

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, MOLECULAR E CITOGENÉTICA
DO CÂNCER DE HIPOFARINGE EM GOIÂNIA**

**Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Mestrado em Biologia
Área de Concentração Biologia Celular e Molecular**

**Avaliação Epidemiológica, Molecular e Citogenética do Câncer de
Hipofaringe em Goiânia**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biologia – Área de Concentração Biologia Celular e Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás – UFG, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientando: Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova Costa, B.Sc.

Orientador: Doutor Aparecido Divino da Cruz, Ph.D.

Avaliação Epidemiológica, Molecular e Citogenética do Câncer de
Hipofaringe em Goiânia

^{1,2,3,*} **Dr. Aparecido D. da Cruz, Ph.D.**

^{1,3,*} **Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova Costa, B.Sc.**

¹ NPR - Núcleo de Pesquisas Replicon - Departamento de Biologia - Universidade Católica de Goiás.

² LaGene – Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular / SuLeide – Superintendência Leide das Neves Ferreira / SES – Secretaria do Estado da Saúde / Governo do Estado de Goiás.

³ Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia - Instituto de Ensino e Pesquisa - Setor de Pesquisa Básica. ACCG - Associação de Combate ao Câncer em Goiás.

* Correspondência: vilanovacosta@gmail.com ou acruz@ucg.br

Setembro / 2006

*Aos meus pais, Conceição e Lourival,
criação e carinho.*

*Aos meus irmãos, Saulo e Salomão,
amizade e presença.*

Para o desenvolvimento do presente estudo, este trabalho contou com o apoio do Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia/GO (RCBP) da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG) - Hospital Araújo Jorge; do International Agency for Research on Cancer (IARC); do Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da Universidade Católica de Goiás (UCG) e da Universidade Federal de Goiás (UFG). O mestrando ainda contou com o auxílio, através de bolsa de estudo, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*Uma coisa aprendi em minha longa vida, que toda a nossa ciência,
estimada através da realidade, é primitiva e infantil –
ainda assim, é a coisa mais preciosa que temos.*

Albert Einstein

*“We are human, after all
Flesh in common, after all”
 (“Somos humanos, apesar de tudo
Carne em comum, afinal”)*

Daft Punk, in: Human After All



Goiânia, Hospital Araújo Jorge, local onde funciona a unidade de tratamento de câncer, assim como o Registro de Câncer de Base Populacional, ambos da Associação de Combate ao Câncer em Goiás. Quarto andar, setor de pediatria, local permeado de crianças, anjos, recebendo tratamento. Uma arena, onde pequenos guerreiros de corpos delgados e calvos – efeitos do forte tratamento a que são submetidos – lutam contra um mostro, poderoso e ignorante, um Nêmesis, que aproveitando do intenso poder proveniente da juventude de seus pequenos adversários, cresce e se multiplica, de forma avassaladora e nefasta, perante aos olhos de pais, amigos e agentes de saúde perplexos.

Mesmo local, uma tarde calorenta de agosto, observo um pequeno menino, pele clara e olhos profundos, brincando, sorrindo, sonhando; por um momento, indiferente a tudo que está acontecendo em seu interior, indiferente àquele gigante, que cresce dentro de si próprio, nutrindo-se, se transformando, tornando-se, talvez, na maior ameaça que ele poderia sofrer em toda a sua vida.

Agora é outubro, dias chuvosos, acompanho, ao longe, a evolução dessa luta, uma batalha cruel e atroz, onde o mocinho tem de chegar ao limiar da autodestruição, para ter a chance de vitória. Sua mãe o chama, descubro seu nome, “Dêivide” (sic), digno da situação, mais uma vez, Davi contra Goliás, próprio, um minúsculo contra um gigante, batalha até a morte. Contudo, assim como na passagem bíblica, o herói conta com o apoio do divino e de seus amados, assim como da competente equipe médica e até da torcida de um desconhecido estudante de ciências.

Novembro, a peleja se encontra em seus momentos finais, nosso miúdo parece seguir em direção ao triunfo, o gigante, não é tão forte assim, fraqueja, se ajoelha diante de um corajoso, um leão, apesar de mostrar uma aparência frágil e muito debilitada, é verdadei. Final de dezembro, milagrosamente, a criança derrota o bandido ceifador de vidas, o Câncer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, força maior que rege toda a criação, pela oportunidade de viver, em tão belo lugar e tempo, onde as pessoas, mais que nunca, são respeitadas e entendidas em sua personalidade e características pessoais; onde a realização dos sonhos, mais que nunca, é dependente apenas de seu esforço e dedicação.

Ao meu orientador, o Professor, Dr. Aparecido Divino da Cruz, pela confiança e oportunidade a mim proporcionadas, pelas orientações acadêmicas e pessoais, pela amizade e carinho doados.

Aos meus familiares, minha mãe, Conceição, que sempre me foi compreensiva, atenciosa, presente e amiga. Ao meu pai, Lourival, que apesar de ter sido levado tão precocemente, me deixou como herança a bondade, o valor e o senso de responsabilidade.

Aos meus irmãos, Saulo e Salomão, que sempre estiveram próximos, me apoiando nos momentos mais difíceis de minha caminhada.

Ao meu anjo, meu amor maior, Flávia, que me mostrou como se pode amar alguém, de corpo e alma, incondicionalmente e em toda a sua plenitude.

Aos meus amigos, Rafael, Cláudio, Fabiano, Márcio, Marcus, Marcão, Damiana, Janaína, Melissanda, Raimundo, Iracema, e Nilva, pela amizade e carinho quase fraternais.

A todos os amigos no Núcleo de Pesquisas Replicon, em especial a Damiana, Jalsi, Daniela, Bruno, Márcio, Flaviane, Eldon, pelos momentos entremeados de amizade, alegria e entusiasmo, que me fizeram sentir como se estivesse em um segundo lar

Aos meus Professores, amigos e colegas do Programa de Mestrado em Biologia da Universidade Federal de Goiás.

