. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA. p254.
26. Montoro, JRM et al. Fatores prognósticos no carcinoma espinocelular de cavidade oral. Rev. Bras. Otorrinolaringol. 2008;74(6):861-866.
27. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA cancer J Clin. 2005; 55(2):74-108
28. Santos RA et al. Epidemiological evaluation of patients with câncer in the upper aerodigestive tract: relevance of alcohol and tobacco risk factors. Rev. bras. Cancerol. 2011;58(1).
29. Sassi LM, Dissenja JL, Simette RL, Stramandinoli RT, Pedruzzi PAG, Zanferrari FL, et al. Prevenção em câncer bucal: 20 anos de campanha antitabaco no Estado do Paraná, Brasil. Rev Bras Cir Cabeça Pescoço 2010; 39:184-6.
30. Silva, AMTC. Avaliação Epidemiológica do Câncer da Laringe na população de Goiânia no período de 1988 a 1998. Registro de Câncer de Base Populacional do Hospital Araújo Jorge – Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Goiânia [dissertação]. Goiás: Universidade Federal de Goiás; 2003.
31. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. J Clin Virol 2005;32 Suppl 1:S59-66.
32. Tavani A, La Vecchia G, Gallus S, Lagiou P, Trichopoulos D, Levi F, Negri E. Red meat intake and cancer risk: a study in Italy. International Journal of Cancer 2000. 86(3):425-8.
33. Tsantoulis PK et al. Advances in the biology of oral cancer. Oral Oncology 2007;43.

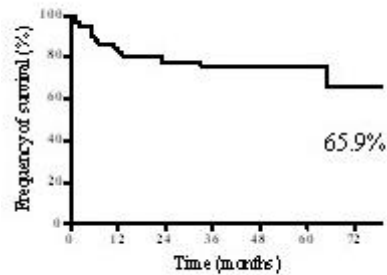
Table 1. Demographic, clinics and treatment characteristics of cancer of larynx in Central Brazil

Characteristics	Patients <i>n</i> (%)
<i>Age (y)</i>	(<i>n</i> = 63)
< 40	2 (3.2)
40 – 60	33 (52.4)
> 60	28 (44.4)
<i>Sex</i>	(<i>n</i> = 63)
Female	15 (23.8)
Male	48 (76.2)
<i>Skin color</i>	(<i>n</i> = 63)
Brown	39 (61.9)
White	20 (31.7)
Black	4 (6.3)
<i>Occupation</i>	(<i>n</i> = 63)
Primary	19 (30.2)
Secondary	3 (4.8)
Tertiary	41 (65.1)
<i>Cigarette smokers</i>	(<i>n</i> = 53)
< 20 years	2 (3.8)
≥ 20 years	51 (96.2)
<i>Alcohol drinkers</i>	(<i>n</i> = 17)
< 20 years	2 (11.8)
≥ 20 years	15 (88.2)
<i>Topography</i>	(<i>n</i> = 63)
glottis	27 (42.9)
supraglottis	16 (25.4)
subglottis	2 (3.2)
larynx NE*	18 (28.6)
<i>Cancer staging</i>	(<i>n</i> = 63)
I	20 (32.3)
II	11 (17.7)
III	12 (19.4)
IV	19 (30.6)

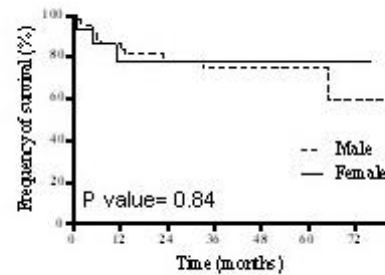
<i>Treatment</i>	(<i>n</i> = 86)
radiotherapy	34 (39.5)
chemotherapy	7 (8.1)
surgery	45 (52.3)

*nonspecific

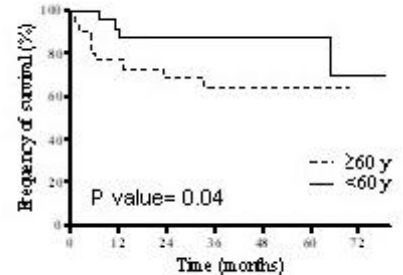
A General survival



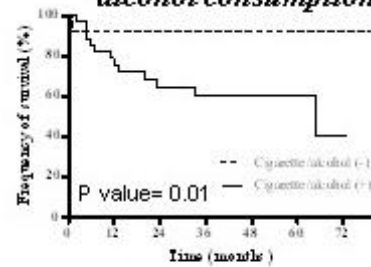
B Survival of sex



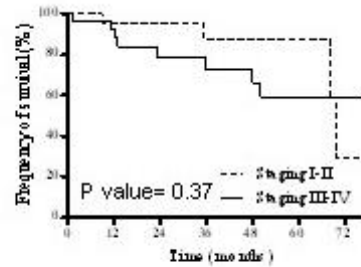
C Survival of age



D Survival of cigarette and alcohol consumption



E Survival of staging



F Survival type of treatment

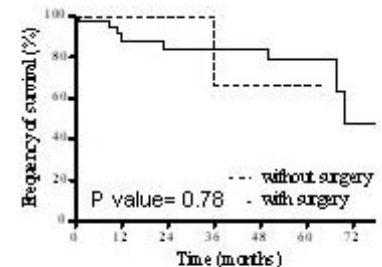


Figure 1. Distribution of survival analysis (A) General, (B) sex, (C) age, (D) consumption of cigarettes and alcohol, (E) and stage (F) type of treatment (with or without surgery).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O presente estudo não observou associação entre os genes de biometabolismo de xenobióticos (*CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1*) e a suscetibilidade de câncer de células escamosas (CCE) de laringe. Adicionalmente, o estudo do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* revelou que indivíduos *Pro/Pro* desenvolveram câncer da laringe mais tardiamente do que os pacientes *Arg/Arg* e *Arg/Pro*. Comparando os grupos caso e controle, foi observado um risco maior de desenvolver câncer de laringe com a presença do genótipo *Arg/Pro* de 2,7 vezes. A frequência do genoma do HPV foi de 3% das amostras analisadas (HPV11 e 16/45), todos para indivíduos *Arg/Arg*.

- O CCE de laringe, no presente estudo, acometeu 3,5 vezes mais homens, do que mulheres. Os pacientes com hábitos tabagista e etilista crônicos e concomitantes apresentam uma sobrevida consideravelmente menor, quando comparados aos pacientes que não apresentam tais hábitos em um intervalo de 6 anos. Adicionalmente, a sobrevida geral da laringe foi de aproximadamente 66% em seis anos. Tal observação está diretamente relacionada aos hábitos tabagistas e etilistas concomitantes, reforçando a participação desses fatores na iniciação e progressão do CCE de laringe.