A equipe do Hospital Araújo Jorge e da Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer, que me forneceram o todo o material amostral, imprescindível ao desenvolvimento do trabalho.

À Doutora Maria Paula Curado, que disponibilizou todos recursos possíveis para o desenvolvimento do presente estudo

Agradeço também, por fim, a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou mesmo indiretamente, para a elaboração deste trabalho. A todos, meu mais sincero Obrigado!

SUMÁRIO

Dedicatória	iv
Apoio	v
Epígrafe	vi
Frontispício	vii
AGRADECIMENTOS	viii
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE GRÁFICOS	xiv
LISTA DE ANEXOS	xv
Resumo	xix
<i>Abstract</i>	xx
Introdução Geral	21
Objetivos	22
Objetivo Geral	22
 CAPÍTULO 1. O CÂNCER DE HIPOFARINGE	23
Resumo.....	23
<i>Abstract</i>	23
1.0 INTRODUÇÃO	24
1.1 Neoplasias, nomenclatura e	25
subdivisões.....	26
1.2 Carcinogênese	27
1.3 Carcinógenos e Fatores de risco	28
1.3.1 Carcinógenos químicos	28
1.3.1.1 Tabagismo	29
1.3.1.2 Etilismo	29
1.3.2 Carcinógenos físicos	29
1.3.3 Carcinógenos virais e o Papiloma vírus Humano (HPV)	31
2.0 ASPECTOS GERAIS DA HIPOFARINGE	31
2.1 Anatomia	32
2.2 Histologia	32
2.3 Morfologia	33

2.4 Manifestações Clínicas.....	33
2.5 Avaliação diagnóstica.....	34
2.6 Estadiamento.....	35
2.6.1 Estádio T (Tumor)	36
2.6.2 Estádio N (Nódulo Linfático Regional)	37
2.6.3 Estádio M (Metástase à distância)	38
2.6.4 Grupamento por Estádios.....	38
2.7 Classificação Internacional das Doenças para Oncologia (CID-O)	38
2.8 Tratamento.....	39
3.0 CONCLUSÕES.....	39

CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DO CÂNCER DE HIPOFARINGE EM GOIÂNIA, NO PERÍODO DE 1998 A 2003.....

Resumo.....	41
Abstract.....	41
1.0 INTRODUÇÃO.....	42
1.1 Estimativa de Sobrevida.....	43
1.2 Tábua de Vida Atuarial (Dados Completos)	44
1.3 Tábua de Vida Atuarial (Dados Incompletos)	45
2.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1 Grupo de Estudo.....	47
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.0 CONCLUSÕES.....	54

CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA DA MUCOSA ORAL DE PACIENTES COM TUMORES DE HIPOFARINGE.....

Resumo.....	56
Abstract.....	56
1.0. INTRODUÇÃO.....	57
1.1. Testes citogenéticos.....	57
1.2. O tecido epitelial	58
1.3. Formação do micronúcleo.....	59
2.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
2.1. Grupo Amostral.....	61

2.2. Coleta das Amostras.....	61
2.3. Hidrólise, coloração e fixação das amostras.....	62
2.4. Contra-coloração com <i>Fast Green</i>	63
2.5. Lavagem e retirada de depósitos.....	63
2.6. Análise Citogenética.....	63
2.7. Análise estatística	64
3.0. RESULTADOS.....	64
4.0. DISCUSSÃO.....	66

CAPÍTULO 4. A INFECÇÃO POR HPV EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMAS DE CABEÇA E PESCOÇO.....69

Resumo.....	69
Abstract.....	69

1.0. INTRODUÇÃO.....70

1.1.O Papilomavírus humano.....	71
1.2.A presença de HPV em mucosas normais	73
1.3.Os HPVs e a Carcinogênese.....	73
1.4.Detecção molecular do HPV	75

2.0. MATERIAL E MÉTODOS 77

2.1.Grupo amostral.....	77
2.2.Obtenção das amostras.....	77
2.3.Extração de DNA.....	77
2.4.Reação em cadeia da Polimerase.....	77
2.5.Análise dos fragmentos de PCR.....	79

3.0. RESULTADOS..... 80

4.0. DISCUSSÃO.....80

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS83

ANEXOS91

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1. O Câncer de Hipofaringe

- Figura 1.1.** Desenho esquemático das regiões da Nasofaringe, Orofaringe e Hipofaringe.. 32
- Figura 1.2.** Desenho esquemático demonstrando posições de tumor em estágio T1 (A e B)..... 35
- Figura 1.3.** Desenho esquemático demonstrando posições de tumor em estádios T1 (A), T2 (B, C, D, E e F) e estágios T3 (G e H) e seus respectivos tamanhos iniciais..... 36
- Figura 1.4.** Desenhos esquemáticos demonstrando posições e tamanhos de tumores em estágio N1 (A), N2 (B e C) e N3 (D) no linfonodos regionais da hipofaringe.. 37

Capítulo 3. Avaliação Citogenética da Mucosa Oral de Pacientes com Tumores de Hipofaringe

- Figura 3.1.** Principais biomarcadores observados no estudo..... 66

Capítulo 4. A infecção por HPV em Pacientes Portadores de Carcinomas de Cabeça e Pescoço

- Figura 4.1.** Cortes histopatológico do tecido da hipofaringe e da cavidade oral de pacientes com carcinoma epidermóide, corado por Hematoxilina-Eosina. **(A)** Em aumento de 400x. **(B)** Células de carcinoma oral com coilocitose (setas) em aumento de 1000x. **(C)** Células apresentando hiperqueratose, aumento de 100x. **(D)** Células epiteliais apresentando papilomatose em aumento de 200x.. 70
- Figura 4.2.** Diagrama esquemático da posição das bandas amplificadas pelos *primers* descritos na Tabela 4.1. Ld: marcador de tamanho de 100pb (*Promega Corporation, EUA*)..... 79

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1. O Câncer de Hipofaringe

Tabela 1.1. Classificação do tumor primário para o câncer de hipofaringe.....	35
Tabela 1.2. Classificação dos nódulos linfáticos (N) para os tumores de hipofaringe.....	36
Tabela 1.3. Classificação de metástases à distância para o câncer de hipofaringe.....	37
Tabela 1.4. Grupamento por estágio para o câncer de hipofaringe.....	38
Tabela 1.5. Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O). Topografia, Regiões e CID-O.....	38

Capítulo 2. Avaliação Epidemiológica do Câncer de Hipofaringe em Goiânia, no Período de 1998 a 2003

Tabela 2.1. Exemplo do cálculo de probabilidade de sobrevivência.....	46
Tabela 2.2. Distribuição de casos de Câncer de Hipofaringe por faixa etária.....	49

Capítulo 3. Avaliação Citogenética da Mucosa Oral de Pacientes com Tumores de Hipofaringe

Tabela 3.1. Resultado da análise estatística descritiva das variáveis da idade e sexo dos indivíduos participantes do estudo.	64
Tabela 3.2. Resultados da análise estatística descritiva dos hábitos de vida dos casos e controles do estudo, distribuídos por sexo.	65
Tabela 3.3. Tempo médio do hábito de fumar, apresentado pelos indivíduos estudados do grupo controle e casos.....	65
Tabela 3.4. Análise estatística das alterações nucleares observadas para os grupos caso e controle, mostrando as frequências percentuais e as probabilidades de diferença entre as frequências.	66

Capítulo 4. A infecção por HPV em Pacientes Portadores de Carcinomas de Cabeça e Pescoço

Tabela 4.1. Sequências consenso dos <i>primers</i> utilizados na genotipagem e o tamanho esperado do fragmento amplificado, segundo Karlsen e colaboradores (1996).	78
Tabela 4.2. Estatística descritiva dos casos participantes da avaliação molecular dos carcinomas de hipofaringe.....	80

LISTA DE GRÁFICOS

Capítulo 2. Avaliação Epidemiológica do Câncer de Hipofaringe em Goiânia, no Período de 1998 a 2003

Gráfico 2.1. Exemplo de como os indivíduos são seguidos no tempo (calendário).	44
Gráfico 2.2. Exemplo de como os indivíduos são considerados na análise.....	44
Gráfico 2.3. Sobrevida Relativa Geral para o câncer de hipofaringe na população de Goiânia, no período de 1998 a 2003.....	48
Gráfico 2.4. Distribuição percentual de Casos de Câncer de Hipofaringe entre os sexos em Goiânia, no período de 1998 a 2003.	49
Gráfico 2.5. Sobrevida Relativa entre os sexos para o câncer de hipofaringe na população de Goiânia, no período de 1998 a 2003.	50
Gráfico 2.6. Sobrevida Relativa entre os pacientes com hábito tabagista e não tabagista.....	51
Gráfico 2.7. Sobrevida Relativa entre os pacientes com hábito etilista e não etilista.....	51
Gráfico 2.8. Distribuição dos casos diagnosticados de hipofaringe por estadiamento, no período de 1998 a 2003.	52
Gráfico 2.9. Sobrevida Relativa entre os pacientes diagnosticados em diferente estádios da doença, no período de 1998 a 2003.....	52
Gráfico 2.10. Sobrevida Relativa entre os tratamentos utilizados para o câncer de hipofaringe.	53

Capítulo 4. A infecção por HPV em Pacientes Portadores de Carcinomas de Cabeça e Pescoço

Gráfico 4.1. Protocolo de termociclagem em <i>touchdown</i> , utilizado para amplificação dos fragmentos de genoma de HPV utilizando os <i>primers</i> genéricos.	80
---	----

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. FLUXOGRAMA DE NOTIFICAÇÃO DO REGISTRO DECÂNCER DE BASE POPULACIONAL DE GOIÂNIA DA ACCG	91
ANEXO 2. DADOS BRUTOS DE IDENTIFICAÇÃO, SOCIODEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS 36 PACIENTES QUE FIZERAM PARTE DO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO EM GOIÂNIA NO PERÍODO DE 1998 A 2003.....	92
ANEXO 3. TESTE <i>LOGRANK</i>.....	96
ANEXO 4. CÁLCULO DAS SOBREVIDAS RELATIVAS PELO MÉTODO DA TÁBUA DE VIDA ATUARIAL.....	101
ANEXO 5. APLICAÇÃO DO TESTE <i>LOGRANK</i> PARA COMPARAÇÃO DAS SOBREVIDAS.....	106
ANEXO 7. QUESTIONÁRIO APLICADO AOS INDIVÍDUOS QUE FIZERAM PARTE DO ESTUDO INTERNACIONAL DO IARC.....	108
ANEXO 8. PROTOCOLO DE COLETA E COLORAÇÃO PARA ENSAIO DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA BUCAL.....	117
ANEXO 9. PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNAISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE TECIDO FRESCO.....	120
ANEXO 10. AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR.....	122
ANEXO 11. GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ELETROFORESE.....	125
ANEXO 12. PROTOCOLO PARA A PREPARAÇÃO DE LÂMINAS, PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO POR FUCSINA E FAST GREEN.....	127