- Alterações adicionais em regiões previamente estudadas e a investigação de outros fatores associados aos carcinomas laríngeos poderão vir a ser ferramentas importantes na estimativa do prognóstico da progressão tumoral e, conseqüentemente, na melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDO, E.M. ET AL. O fumo e o álcool na etiologia do câncer da cavidade bucal: revisão da literatura. R. CROMG, Belo Horizonte, v.7, n.2, p.108-112, 2001.
2. ABNET CC, QIAO Y-L, DAWSEY SM, DONG Z-W, TAYLOR PR, MARK SD. Tooth loss is associated with increased risk of total death and death from upper gastrointestinal cancer, heart disease, and stroke in a Chinese population-based cohort. Int J Epidemiol. 2005;34(2):467-74.
3. ACHUTTI, A & MENEZES, AMB. **Epidemiologia do tabagismo**. In: Guia Nacional de Prevenção e Tratamento do Tabagismo. Rio de Janeiro: Vitro Comunicação & Editora 2001. p.9-27.
4. ACS: American Cancer Society. Laryngeal & hipopharyngeal cancer. 2002. Acesso em: <http://www.cancer.org/>. 20/08/2016.
5. ANKATHIL, R; MATHEW, A; JOSEPH, F; NAIR, MK. Is oral cancer susceptibility inherited? Report of five oral cancer families. Eur. J. Cancer B. Oral. Oncol. 1996; 32b(1): 63-7.
6. APRIGLIANO, F & MELLO, L.F.P. Tratamento Cirúrgico do Câncer da Laringe - Análise de 1055 casos. São Paulo Arq. Int. Otorrinolaringol. vol. 10, n. 1, p. 36-45. 2006.
7. AUDI EA & PUSSI FD. Isoenzimas do CYP450 e biotransformação de drogas. Acta Scientiarum. vol. 22, n. 2, p. 599-604, 2000.
8. AUERBACH, C.; HAMMOND, E.C.; GARFINKEL, L. Histologic Changes in the Larynx in relation to smoking habits. Cancer. vol. 25, p. 92-104. 1970.
9. AUSTIN, DF & REYNOLDS P. Laryngeal Cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni JR: Cancer Epidemiology and Prevention, 2nd. New York: Oxford University Press 1996. págs. 619- 636.
10. AYESH R, IDLE JR, RITCHIE JC, CROTHERS MJ, HETZEL MR. Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer. Nature. 1984;312(5990):169-70.
11. BETIOL, T. et al. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. Braz J Med Biol Res. vol 46, 2013.
12. BISHT M & BIST SS. Human papilloma virus: a new risk factor in a subset of head and neck cancers. J Cancer Res Ther. 2011;7(3):251-5.
13. BOARD P., COGGAN M., JOHNSTON P., ROSS V., et al. Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases a complex of gene families. Pharmacology and Therapeutics, 1990; 48: 357-369.
14. BONDY M.L.; SPITZ M.R.; HALABI S.; FUEGER J.J.; SCHANTZ S.P.; SAMPLE D.; HSU T.C. 1993. Association between family history of cancer and mutagen sensitivity in upper aerodigestive tract cancer patients. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.

(2):103-06.

15. BRAY, F., The Lancet Oncology, Volume 13, Issue 8, Pages 790-801, August 2012. Disponível em <[http://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(12\)70211-5/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(12)70211-5/abstract)>. Acesso em 15 jun. 2016. doi:10.1016/S1470-2045(12)70211-5.
16. CANEVARI, RA & ROGATTO, SR. **Câncer de Cabeça e Pescoço**. In: Oncologia Molecular.
17. CANOVA C, HASHIBE M, SIMONATO L, NELIS M, METSPALU A, LAGIOU P, et al. Genetic associations of 115 polymorphisms with cancers of the upper aerodigestive tract across 10 European countries: the ARCAGE project. Cancer Res. vol. 69, n. 7, p. 2956-65, 2009.
18. CARVALHO AL, SINGH B, SPIRO RH, KOWALSKI LP, SHAH JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. Head Neck; vol. 26, n. 1, p. 31-8. 2004.
19. CASPER, J & COLTON, R. **Compreendendo os problemas da voz: Uma abordagem Fisiológica para o tratamento dos Distúrbios da voz**. Porto Alegre: Artes Médicas 1996.
20. CASTELLSAGUÉ X, QUINTANA MJ, MARTÍNEZ MC, NIETO A, SÁNCHEZ MJ, JUAN A, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. Int J Cancer. vol. 108, n. 5, p. 741-9. 2004.
21. CASTRO TMPG, NETO CER, SCALA KA, SCALA WA.: Manifestações Orais associada ao papilomavírus humano (HPV) conceitos atuais: revisão bibliográfica. Rev Bras Otorrinolaringol 2004; 70(4): 546-50.
22. CEROVAC, Z; SARCEVIC, B; KRALJ, Z; BAN, J. Detection of Human Papillomavirus (HPV) Type 6, 16 and 18 in head and neck squamous cell carcinomas by In Situ Hybridization. Neoplasma 1996; 43(4): 185-194.
23. CHATURVEDI AK. Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers.
24. CHIN D, BOYLE GM, THEILE DR, PARSONS PG, COMAN WB. Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. Br J Plast Surg, vol. 57, n. 7, p. 595-602. 2004.
25. CHOI S, MYERS JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. J Dent Res. vol. 87, n. 1, p. 14-32. 2008.
26. CHUANG, S.C.; JENAB, M.; HECK, J.E.; BOSETTI, C.; TALAMINI, R.; MATSUO, K. et al. Diet and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the INHANCE consortium. Cancer Causes Control. vol 23, n. 1, p.69-88. 2012.
27. CONTI, M & FERNÁNDEZ, J. **O sistema fonatório. Bases anatômicas e funcionais**. In: Casanova, JP. Manual de Fonoaudiologia. Porto Alegre: Artes Médicas 1992; p. 65-80.
28. CONWAY, D.I.; MCMAHON, A.D.; SMITH, K.; BLACK, R.; ROBERTSON, G.; DEVINE, J. et al. Components of socioeconomic risk associated with head and neck cancer: a

population-based case-control study in Scotland. Br J Oral Maxillofac Surg. vol. 48, n. 1, p. 11-7, 2010.

29. CURADO, M.P.; HASHIBE, M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. Curr Opin Oncol. vol. 21, n. 3, p. 194-200, 2009.

30. CURADO, MP. **Variáveis prognósticas na sobrevida do paciente com câncer glótico inicial– estudo de 72 casos.** Hospital Araújo Jorge, Goiânia [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo 2000.

31. D'SOUZA G, KREIMER AR, VISCIDI R, PAWLITA M, FAKHRY C, KOCH WM, et al. Case- control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. N Eng J Med. 2007;356(19):1944-56.