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Adenina, base nitrogenada	D8S135	<i>Primer</i> utilizado como controle interno da reação
ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás	EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ACS	Sociedade Americana de Câncer (<i>American Cancer Society</i>)	EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)	et al.	Abreviatura de <i>et alii</i> que significa <i>e outros</i>
ARF	Quadro Alternativo de Leitura (<i>Alternative Reading Frame</i>)	F	<i>Primer</i> de amplificação direta (<i>Forward</i>)
Arg	Arginina, aminoácido	f(%)	Frequência percentual
BE	<i>Broken Eggs</i>	G	Guanina, base nitrogenada
BN	Binucleada	g	Grama
C	Citosina, base nitrogenada	gl	Grau de liberdade
Ca	Carcinoma	GMR	Genes do mecanismo de reparo
CC	Ciclo celular	GO	Goiás
CDK	Quinase Ciclina-Dependente	GP05/06	<i>Primers</i> genéricos para amplificação de genoma HPV
CEC	Carcinoma espinocelular	GRE	Elemento Responsivo a Glicocorticóides
CI	Coeficiente de Incidência	h	Hora
CID	Classificação Internacional de Doenças	H_a	Hipótese alternativa
CID-O	Classificação Internacional de Doenças para Oncologia	HAJ	Hospital Araújo Jorge
CL	Código Local	HCl	Ácido Clorídrico
CM	Coeficiente de Mortalidade	HeLa	Linhagem de células tumorais infectadas com HPV18
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	HGG	Hospital Geral de Goiânia
C-terminal	Extremidade Carboxi-terminal	HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
CX	Cariorréxis	HPV	Papiloma Vírus Humano (<i>Human Papilloma Virus</i>)
C-	Controle negativo da reação	HUGO	Hospital de Urgências de Goiânia
C+	Controle positivo da reação		
DNA	Ácido desoxirribonucléico		
dNTP	desoxirribonucleosídeos trifosfato		

H₀	Hipótese de nulidade ou Hipótese nula	N/A	Não Aplicável
H₂O_d	Água destilada	Na⁺	Íon Sódio
H₂O_{dd}	Água bidestilada	NaOH	Hidróxido de Sódio
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)	nm	Nanômetro
INCA/MS	Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde	nmol	Nanomol
ISSN	Número Internacional Normalizado para Publicações Seriadas (<i>International Standard Serial Number</i>)	NP	Núcleo Principal
kb	Kilo base (1kb = 1000pb)	NPR	Núcleo de Pesquisas Replicon
kDa	Kilo Dalton	N-terminal	Extremidade Amino-terminal
l	Litro	PAH	Hidrocarboneto Policíclico Aromático (<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>)
LaGene	Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular	pb	Par de bases
LCR	Longa Região de Controle (<i>Long Control Region</i>)	PBS	Solução Tampão de Fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
Ld	Marcador de tamanho ou escada alélica (<i>Ladder</i>)	PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
LPD	Localização Primária Desconhecida	pH	Potencial hidrogeniônico
LR	<i>Logrank</i>	pm	Peso molecular
M	Molar	Pro	Prolina, aminoácido
mg	Miligramas	p53Arg	Proteína p53 com aminoácido arginina no códon 72
Mg⁺²	Íon Magnésio	p53Pro	Proteína p53 com aminoácido prolina no códon 72
min	Minuto	q.s.p.	Quantidade suficiente para
mL	Mililitros	R	<i>Primer</i> de amplificação reversa (<i>Reverse</i>)
mm	Milímetros	RCBP	Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia/GO
mM	Milimolar	RNA	Ácido ribonucléico
MN	Micronúcleo	rpm	Rotação por minuto
MNc	Micronúcleo clássico	Rxt	Radioterapia
MY09/11	<i>Primers</i> genéricos para amplificação de genoma HPV	SOE	Sem Outras Especificações
		SP	São Paulo
		SR	Sobrevida Relativa
		T	Timina, base nitrogenada

TA	Temperatura Ambiente	UV	Ultravioleta
TBE	Tris-Borato de EDTA	V	Variância
TNM	Sistema de classificação por estadiamento: T umor, N ódulos linfáticos e M etástases à distância	VDS	Sistema de Vídeo Documentação
		Vol.	Volume
UCG	Universidade Católica de Goiás	χ^2	Qui-quadrado
UFG	Universidade Federal de Goiás	μg	Micrograma
UICC	União Internacional Contra o Câncer (<i>International Union Against Cancer</i>)	μL	Microlitro
		μmol	Micromol
URR	Região Regulatória a Montante (<i>Upstream Regulatory Region</i>)	%CG	Porcentagem de bases citosina e citosina

RESUMO

A hipofaringe, região inferior da faringe, também chamada de laringofaringe ou faringolaríngea, serve aos sistemas respiratório e digestivo, funcionando como passagem para o ar e os alimentos. É composta de tecido epitelial escamoso estratificado não-queratinizado, com grande quantidade de glândulas seromucosas. As estatísticas mostram que entre 85 e 90% dos cânceres que acometem a hipofaringe são carcinomas espinocelulares. A lesão inicial no seio piriforme apresenta-se macroscopicamente sob o aspecto de um nódulo ou úlcera, tendo como característica principal, a rápida disseminação pela submucosa. Atualmente, com a associação de cirurgias radicais e radioterapia pós-operatória aumentou-se o controle locorregional destes tumores, contudo, a sobrevida global não sofreu alterações em decorrência das metástases à distância, o que não representa uma falha no tratamento realizado e sim uma evolução natural devido à característica invasiva desse tipo de neoplasia. Os tumores malignos de hipofaringe não são freqüentes, representando entre 5 a 10% das neoplasias das vias aerodigestivas superiores e apenas 0,5 % de todos os cânceres. Porém, do conjunto das neoplasias malignas da região da cabeça e pescoço, tumores de hipofaringe apresentam o pior prognóstico. A avaliação das tendências epidemiológicas apresentadas pelo câncer de hipofaringe em Goiânia no período de 1998 a 2003, analisando os dados disponíveis pelo Registro de Câncer de Base Populacional da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, mostrou uma sobrevida relativa dos pacientes do sexo masculino diagnosticados com câncer de hipofaringe foi de 38% após 60 meses de seguimento, enquanto que para o feminino apresentou-se uma sobrevida máxima de 100%, com todas as pacientes curadas. Dentre os tratamentos realizados, a cirurgia apresentou a menor taxa de sobrevida (34%) ao passo que para a quimioterapia foi associada uma sobrevida de 54%. A sobrevida dos pacientes tabagistas (43%) se mostrou muito inferior à dos indivíduos que não eram tabagistas (60%). Em fim, ao longo de cinco anos de seguimento deste estudo, a taxa de sobrevida relativa para portadores de tumores malignos da hipofaringe foi de aproximadamente 38%, estimada para cinco anos com uma censura de apenas 5%. A taxa de sobrevida relativa é diminuída uma vez que cerca de 45% dos casos, o diagnóstico é feito tardiamente. O presente estudo também avaliou as alterações citogenéticas nucleares de pacientes portadores de câncer na região da hipofaringe. Foram analisados 36 indivíduos do grupo de casos, constituído de pacientes diagnosticados com tumores de hipofaringe, e 36 indivíduos saudáveis do grupo controle. Para obtenção dos dados foram considerados hábitos de consumo como tabagismo e etilismo e principalmente o tempo de exposição. Foram contadas 5000 células por indivíduo e as freqüências de micronúcleo, binucleadas, *broken eggs* e demais aberrações nucleares, foram calculadas para ambos os grupos. A freqüência de micronúcleo mostrada entre o grupo controle e o de casos não apresentaram diferença estatística. Porém, foi observado, por parte do grupo de casos, um grande número de células com *broken eggs* e binucleadas. Tais resultados demonstraram diferença estatística ($p = 0,03$). A binucleação e a formação de dois núcleos em forma de *broken egg* sugere que agentes como o tabaco e o alcoolismo crônico podem estar relacionados com a indução e progressão de tumores em pessoas susceptíveis, devido à capacidade desses mutágenos afetarem o ciclo celular. Dentre os fatores que geram controvérsias, podemos destacar o achado freqüente de variados tipos de HPV em mucosa oral normal, numa incidência que varia de 0% a quase 100% em diversos estudos, com numerosos métodos de identificação, incluindo entre eles um método altamente sensível, a PCR. A importância da infecção pelo HPV na carcinogênese de células epiteliais é suportada pela capacidade dos HPVs de alto risco, principalmente os tipos 16 e 18, de imortalizar os queratinócitos orais, quando em análise *in vitro*. O processo de imortalização pode envolver a desativação de proteínas supressoras de tumores pré-formadas pelas oncoproteínas virais, o bloqueio da transcrição de genes supressores de tumores como resultado da inserção do oncogene do HPV, ou a estimulação da transcrição do oncogene celular pela inserção de seqüências ativadoras de transcrição derivadas do próprio genoma do HPV. No presente estudo, o grupo amostral foi constituído de 24 pacientes diagnosticados com carcinoma de hipofaringe. Os casos foram obtidos do Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia/GO da Associação de Combate ao Câncer em Goiás. Todos os pacientes considerados foram diagnosticados como carcinomas de hipofaringe (CID-O: C12.0 a C13.9). Todas as amostras foram submetidas a uma PCR com os *primers* genéricos MY09/11 e GP05/06 para detecção em amplo espectro do genoma de HPV. Posteriormente, utilizou-se a mesma abordagem, com os *primers* tipo-específico para HPVs 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45 e 58. Em 9 das 24 amostras utilizadas, foi observada amplificação com os *primers* genéricos, identificando-se o genoma de HPV em 37,5% (6/24) dos casos. Em 67% (6/9) das amostras, o genoma viral foi detectado por MY09/11 e em 33% (3/9) pelos *primers* GP05/06. As amostras positivas foram então submetidas a uma segunda PCR para a genotipagem dos HPVs, tendo sido observados os tipos 16, 18 e 45. Os tipos virais mais associados ao câncer da hipofaringe, no presente estudo, foram os HPV 16 e 18, presente em 6 amostras e o HPV45, encontrado em 1 amostra. Em um paciente foi observada a co-infecção de tipos virais de HPVs 16 e 18. Contudo, mesmo diante de tantas pesquisas realizadas, há muito para ser explorado, apesar de uma hipótese possível para a carcinogênese ser a interação sinérgica de carcinógenos químicos, virais, oncogenes e genes supressores de tumores.

Palavras-chave: câncer de hipofaringe, epidemiologia, citogenética, HPV, genotipagem molecular.