32. DALTON, TP; DIETER, MZ; MATLIB, RS; CHILDS, N; SHERTZER, HG; GENTER, MB; NEBERT, DW. Targeted knockout in the Cyp1a1 gene does not alter hepatic constitutive expression of other genes in the mouse [Ah] battery. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000; 267: 184– 189.

33. DÂNGELO, J.G. & FATINI, C.A. **Sistema Respiratório. In: Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar.** 2ª ed. São Paulo: Ateneu 2001; p.106-20.

34. DASGUPTA S, DASH R, DAS SK, SARKAR D, FISHER PB. Emerging strategies for the early detection and prevention of head and neck squamous cell cancer. J Cell Physiol. vol. 227, n. 2, p. 467-73, 2012.

35. DRUMMOND SN, DE MARCO L, NORONHA JCM, GOMEZ RS. GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol 2004;40:52-5.

36. DUTHIE SJ. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. J Inherit Metab Dis. 2011;34(1)101-9.

37. FARIDI, R. et al. Oncogenic Potencial of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. Virology Journal. 8:243. 2011.

38. FELLER, L. et al. Human papilomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: Human papillomavirus-mediated carcinogenesis. Head & Face Medicine. vol. 6, n. 14, 2010.

39. FOULKES WD. P53 - master and commander. The New England Journal of Medicine 2007;357(25):2539-41.

40. FRANÇA, D. C. C. et al. (2012). Unusual Presentation of Oral Squamous Cell Carcinoma in a Young Woman. SQU Med J. 12: 13.

41. GALBIATTI, A. et al. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology. vol. 79, março/abril 2013.

42. GALLÌ P, CADONI G, VOLANTE M, DE FEO E, AMORE R, GIORGIO A, ARZANI D, PALUDETTI G, RICCIARDI G, BOCCIA S. A case-control study on the combined effects of p53 and p73 polymorphisms on head and neck cancer risk in an Italian population. BMC Cancer 2009;9:137.

43. GANDINI S, BOTTERI E, IODICE S, BONIOL M, LOWENFELS AB, MAISONNEUVE P, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*. vol. 122, n. 1, p. 155-64. 2008.
44. GARCIA-CLOSAS M, MALATS N, SILVERMAN D, DOSEMECI M, et al. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet*, 2005; 366:649–59.
45. GAUDET, M.M.; OLSHAN, A.F.; CHUANG, S.C.; BERTHILLER, J.; ZHANG, Z.F.; LISSOWSKA, J. et al. Body mass index and risk of head and neck cancer in a pooled analysis of case-control studies in The International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) Consortium. *Int J Epidemiol.*; vol. 39, n. 4, p. 1091-102, 2010.
46. GLEICH LL& SALAMONE FN. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer control* 2002 Sep-Oct;9(5):369-78.
47. GOMES-CARNEIRO, M.R.; RIBEIRO- PINTO, L.F.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Fatores de risco ambiental para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.13, n.1, p.27-38, 1997
48. HAAST, M.H. Applied embryology of the larynx. *Canadian. Journal of Oto-Laryngology*. vol. 4, p. 412-416. 1975.
49. HADDAD RI & SHIN DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Eng J Med*. vol. 359, n. 11, p. 1143-54. 2008.
50. HANS S, BADOUAL C, GORPHE P, BRASNU D. Transoral robotic surgery for head and neck carcinomas. *Eur Arch Otorhino- laryngol*. vol. 269, n. 8, p. 1979-84. 2012.
51. HASHIBE M, BRENNAN P, BENHAMOU S, CASTELLSAGUE X, CHEN C, CURADO MP, 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. *J Natl Cancer Inst*. vol.99, n. 10, p. 777-89. 2007.
52. HASHIBE M, BRENNAN P, CHUANG SC, BOCCIA S, CASTELLSAGUE X, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the international Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; vol. 18, n. 2, p. 541-50. 2009.
53. HAUSEN, H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology*. 384.
54. HONORATO J, CAMISASCA DR, DIAS FL, FARIA PAS, LOURENÇO SQC. Análise de sobrevida global em pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de boca no ano de 1999. *Rev Bras Epidemiol*; vol. 12, p. 69-81. 2009.
55. INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat. Res*. 2001; 482: 11-19.
56. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. MINISTÉRIO DA SAÚDE. José Alencar

Gomes da Silva. Tipos de Câncer: Laringe [Internet]. Rio de Janeiro: INCA, 2012.

57. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. MINISTÉRIO DA SAÚDE. José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014. Incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

58. ISAYEVA, T. et al. Human Papillomavirus in Non-Oropharyngeal Head and Neck Cancers: A Systematic Literature Review. *Head and Neck Pathol.* 2012.

59. JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.*; vol. 61, n. 2, p. 69-90. 2011.

60. JOHNSON N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ.* vol. 65, n. 4, p. 328-39, 2001.

61. KARIN M, LAWRENCE T, NIZET V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell.* 2006;124(4):823-35.

62. KARLSEN, F; KALANTARI, M; JENKINS, A; PETTERSEN, E; KRISTENSEN, G; HOLM, R; JOHANSSON, B; HAGMAR, B. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of Human Papillomavirus. *J. Clinical. Microbiol.* 1996; 34(9): 2095-2100.

63. KASHIMA, H & MOUNTS, P. **Tumors of the head and neck, larynx, lung and esophagus and their possible relation to HPV.** In: Syrjanen, k.; Gissmann, L.; Koss, L. (eds) Papillomaviruses and human disease. New York and Tokio: Springer, Heidelberg 1987; p. 139-157.

64. KIERSZENBAUM, AL. **Histologia e Biologia Celular.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

65. KIM, KM; KIM, YM; SHIM, YS, KIM, KH, CHANG, HS, CHOI, JO. Epidemiologic survey of head and neck cancers in Korea. *Journal of Korean Medical Science*; vol. 18, p. 80-7. 2003.

66. KOWALSKI, L.P.; MIGUEL, R.E.V.; ULBRICH, F.S. In: **A Atuação da Fonoaudiologia no Câncer de Cabeça e Pescoço.** São Paulo: Lovise 2000, págs. 97-04.

67. KUMAR B, CORDELL KG, LEE JS, WORDEN FP, PRINCE ME, TRAN HH, et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol.* vol. 26, n. 19, p. 3128-37. 2008.

68. LAZARUS, P. et al. P53, but not p16 mutations in oral squamous cell carcinomas are associated with specific CYP1A1 and GSTM1 polymorphic genotypes and patient tobacco use. *Carcinogenesis, Oxford*, v.19, n.3, p.509-514, 1998

69. LEAR J.Y., HEAGERTY A.H.M., SMITH A., BOWERS B., PAYNE C., SMITH C.A.D., JONES P.W., GILFORD J., YENGI L., ALLDERSEA J., FRYER A., STRANGE R.C. Multiple cutaneous basal cell carcinomas: glutathione-S-transferase (GSTM1, GSTT1) and cytochrome P450 (CYP2D6, CYP1A1) polymorphisms influence tumour numbers and accrual. *Carcinogenesis*, 1996; 12: 1891-1896.

70. LEE YC, BOFFETTA P, STURGIS EM, WEI Q, ZHANG ZF, MUSCAT J, et al. Involuntary smoking and head and neck cancer risk: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* vol. 17, n. 8,

p. 1974- 81. 2008.

71. LETO, M. G. P. et al. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol.* vol. 86, n. 2. 2011.

72. LOFIEGO, J. **Laringectomia: avaliação e terapia fonoaudiológica.** Rio de Janeiro: Revinter 1994. 203p.

73. LOURENÇO, Simone de Queiroz Chaves, et al. Classificações Histopatológicas para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral: Revisão de Sistemas Propostos. *Rev. Bras. de Cancerol.* vol. 53, n. 3, p.325-333, 2007.

74. MARCZYNSKI, B; KRAUS, T; ROZYNEK, P; RAITHEL, HJ & BAUR, X. Association between 8- hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in DNA of workers highly exposed to asbestos and their clinical data, occupational and non-occupational confounding factors, and cancer. *Mutat. Res.* 2000; 468(2): 203-12.

75. MARKLUND, L. et al. (2011). Impact of HPV in Oropharyngeal Cancer. *Journal of Oncology.*

76. MARRON M, BOFFETTA P, ZHANG ZF, ZARIDZE D, WÜNSCH-FILHO V, WINN DM, et al. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol.* vol. 39, n. 1, p. 182-96. 2010.

77. MARTÍN-HERNÁN, F. et al. (2013). Oral cancer, HPV infection and evidence of sexual transmission. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 18.

78. MARTINS, L. A. P. **Bateson e o Programa de Pesquisa Mendeliano.** *Episteme*, Porto Alegre, n. 14, p. 27-55, jan./jul. 2002.

79. MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E. et al. Cancer Associated Human Papillomaviruses. *Curr Opin Virol.* 2. 2012.

80. MENEZES, AMB; HORTA, BL; OLIVEIRA, ALB; KAUFMANN, RAC; DUQUIA, R; DINIZ, A; MOTTA, LH; CENTENO, MS; ESTANISLAU, G; GOMES, L. Risco de câncer de pulmão, laringe e esôfago atribuível ao fumo. *Rev Saúde Pública.* vol. 36, n. 2, p. 129-34. 2002.

81. MILLER PD, LIU G, DE VIVO I, LYNCH TJ, WAIN JC, SU L AND CHRISTIANI DC. Combination of the variant genotype of GSTP1, GSTM1 and, p53 are associated with an increased lung cancer risk. *Cancer Res*, 2002; 62:2819-2823.

82. MIMEAULT, M., BATRA, S.K. Concise Review: Recent Advances on the Significance of Stem Cells in Tissue Regeneration and Cancer Therapies. *Stem Cells*; vol. 24, p. 2319-2345, 2006.

83. MINNARD GC, SPITZ MR, WU X, HONG WK, ETZEL CJ. Evaluation of glutathione S- transferase polymorphism and mutagen sensitivity as risk factors for the development of second primary tumors in patients previously diagnosed with early-stage head and neck cancer. *Cancer* 2006;105(12):2636-44.

84. MITELMAN F. Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic

Abberations of Tumor Cells. John Wiley & Sons. 2011.

85. MITELMAN, F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res.* vol. 462, p. 247-53. 2000.

86. MONTORO, José Raphael de Moura Campos et al. Fatores prognósticos no carcinoma espinocelular de cavidade oral. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2008, vol.74, n.6, pp. 861-866.

87. MOORE, S.R. et al. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Dis.*, Copenhagen; vol. 6 n.2, p. 65-74. 2000.

88. MURTHY V, AGARWAL JP, LASKAR G, GUPTA T, BUDRUKKAR A, PAI P, ET al. Analysis of prognostic factors in 1180 patients with oral cavity primary cancer treated with definitive or adjuvant radiotherapy. *J Cancer Res Ther*; vol. 6, p. 282-9, 2010.

89. NAIR, S & PILLAI, MR. Human Papilloma Virus, Cellular Genetics and Susceptibility to Cervical Cancer. *Int. J. Hum. Genet.* 2005; 5(1): 11-17.

90. NASCIMENTO JÚNIOR, A. F. Fragmentos da História da Construção das Ciências da Natureza: das Certezas Clássicas às Dúvidas Pré Modernas. *Revista Ciência e Educação*, v.9, n° 2, p. 277-299, 2003.

91. NELKE, K. et al. Human papillomavirus and its influence on head and neck cancer predisposition. *Postspy Hig Med Dosw.* 67, 2013.

92. NIV, A; SION-VARDI, N; GATOT, A; NASH, M & FLISS, DM. Carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *J. Laryngol. Otol.* 2000; 114(1): 41-6.

93. NODA, T; SASAGAWA, T; DONG, Y; FUSE, H; NAMIKI, M; INOUE, M. Detection of Human Papillomavirus (HPV) DNA. In: *Archival Specimens of Benign Prostatic Hyperplasia and Prostatic Cancer Using a Highly Sensitive Nested PCR Method.* Urol. Res. 1998.

94. NORONHA, MJR & DIAS, FL. **Câncer da laringe: uma abordagem multidisciplinar.** Rio de Janeiro: Revinter 1997.

95. NORPPA H. Genetic susceptibility, biomarkers response, and cancer. *Mutat Res*, 2003; 544:339-348.

96. NOZAWA, H. Small interfering RNA targeting epidermal growth factor receptor enhances chemosensitivity to cisplatin, 5-fluorouracil and docetaxel in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, v. 97, n. 10, p. 1115-1124, 2006.

97. NURFADHLINA M, FOONG K, TEH LK, TAN SC, MOHD ZAKI S, ISMAIL R. CYP2A6 polymorphisms in Malays, Chinese and Indians. *Xenobiotica.* 2006;36(8):684-92.

98. OLIVEIRA M.P.V. 2005. **Implicações do Polimorfismo do Códon 72 do Gene p53 no Carcinoma Laríngeo.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. p150.

99. ORSTED DD, BOJESSEN SE, TYBJAERG-HANSEN A, NORDESTGAARD BG. Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity cancer survival, and risk of

cancer in the general population. The Journal of Experimental Medicine 2007;204(6):1295-301.

100. OUDE OPHUIS MB, MANNI JJ, PETERS WH. Glutathione S-transferase T1 null polymorphism and the risk for head and neck cancer. Acta Otolaryngol 2006;126(3):311-7.

101. PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J, PISANI P. Global cancer statistics, 2002. CA cancer J Clin.; vol. 55, n. 2, p. 74-108, 2005.

102. PAVIA M, PILEGGI C, NOBILE CG, ANGELILLO IF. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. Am J Clin Nutr. 2006;83(5):1126-34.

103. PERCY, C; HOLTEN, VV; CALUM M. **Classificação Internacional de Doenças para Oncologia**. 2^a ed. São Paulo: Edusp 1996.

104. PINTO, F.R.; MATOS, L.L.; GUMZ SEGUNDO, W.; VANNI, C.M.; ROSA, D.S.; KANDA, J.L. Tobacco and alcohol use after head and neck cancer treatment: influence of the type of oncological treatment employed. Rev Assoc Med Bras. vol. 57, n. 2., p. 171-6. 2011.

105. PORTIN, P. The Origin, Development and Present Status of the Concept of the Gene: A Short Historical Account of the Discoveries. Current Genomics, v.1, n.29, p. 29-40, 2000.

106. PRADO RP, DOS SANTOS BF, PINTO CLS, ASSIS KRC, SALVADORI DMF, LADEIRA MSP. Influence of diet on oxidative DNA damage, uracil misincorporation and DNA repair capability. Mutagenesis. 2010;25(5):483-7.

107. RAUTAVA, J. et al. Biology of Human Papillomavirus Infections in Head and Neck Carcinogenesis. Head and Neck Pathol. 6. 2012.

108. REGEZI, J.A.; SCIUBBA, J.A. **Patologia bucal: correlações clinicopatológicas**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

109. RIBEIRO PINTO, L.F. Differences between isoamyl alcohol and ethanol on the metabolism and DNA ethylation of N- nitrosodiethylamine in the rat. Toxicology, Limerick, v.151, n.1/3, p.73-79, 2000.

110. RINALDI, A.L. et al. Curcumin activates the aryl hydrocarbon receptor yet significantly inhibits (-)-benzo(a)pyrene-7r-trans-7,8- dihydrodiol bioactivation in oral squamous cell carcinoma cells and oral mucosa. Cancer Res., Baltimore, v.62, p.5451-5456, 2002.

111. ROBBINS & COTRAN. **Patologia -Bases Patológicas das Doenças**. 7^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

112. RODIER F, CAMPISI J, BHAUMIK D. Two faces of p53: aging and tumor suppression.

113. RODRIGUEZ, Cristina P.; ALDELSTEIN, David J. Survival trends in Head Neck cancer: Opportunities for Improving Outcomes. The Oncologisty. vol.15, p. 921-923, agosto 2010.

114. ROSSIT ARB & CONFORTI-FROES NDT. Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer. Rev Soc Bras Cancerol 2000;10:22-30.
115. SCHROEDER K, SPENCER S, MEYER DJ, HALLIER E, BOLT HM, et al. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): DNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. Biochem J 1994;300:271-6.
116. SANTIAGO, C; BANDRÉS, F; GÓMEZ-GALLEGO, F. Polimorfismos de citocromo P450: papel como marcador biológico. Medicina del Trabajo 2002; 11(3): 130-140.
117. SANTOS O.S.N.; ROMANOS V.T.M.; WIGG D.M. 2002. **Introdução à virologia humana.** In: ROMANOS, M.T.V.; SANTOS, N.S.O.; MIRANDA, M.M.F.S. (Eds). Virose oncogênicas. Guanabara Koogan. p204.
118. SANTOS, R.A. et al. Epidemiological evaluation of patients with cancer in the upper aerodigestive tract: relevance of alcohol and tobacco risk factors. Rev. Bras. Cancerol. V. 58, n.1, jan-mar. 2011.
119. SASAKI, C.T & WEAVER, E.M. Physiology of the larynx. Am J Med. vol. 103, p. 9-18. 1997.
120. SASSI LM, DISSENHA JL, SIMETTE RL, STRAMANDINOLI RT, PEDRUZZI PAG, ZANFERRARI FL, et al. Prevenção em câncer bucal: 20 anos de campanha antitabaco no Estado do Paraná, Brasil. Rev Bras Cir Cabeça Pescoço; vol. 39, p. 184-6. 2010.
121. SILVA, A.M.T.C. **Avaliação Epidemiológica do Câncer da Laringe na população de Goiânia no período de 1988 a 1998.** Registro de Câncer de Base Populacional do Hospital Araújo Jorge – Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Goiânia [dissertação]. Goiás: Universidade Federal de Goiás; 2003.
122. SILVA, J. et al. (2011). Oncogenic HPV Types Infection in Adolescents and University Women from North Portugal: From Self-Sampling to Cancer Prevention. Journal of Oncology. 2014.
123. SORIANO A, VICENTE J, CARCAS C, GONZALEZ-ANDRADE F, ARENAZ I, MARTINEZ-JARRETA B, et al. Differences between Spaniards and Ecuadorians in CYP2A6 allele frequencies: comparison with other populations. Fundam Clin Pharmacol. 2011;25(5):627-32.
124. SPITZ M.R.; HOQUE A.; TRIZNA Z.; SCHANTZ S.P.; AMOS C.I.; KING T.M.; BONDY M.L.; HONG W.K.; HSU T.C. 1994. Mutagen sensitivity as a risk factor for second malignant tumors following malignancies of the upper aerodigestive tract. J. Natl. Cancer Inst. (86):1681-84.
125. SYRJÄNEN, S. et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. Oral Diseases. 2011.
126. SZYMAŃSKA K, HUNG RJ, WÜNSCH-FILHO V, ELUF-NETO J, CURADO MP, KOIFMAN S, ET al. Alcohol and tobacco, and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Latin America: a case-control study. Cancer Causes Control. vol. 22, n. 7, p. 1037-46. 2011.