ABSTRACT

Hypo pharynx is the under region of pharynx and serves both respiratory and digestive tract, acting as a passageway to air and food. It's composed by squamous nonkeratinized epithelial tissue. Statistical studies indicates that 85 to 90% of neoplasies rush pyriform sinus and are characterized by fast dissemination and metastization. Epidemiological trends of hypo pharynx cancer in Goiania on period 1998 to 2003 analyzing data derived from Cancer Registry of Association for Cancer Combat of Goias, shows that the relative survival rate for men diagnosed with hypo pharynx cancer was 38% past 60 months while women presented a survival rate of 100%. Surgery was the treatments that present fewer rates (34%) and chemotherapy was associated to the most survival rate (54%). Patients that use tobacco presented a survival rate of 43% while non-tabagists present a rate of 60% of surviving. Relative survival rate for patients diagnosed with hypo pharynx tumor was 38% and estimated censure for 5 years was just 5%. Survival rate was extremely decreased due to 45% of cases were diagnosed in advanced stages of disease. It is important to point out that preventive campaign is important to evade the increasing of these pathologies that are related to behavior of tabagism and etilism. Present study also evaluates cytogenetically individuals diagnosed with hypo pharynx cancer. Cytogenetic analysis of exfoliated cells is largely used to evaluate cytotoxic and genotoxic alterations on people exposed to potentially mutagens. A number of 36 individuals were analyzed, representing case group, and 36 healthy individuals composed control group. Data was collected and analysis was performed to estimate main nuclear alterations. Standard protocols were adopted to collect and counting cells. Micronuclei test was used to determinate the frequency of cytotoxic and genotoxic alterations. Besides than micronuclei others alterations like broken-eggs, binucleated cells and piknotic nuclei are good markers of cell alterations because they are resulted from cytotoxic events frequently related to occupational exposure. Behaviors like tabagism, etilism and exposition time were also investigated to correlate cells alterations. The correlation between micronuclei frequencies of case and control group test doesn't show statistic difference. Broken egg and binucleated cells were the most observed anomalies on case group and showed up significant statistic difference ($p=0.03$). Results indicates a high grade of cytotoxic anomalies on individuals with hypo pharynx cancer, specially in tabagists and chronic etilists individuals, behaviors that are correlated to induct and promote tumors in susceptible people due their capabilities to affect cell cycle. Studies about relationship between Human Papillomavirus (HPV) and cancer development are performed since 80's. Although the correlation of HPV and cervical cancer are well established, the possible role of HPV and head and neck cancer are still unclear. Among controversial factors of HPV and carcinogenesis of squamous epithelial cells, there is a viral incidence that oscillates from 0 to almost 100% on studies that includes a myriad of viral genome detect methods, such Blotting and PCR. Importance of HPV infection and epithelial carcinogenesis is related to capabilities of High risk HPV 16 and 18 to promote cell alterations, by tumor suppressor proteins inactivation, tumor suppressor genes blockage and insertions of HPV oncogenes. On present study, HPV detection and typing was performed on tumors derived from hypo pharynx of 24 patients diagnosed with cancer (CID-O: C12,0 to C13,9). All samples was submitted to PCR with generic primers MY09/11 and GP05/06, as specific primers to HPV 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45 and 58. Results shows that on 9 of 24 samples, HPV were detected by generic primers (a rate of 37,5%) and HPV types 16, 18 and 45 were identified, with a sample presenting coinfection of HPV 16 and 18.

Key Words: *Hypo pharynx cancer, epidemiology, cytogenetics, HPV, molecular genotyping.*

INTRODUÇÃO GERAL

A hipofaringe, região inferior da faringe, também chamada de laringofaringe ou faringolaríngea, é um órgão de grande importância para a fisiologia do organismo, pois serve aos sistemas respiratório e digestivo, funcionando como passagem para o ar e os alimentos. É composta de tecido epitelial escamoso estratificado não-queratinizado, com grande quantidade de glândulas seromucosas. As estatísticas mostram que entre 85 e 90% dos cânceres que acometem a hipofaringe são carcinomas espino-celulares.

Muitos fatores de risco estão ligados direta ou indiretamente ao aparecimento do câncer da hipofaringe. Os principais fatores de risco são o tabagismo, o etilismo e os aspectos genéticos. Assim, a exposição a fatores ambientais associados à predisposição genética potencializa o aparecimento dos carcinomas de hipofaringe.

A proposta inicial desta dissertação foi submetida à apreciação do Comitê de Ética da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), recebendo o seu aval, em meados de 2000. Adicionalmente, todos os hospitais participantes fizeram a sua avaliação interna e autorizaram a coleta de material biológico e entrevistas em suas dependências. Para a participação de casos e controles, cada indivíduo assinou um termo de consentimento informado. Toda a documentação, referente a autorizações, está arquivada no Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia/GO (RCBP) da ACCG, e poderá ser disponibilizada sob pedido formal dos avaliadores.

A presente dissertação de mestrado trata-se de um estudo sobre o câncer da hipofaringe, podendo ser dividida em quatro abordagens: (1) revisão bibliográfica, (2) análise epidemiológica, (3) avaliação citogenética e, finalmente, (4) investigação molecular de amostras de pacientes com carcinoma laríngeo.

Neste contexto, esta dissertação foi dividida em quatro capítulos, onde os dois primeiros servem como fundamentação teórica para todo o trabalho. O **Capítulo 1** aborda a anatomia, fisiologia e histologia da hipofaringe e os aspectos relacionados ao câncer, como por exemplo: manifestações clínicas, fatores de risco, avaliação diagnóstica, estadiamento, entre outros.

O **Capítulo 2** é o resultado de um estudo epidemiológico realizado com os dados do RBPC de Goiânia/GO da ACCG. Neste estudo, foram calculados os coeficientes brutos de incidência e mortalidade para o câncer de hipofaringe, e as sobrevidas relativas associadas a vários aspectos, como: hábitos de vida, modalidade de tratamento, idade, sexo. O conteúdo do

segundo capítulo foi apresentado, entre 2004 e 2005, sob a forma de pôsteres em vários Congressos Nacionais e Regionais.

O **Capítulo 3** utiliza uma abordagem citogenética para avaliação comparativa da exposição a agentes genotóxicos entre os grupo de pacientes com câncer da hipofaringe e o controle, utilizando-se o teste do micronúcleo como ferramenta de investigação. Os resultados provenientes deste estudo foram apresentados, em 2006, sob forma de pôster e o resumo publicado nos anais (CD-ROM - ISSN: 1415-4757) do 52º Congresso Nacional de Genética, sob o título, *Análise citogenética da mucosa oral de pacientes com tumores de hipofaringe em Goiânia*.

Por fim, no **Capítulo 4** são utilizadas ferramentas moleculares para a detecção e tipagem de HPV na investigação de seu possível papel como agente etiológico da patologia maligna do câncer de hipofaringe. Parte deste estudo foi publicada, como resumo, em 2006 no 52º Congresso Nacional de Genética, sob o título, *Polimorfismo Genético de p53 em Tumor da Hipofaringe..*

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Desenvolver um estudo epidemiológico com intuito de compreender melhor o comportamento e a dinâmica do câncer da hipofaringe em Goiânia/GO. Estabelecer um perfil de danos citogenéticos e a prevalência do HPV, potencialmente associados ao desenvolvimento de câncer de hipofaringe.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar as tendências epidemiológicas referentes aos tumores de hipofaringe na população de Goiânia no período de 1998 a 2003;
2. Calcular os coeficientes brutos de incidência e mortalidade e as sobrevidas: geral, associada ao sexo, hábitos de vida, estadiamento e modalidade de tratamento;
3. Determinar a frequência de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa oral em pacientes com câncer de hipofaringe e seus respectivos controles;
4. Determinar a frequência e distribuição dos tipos de HPV associados ao tecido tumoral retirados de portadores de câncer de hipofaringe;
5. Conclusão do Programa de Mestrado em Biologia, com área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