127. THOMAS M, KALITA A, LABRECQUE S, PIM D, BANKS L, MATLASHEWSKI G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol.* 1999;19:1092-100.
128. THOMÉ, R.; THOMÉ, D.C.; ROYG, C.R.C. Tumores cartilagosos da laringe. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*; vol. 67, n. 6, p. 809-17, 2001.
129. TORTORA, G. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 9^{ed}. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
130. TRIBIUS, S. et al. (2013). **Human Papilloma Virus Infection in Head and Neck Cancer**. *Deutsche Ärzteblatt International*, 110.
131. TRIZNA Z. & SCHANTZ S.P. Hereditary and environmental factors associated with risk and progression of head and neck cancer. *Otolaryngol. Clin. North Am.* (25):1089-03. 1992.
132. TSANTOULIS, P. K. et al. (2007). Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncology*, 43.
133. TUCKER, G.F. **The anatomy of the laryngeal cancer**. Workshop from the Centennial Conference of Laryngeal Cancer. New York: Appleton Century Crafts 1976; p. 11-25.
134. UNO, S; DALTON, TP; SHERTZER, HG; GENTER, MB; WARSHAWSKY, D; TALASKA, G; NEBERT, DW. Benzo[a]pyrene-induced toxicity: paradoxical protection in Cyp1a1 (-/-) knockout mice having increased hepatic BaP-DNA adduct levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 289: 1049–1056.
135. UPILE, T. et al. (2012). Oral sex, cancer and death: sexually transmitted cancers. *Head & Neck Oncology*. 31.
136. VAZQUEZ A, BOND EE, LEVINE AJ, BOND GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature* 2008;7:979-87.
137. VISONI SBC. **O papel das enzimas CYP2A na susceptibilidade ao câncer de esôfago e sua regulação** [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2009
138. WALL TL, SCHOEDEL K, RING HZ, LUCZAK SE, KATSUYOSHI DM, TYNDALE RF. Differences in pharmacogenetics of nicotine and alcohol metabolism: review and recommendations for future research. *Nicotine Tob Res.* 2007;9 Suppl 3:S459 - 74.
139. WHIBLEY C, PHAROAH PD, HOLLSTEIN M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(2):95-107.
140. WILKINSON J., CLAPPER M. L. Detoxification enzymes and chemoprevention. *Proceeding Society Experimental Biological Medicine*, 1997; 216: 192 -200.
141. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO report on the global tobacco epidemic**, 2014: Warning about the dangers of tobacco. Geneva: WHO, 2014.

Anexos

Anexo 1. Parecer favorável do Comitê de Ética da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG).



ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS

Goiânia, 30 de junho de 1998.

Ilma Sra.
Dra. Maria Paula Curado
Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge – ACCG
Nesta

Prezada Sra.,

Encaminhamos a V.Sa. relatório do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Vivos, após análise do projeto **“ESTUDO INTERNACIONAL CORRELACIONANDO VIROSES E CÂNCER DE CAVIDADE ORAL E DE LARINGE”**.

Informamos que o referido projeto foi aprovado em reunião do comitê realizado no dia 30/06/98 após ser apresentado aos membros presente.

Colocamo-nos ao seu inteiro dispor para esclarecimentos necessários.

Cordiais Saudações.


Dr. Geraldo Silva Queiroz
Presidente do Comitê de Ética - ACCG

Anexo 2. Análise de Prontuários de Pacientes com CEC de Laringe

ACCG – Hospital Araújo Jorge
Núcleo de Pesquisas Replicon

ID: _____

- 1. Nº. Prontuário:** _____ **Sexo:** - 1. M () - 2. F ()
- 2. - 1. Idade:** _____ **-2. Grupo Étnico:** _____ **-3. Profissão:** _____
- 3. - 1. Cidade:** _____ **-2. Telefone:** _____
- 4. Hábitos:**
- 1. Tabagismo** () _____ anos _____ meses **-2. Etilismo** () _____ anos _____ meses
- 5. Alguma evidência de neoplasia na família?**
- 1.** () Sim **-2.** () Não. Câncer de _____
- 6. -1. Data do Diagnóstico:** ____/____/____.
- 7. CID-O:** **-1.** Glote C32.0 () **-2.** Supraglote C32.1 () **-3.** Subglote C32.2 ()
- 4.** Cartilagem L. C32.3 () **-5.** Lesão sobreposta C32.8 () **-6.** Laringe, SOE C32.9 ()
- 8. Estadiamento:** **-1.** T () N () M () **-2.** Data: ____/____/____.
- 9. Tratamento:** Houve consenso por parte da família e / ou do paciente? **-1.** S () **-2.** N ()
- 3.** () Radioterapia a) início: ____/____/____ b) fim: ____/____/____ obs.: _____
- 4.** () Quimioterapia a) início: ____/____/____ b) fim: ____/____/____ obs.: _____
- 5. Cirurgia:**
- 5.1.** () Laringectomia Parcial **5.2.** () Laringectomia Total **5.3.** () Esvaziamento Cervical
- 10. Situação do Paciente**
- 1.** () ausência da doença ativas e / ou cura
- 2.** () intervalo livre da doença (data: ____/____/____)
- 3.** () reincidência (data da confirmação: ____/____/____) () Rxt () Qmt () Cirurgia
- 4.** () prontuário em aberto (sem mais informações, evasão) (última consulta: ____/____/____)
- 5.** () tratamento domiciliar (data: ____/____/____)
- 6.** () óbito (data: ____/____/____)

Observações:

Anexo 3. Comprovante de submissão à *Cancer Prevention Research (CPR)*:

Artigo 01 - Alcohol and tobacco consumption and the genetic polymorphism of CYP and GST in patients with cancer squamous cell laryngeal



Detailed Status Information

Manuscript #	CAPR-17-0077
Current Revision #	0
Submission Date	2017-03-14 18:06:57
Current Stage	Initial QC
Title	Alcohol and tobacco consumption and the genetic polymorphism of CYP and GST in patients with cancer squamous cell laryngeal
Running Title	Genetic polymorphism with cancer laryngeal
Manuscript Type	Research Article
Category	Risk Factors and Assessment
Corresponding Author	Mr. Raimundo L. Silva (Pontifical Catholic University of Goiás)
Contributing Authors	Dr. Paulo Marcelo F. Vasconcelos, Dr. Claudio C. da Silva, Dr. Aparecido D. da Cruz, Dr. Maria Paula Curado
Abstract	The study of risk factors for laryngeal cancer is justified by the need to propose preventive actions, aiming to reduce its incidence in regions and countries where it is still high, as in Brazil. The aim of this study was to analyze the genetic polymorphisms of CYP1A1m1, GSTM1 and GSTT1 in case-control groups of patients diagnosed with squamous cell carcinoma of the larynx in patients attended by Hospital Araújo Jorge, a reference service in the diagnosis and treatment of cancer in the Central Brazil. A total of 63 patients were analyzed over a period of 10 years. As for the CYP1A1 gene, allelic frequencies of 56.9% and 56.1% were observed for the wild-type T and 41.1% and 43.9% for the mutant C allele in cases and controls. Positive genotypic frequencies were observed for the GSTM1 and GSTT1 genes of 41.3% (26/63) and 54.0% (34/63) for laryngeal carcinomas and 49.0% (24/49) and 51.0% (25/49) for the control group, respectively. No statistically significant associations of the allelic and genotype variants CYP1A1m1, GSTM1 and GSTT1 with the squamous cell carcinoma of the larynx were found. The absence of this check, however, does not completely exclude the possibility of this gene to exert some influence on the development of laryngeal cancer, considering that haplotypes involving the various biometabolism genes may contribute in a differentiated way to the carcinogenesis.
User-Defined Keywords	polymorphism, cancer risk, larynx
Keywords	☐ LOH and marker studies, ☐ Carcinogen metabolism, ☐ Molecular markers of metastasis and progression, ☐ Diet, alcohol, smoking, and other lifestyle risk factors, ☐ Environmental and occupational epidemiology, ☐ Polymorphisms in carcinogen metabolism and cancer risk
Discount Code	
Funding Body Archiving Mandates	Funding Summary
AACR Member	No
Information Authorization	Has authorization been given to use any information conveyed by either personal communication or release of unpublished experimental data? Yes

Stage	Start Date
Initial QC	2017-03-14 18:06:57
Manuscript Submission	2017-03-14 17:22:15



Artigo 02 - TP53 polymorphism analysis and HPV infection in cancer of larinx of Central Brazil

aacrjournals.org
SmartSubmit
American Association for Cancer Research

**Cancer
Prevention
Research**

[Manuscript Home](#)
[Author Instructions](#)
[Reviewer Instructions](#)
[Help](#)
[Tips](#)
[Logout](#)
[Journal Home](#)
[Change Journal](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	CAPR-17-0078
Current Revision #	0
Submission Date	2017-03-15 09:18:39
Current Stage	Initial QC
Title	TP53 polymorphism analysis and HPV infection in cancer of larinx of Central Brazil
Running Title	TP53 polymorphism and HPV infection in cancer of larinx
Manuscript Type	Research Article
Category	Risk Factors and Assessment
Corresponding Author	Mr. Raimundo L. Silva (Pontifical Catholic University of Goias)
Contributing Authors	Dr. Paulo Marcelo F. Vasconcelos , Dr. Claudio C. da Silva , Dr. Aparecido D. da Cruz , Dr. Maria Paula Curado
Abstract	Knowledge of human papillomavirus (HPV) -activated carcinogenesis and inactivation of the TP53 tumor suppressor gene by the E6 oncoprotein and the inactivation of cell apoptosis lead to preferential growth of the affected cells characterized by a progressive and uncontrolled increase in cancer. The objective of the present study was to evaluate a possible association of the HPV3-related gene of the TP53 gene (codon 72) in cases of control cases of patients diagnosed with laryngeal squamous cell carcinoma (SCC) in patients treated by Head and Neck Service of a Hospital Araújo Jorge, reference in Central Brazil for treatment and diagnosis of cancer. In all, 112 patients were evaluated, of which 63 were from the case group. The polymorphism of the codon 72 (Arg or Pro) of the TP53 gene was evaluated and additionally, fresh biopsy samples were submitted to HPV identification and genotyping. The study revealed that Pro / Pro individuals laryngeal cancer later than Arg/Arg and Arg/Pro patients. In addition, comparing the case and control groups, a 2.7-fold higher risk of developing cancer of the larynx was observed. Larynx with the presence of the Arg/Pro genome. The frequency of the HPV genome was 3% of the analyzed samples (HPV11 and 16/45). Additional changes in the studied areas and an investigation of other factors associated with laryngeal carcinomas are important important in the estimation of the prognosis of tumors and, consequently, in the quality of the patients' quality of life.
User-Defined Keywords	TP53, larynx, HPV
Keywords	Head and neck/oral cancers, Tumor promotion and progression, Control of cell cycle progression, p53
Discount Code	
Funding Body Archiving Mandates	Funding Summary
AACR Member	No
Information Authorization	Has authorization been given to use any information conveyed by either personal communication or release of unpublished experimental data? Yes

Stage	Start Date
Initial QC	2017-03-15 09:18:39
Manuscript Submission	2017-03-15 08:53:19



[Manuscript Home](#) |
 [Author Instructions](#) |
 [Reviewer Instructions](#) |
 [Help](#) |
 [Logout](#) |
 [Journal Home](#)
[Terms of Service](#) | Licensed under Patent #US 7,620,555B1

Anexo 4. Instruções para submissão à *Clinics* (FM/USP)

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

ISSN **1807-5932** *printed version*
ISSN **1980-5322** *versión online*



Updated 04/08/2016

Scope and editorial policy

CLINICS publishes peer-reviewed articles of interest to clinicians and researchers in the medical sciences. **CLINICS** is registered with **PubMed** Central (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/795/>) and **SciELO** (<http://www.scielo.br/clinics>) and complies with the policies of funding agencies which request or require deposition of the published articles that they fund into publicly available databases. **CLINICS** supports the position of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trial registration. Visit <http://www.icmje.org/> for further details and <http://www.who.int/ictrp/network/en/> for the WHO's list of approved registries.

Please make sure to submit your manuscript in the exact format that is described below. Failure to do so will cause the submission to be returned to you during the preliminary examination by the Editorial Office.

- Manuscripts involving human subjects or the use of laboratory animals must clearly state adherence to appropriate guidelines and approval of protocols by their institutional review boards. Photographs that may identify patients or other human participants of studies shall be acceptable only when a legally valid consent form is signed by the participating patient, other human participant, or his/her legally constituted representative.
- Authors are strongly advised to use abbreviations sparingly whenever possible to avoid jargon and improve the readability of the manuscript. All abbreviations must be defined the first time that they are used. Only terms or expressions that are used at least 5 times throughout the text should be abbreviated. Never use abbreviations that spell common English words, such as FUN, PIN, SCORE, and SUN.

PROFESSIONAL ENGLISH REVISION

Prior to submission to **CLINICS** all manuscripts must undergo professional English revision. Upon submission an officially certified document issued by the language revision company or language reviewer, confirming that the manuscript has been revised must be uploaded as a complementary file.

CLINICS highly recommends the company American Journal Experts (AJE). We have been working with AJE for many years, and are very satisfied with the quality of their work. We are pleased to inform you that we have negotiated a special fee for our authors. Please submit your manuscript to AJE through their website (<https://www.aje.com>). If you have any doubts please contact them directly by email (support@aje.com). Our 20% discount code is CLINICS2016. Premium Editing is mandatory for **CLINICS**.

Our Editorial Policies for accepted manuscripts are listed below:

- Manuscripts that have already been revised by AJE: As soon as the manuscript is accepted for publication, the authors must send it to AJE again for a final revision. This revision is included in the initial fee, there is no extra cost.
- Manuscripts that have been revised by another company, other than AJE: As soon as the manuscript is accepted for publication, the authors must send it to AJE for a final revision (Premium Editing).

During the evaluation, process manuscripts undergo modifications, so a final revision is obligatory for all manuscripts approved for publication.

PUBLICATION FEES

CLINICS uses a business model whereby expenses are partly recovered by charging the authors, or research sponsors, a publication fee for each published article. We have updated our 2016 prices, effective for articles submitted from 05/01/2016 onwards, as follows: original articles, review articles and rapid communications: **US\$ 1,500.00 (International authors)** and **R\$ 1.500,00 (Brazilian authors)**. There are no charges for Invited reviews, editorials and letters to the editors.