CAPÍTULO 1. O CÂNCER DE HIPOFARINGE

Resumo

Dentre todas as patologias, o câncer é, sem dúvida, uma das que mais tem assustado a Humanidade. O termo *câncer* tem origem no latim e que dizer caranguejo. Conceitualmente, as neoplasias malignas, ou câncer, se caracterizam por uma proliferação anormal e desordenada de um determinado tecido, que passa a agir de forma autônoma e anárquica, descontroladamente. Tanta autonomia celular se deve, basicamente, às alterações genéticas provocadas em seus genomas. Estudos indicam que o processo de tumorigênese humana é um processo complexo de múltiplos eventos e, freqüentemente, relacionado à idade. Os múltiplos mecanismos envolvidos na carcinogênese ainda carecem de uma maior elucidação e, portanto, requerem uma contínua investigação acerca da biologia e fisiologia molecular da célula. Exposições ocupacionais, tabagismo, ingestão de álcool, hábitos alimentares e microrganismos parecem influir na incidência de aberrações cromossômicas, neoplasias e câncer. A hipofaringe, região inferior da faringe, também chamada de laringofaringe ou faringolaríngea, serve aos sistemas respiratório e digestivo, funcionando como passagem para o ar e os alimentos. É composta de tecido epitelial escamoso estratificado não-queratinizado, com grande quantidade de glândulas seromucosas. As estatísticas mostram que entre 85 e 90% dos cânceres que acometem a hipofaringe são carcinomas espino-celulares. A lesão inicial no seio piriforme apresenta-se macroscopicamente sob o aspecto de um nódulo ou úlcera, tendo como característica principal, a rápida disseminação pela submucosa. Atualmente, com a associação de cirurgias radicais e radioterapia pós-operatória aumentou-se o controle locorregional destes tumores, contudo, a sobrevida global não sofreu alterações em decorrência das metástases à distância, o que não representa uma falha no tratamento realizado e sim uma evolução natural devido à característica invasiva desse tipo de neoplasia. Porém, o diagnóstico continua sendo feito tardiamente, o que torna importante intensificar as campanhas de prevenção e diagnóstico com o objetivo de aumentar a sobrevida do paciente, otimizando o tratamento e melhorando o prognóstico.

Palavras-chave: Hipofaringe, câncer, seio piriforme, carcinomas espino-celulares, carcinógenos.

Abstract

Cancer is a pathology that mostly frightens the humanity. The name cancer is derived from Latin and means crab. Maligns neoplasies are characterized by an abnormal and confused proliferation of cells that become anarchic and self-governed. The autonomy of neoplastic cells is therefrom genetic alterations presents in their genomes. Studies indicates that tumorigenesis is a complex and multistep process, frequently related to age and behavior. Mechanisms related to cancer development are still unclear, but is notorious that individual exposure to mutagens and behaviors like tabagism and chronic etilism, as thus microorganisms, stimulate chromosomal aberrations, neoplasies and cancer. Hypo pharynx is the under region of pharynx and serves both respiratory and digestive tract, acting as a passageway to air and food. It's composed by squamous nonkeratinized epithelial tissue. Statistical studies indicates that 85 to 90% of neoplasies rush pyriform sinus and are characterized by fast dissemination and metastization. Those studies also reveals that diagnosis of individuals with hypo pharynx cancer are still late that contribute to bad prognostic and low survival rate. Hence intensification of preventive and educative campaigns about head and neck cancer are extremely important.

Keywords: Hypo pharynx cancer, neoplasies, tabagism, etilism, low survival rate.

1.0 INTRODUÇÃO

Dentre todas as patologias, o câncer é, sem dúvida, uma das que mais tem assustado a Humanidade. Relatado por Hipócrates há séculos e muito presente nos dias atuais, o câncer se mostra uma patologia rodeada de tabus e crenças, que norteiam não somente a população leiga, mas também muitos profissionais da área de saúde, que se encontram, muitas vezes, atados e confusos diante de um possível diagnóstico de tumor (Baracat *et al.* 2000).

O termo *câncer* tem origem no latim e que dizer caranguejo. O desenvolvimento das neoplasias malignas e suas características infiltrativas, se assemelhando às patas de um caranguejo, tornam a forma deste animal como símbolo de tais patologias, principalmente às malignas (Hill, 2002).

Conceitualmente, as neoplasias malignas, ou câncer, se caracterizam por uma proliferação anormal e desordenada de um determinado tecido, que passa a agir de forma autônoma e anárquica, descontroladamente. Tanta autonomia celular se deve, basicamente, às alterações genéticas provocadas em seus genomas (Fernandes Júnior, 2000).

Sabe-se que o aparecimento do câncer está intimamente relacionado às mutações em células somáticas. Assim, em si, o câncer não é resultado de uma única mutação, mas do acúmulo de desarranjos genéticos, permanentemente fixados no genoma celular, através do tempo. Estudos indicam que o processo de tumorigênese humana é um processo complexo de múltiplos eventos e, frequentemente, relacionado à idade. Os múltiplos mecanismos envolvidos na carcinogênese ainda carecem de uma maior elucidação e, portanto, requerem uma contínua investigação acerca da biologia e fisiologia molecular da célula. Os avanços recentes nos estudos sobre a evolução tumoral têm contribuído para uma classificação distintiva do tumor e uma melhor caracterização de estimativa dos riscos associados à doença e o seu tratamento mais efetivo (Hanahan & Weinberg, 2000).