Waiver Policy: Most institutions and funding agencies have set up funding sources to cover Article Publication Costs. Unfortunately **CLINICS** cannot grant fee waivers due to its 2016 policies.

SUBMISSION

A copyright transfer form, signed by all authors, must be uploaded as a complementary file as soon as the manuscript is submitted.

When the authors are satisfied that the manuscript complies with the journal format, our site should be accessed using the website www.clinics.org.br. The system will guide authors through the manuscript submission process and will prompt authors to input information into specific fields as they are submitting their manuscript. The editorial office and authors will be automatically notified of the submission. Progress of the manuscript through the Editorial Office's procedures will be available to authors at all times. Click here to download the Copyright Transfer Form.

PEER REVIEW

Manuscripts are reviewed by at least two expert consultants. Accepted manuscripts are edited to comply with the journal's format, remove redundancies, and improve clarity and understanding without altering meaning. The edited text will be presented to authors for approval.

Manuscript Categories

ORIGINAL STUDY: Complete original studies should be submitted in this category. Three sections are offered: basic, clinical, and surgical research. Original studies must conform to the following format:

Title page

- Title (up to 250 characters);
- Running title (up to 40 characters, letters and spaces);
- Full address of corresponding author only;
- Authors' names (without titles or degrees). Authors should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Such participation must be declared in this section of the manuscript.
- Any financial or other relationships that may lead to a conflict of interest must be disclosed.

Manuscript

- **Abstract:** Abstracts are limited to 250 words and structured into objectives, method, results, and conclusions. Citations or abbreviations (except internationally recognized abbreviations, such as weights, measures, and physical or chemical abbreviations) are not permitted. Authors are strongly encouraged not to display numerical statistical information but to merely state what is significantly different (or not) between the described parameters.
- **Keywords:** For keywords, 3-6 items from the Medical Subject Headings (MeSh) should be used.
- **Introduction:** The introduction should set the purpose of the study, provide a brief summary (not a review) of previous relevant studies, and state the new advances in the current investigation. The introduction should not include data or conclusions from the work being reported. A final sentence summarizing the novel finding to be presented is permissible.
- **Materials and Methods:** This section should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques only need to be referenced. Previously published methods may be briefly described following the reference.
- **Ethics:** When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, which was revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's guide, a national research council's guide, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.
- **Results:** The results section should be a concise account of the new information that was discovered, with the least personal judgment. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations but briefly describe what these data comprise.
- **Discussion:** The discussion should include the significance of the new information and relevance of the new findings in light of existing knowledge. Only unavoidable citations should be included. Citation to review articles are not encouraged in this section.
- **Acknowledgements:** This section should be short, concise, and restricted to acknowledgements that are necessary.
- **References in text:** CLINICS adopts the Vancouver format. Cite references in the text using Arabic numerals in the order of appearance, within parentheses, (1) after the previous word, with spacing as in this example: "Diabetes (2), hypertension (3,4) and alcoholism (5-9) are complex medical problems (10)." Under exceptional circumstances, authors' names may appear in text: Single author: "Einstein (11) proposed a new theory ...", Two authors: "Watson and Crick (12) reported on the structure of ...", or Three or more authors: "Smith et al. (13) described ..."
- **Reference List:** Only citations that appear in the text should be referenced. References must be restricted to directly relevant published works, papers, or abstracts. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work that is accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. Usually the total number of references should not exceed 35. For up to 6 authors, list all authors. For more than 6 authors, list first 6 authors followed by "et al".
- **Tables and Figures:** Tables: Should be constructed using the table feature in your word processor or using a spreadsheet program such as Excel. The tables should be numbered in order of appearance in the text, using Arabic numerals. Each table

should have a title and an explanatory legend, if necessary. All tables must be referenced and succinctly described in the text. Under no circumstances should a table repeat data that are presented in an illustration. Statistical measures of variation (i.e., standard deviation or standard error) should be identified, and decimal places in tabular data should be restricted to those with mathematical and statistical significance. Figures: Photographs, illustrations, charts, drawings, line graphs, etc. are all defined as figures. Number figures consecutively using Arabic numerals in order of appearance. Figure legend(s) should be descriptive and should allow examination of the figure without reference to text. Images must be of professional quality and uploaded as *.tiff files. Generally, figures will be reduced to fit one column of text. The actual magnification of all photomicrographs should be provided, preferably by placing a scale bar on the print. Line graphs and charts should never be sent as *.jpeg illustrations. We recommend preparing line graphs and charts as Excel® files and copying these files into a Word *.doc sheet.

REVIEW ARTICLES: Review articles should cover themes that are relevant to medical practice. Spontaneously submitted reviews are welcome; however, potential authors should bear in mind that they are expected to have expertise in the reviewed field. The sections should be arranged as follows:

- Title page: As described in the Original Study section.
- Manuscript: Abstract, keywords and text should be arranged to cover the subject that is being reviewed. If appropriate, the method of reference collection should be described. The use of headings, subheadings, and paragraph titles is encouraged to improve clarity. Abbreviations, acknowledgments, tables and figures should be formatted as described in the Original Study section. The number of references is at the discretion of the authors. No publication fee discount is allowed for spontaneously submitted review articles that are accepted for publication.

RAPID COMMUNICATIONS:

- Title page: As described in the Original Study section.
- Manuscript: Rapid communications are limited to 1,500 words, not including the reference list, abstract and keywords. Authors should format rapid communications based on the subject at hand. Abstracts are limited to 250 words and structured into objectives, method, results, and conclusions. Citations or abbreviations (except internationally recognized abbreviations, such as weights, measures, and physical or chemical abbreviations) are not permitted. For keywords, 3-6 items from the Medical Subject Headings (MeSh) should be used.

LETTERS TO THE EDITOR: Letters to the editor expressing comments or dissenting opinions concerning articles that have been recently published in CLINICS are published at the discretion of the editor. A letter is a single section containing untitled text concerning the article under discussion, followed by references. No publication fee is charged for this class of manuscripts.

EDITORIAL: Editorials should cover broad aspects of medical or biological sciences. Such manuscripts are not submitted to peer review and are published at the discretion of the editor. No publication fee is charged for this class of manuscripts.

COMMENTARY: A commentary is an invited text with respect to an article that is being published by CLINICS. No publication fee is charged for this class of manuscripts.

INVITED REVIEW: These reviews are by invitation only and follow the format proposed for general reviews. No publication fee is charged for this class of manuscripts.

SPECIAL ISSUE ARTICLE: Special issue articles are by invitation only and follow a specific format that is set by the editor in charge of the collection.

Currently CLINICS does not accept: case reports, technical notes, retrospective studies, translations and validations of questionnaires, and articles referring to first demonstration in Brazil.