O termo *tumor* significa uma *elevação* do tecido, o que pode ser encontrado em processos inflamatórios, infecciosos entre outros, sem contar, diretamente, com a proliferação tecidual, mas é, usualmente, utilizado como sinônimo das neoplasias, sem, contudo, deixar claro o seu comportamento quanto à malignidade ou não. Neoplasia (*Neo-novo/plasia-tecido*), por sua vez, é o termo utilizado mais corretamente para designar a proliferação tecidual, que deve vir sempre acompanhada como benigna ou maligna, para expressar mais profundamente, o comportamento biológico de tais lesões (Baracat *et al.* 2000).

Classicamente, as *neoplasias benignas*, como o próprio nome diz, não apresentam grandes riscos à saúde de seus portadores. São caracterizadas por um crescimento lento e

ordenado, sem potencial invasivo ou migratório. De forma macroscópica, são tumores bem delimitados e homogêneos, de bordas lisas e envoltos por um tecido conjuntivo fibroso, denominado pseudocápsula. O crescimento ordenado faz com que o mesmo possa possuir um estroma de sustentação com vasos sanguíneos, semelhantes a um tecido normal. Histologicamente, as neoplasias benignas são formadas por células muito semelhantes ao tecido de qual se originaram. Estudos mostram que essa semelhança acontece, inclusive, na genética das células neoplásicas, quando comparadas com as células originais do tecido de qual provieram. As mitoses também obedecem a um padrão ordenado e regular e a invasão tecidual não ocorre, devido ao seu potencial de metastização ser, praticamente, nulo (Tannock & Hill, 1998).

Já as *neoplasias malignas*, antagonicamente às benignas, são formadas por células geneticamente alteradas e instáveis. Essas alterações, inicialmente restritas a única célula, na maioria das vezes, gera toda uma população de células alteradas. As células neoplásicas malignas costumam apresentar um crescimento mitótico duas ou mais vezes mais rápido que as células de tecido normal, isto faz com que o percentual de células em mitose seja maior que o número de células perdidas normalmente por morte ou lesão, causando o crescimento da tumoração. Esse furor de crescimento mitótico se traduz em células morfológicamente alteradas (anaplásicas), se avolumando e se espremendo, causando a perda do controle tecidual tipo célula-célula e não oferecendo tempo hábil para a formação da pseudocápsula, nem mesmo de um tecido de sustentação eficiente. O crescimento desordenado também impede uma perfeita angiogênese, formação de vasos sanguíneos, que se apresentam em quantidade insuficiente para suprir o tecido neoplásico, com oxigênio e nutrientes, causando constantes infartos e necroses (Baracat *et al.* 2000; Tannock & Hill, 1998).

A capacidade de invasão das neoplasias malignas faz com tecidos vizinhos sejam invadidos, inclusive com a embolização neoplásica dos vasos sanguíneos peritumorais. Mecanismos de interação entre as células neoplásicas e o endotélio vascular, propiciam o aparecimento dessas células em órgãos à distância do tumor primário, processo denominado metastização, que, na maioria das vezes, causam o óbito do hospedeiro (DeVITA Jr *et al.* 1997).

1.1 Neoplasias, nomenclatura e subdivisões

Quanto à nomenclatura, as neoplasias benignas são facilmente identificadas, baseando-se no tecido de qual se originam. Se forem provenientes de um tecido mesenquimal – como o tecido ósseo, o cartilaginoso, etc – são denominadas com a utilização do prefixo

correspondente ao tipo de tecido e mais o sufixo *-oma*, portanto osteoma, condroma e assim por diante. Se a mesma foi originada de tecidos de revestimentos epiteliais, podem ser nomeadas diretamente de acordo com a células que a as originaram, ou então, baseadas na morfologia das mesmas, como adenomas, cistoadenomas, papilomas, adenomas papilíferos, etc. Os linfomas e melanomas são exceções a esta regra, pois embora sejam neoplasias de comportamento maligno, são assim chamadas devido sua nomenclatura já se apresentar consagrada pelo uso (Tannock & Hill, 1998).

A forma de se nomear as neoplasias malignas obedece à origem embrionária do tecido. Os tecidos originários do folheto mesodérmico são acrescidos do sufixo *-sarcoma*, provavelmente por seu aspecto carnosos e com pouquíssimo tecido estromal de sustentação. O aspecto macroscópico lembra muito *carne de peixe* por sua friabilidade. Temos por exemplo as neoplasias malignas derivadas de células de gordura, os lipossarcomas; neoplasias malignas de tecido muscular liso, os leiomiossarcomas, e assim por diante. O folheto ectodérmico origina os tecidos de revestimento externo e o sistema nervoso central, assim como o folheto endodérmico, o tecido de revestimento interno do organismo. Dessa forma, neoplasias derivadas de tais folhetos são chamadas de carcinomas. Por exemplo, adenocarcinomas (*adenos*: glândula) carcinoma espinocelular (*espinos*: epitélio estratificado) [Baracat *et al.* 2000; Tannock & Hill, 1998].

Normalmente, os carcinomas são acompanhados pela designação dos órgãos de origem, como por exemplo adenocarcinoma do cólon, carcinoma espinocelular do colo do útero, carcinoma de células transicionais da bexiga, carcinoma espinocelular de hipofaringe, etc. Quanto às neoplasias malignas cerebrais, estas recebem nomenclatura própria, muitas vezes acompanhada por sufixo *-oma*, como os astrocitomas, ependinomas, gliomas, e geralmente acompanhadas pelo grau de diferenciação celular, como nos astrocitomas de baixo grau, astrocitoma anaplásico, etc. Os tumores pediátricos originários de células blásticas, recebem o sufixo *-blastoma* (neuroblastoma, nefronblastoma, etc). Existem ainda, como em toda área biomédica, a presença de nomes próprios, consagrados pelo uso, freqüentemente utilizados como homenagem àquele que a observou inicialmente, geralmente um patologista. Temos dessa forma, como por exemplo, os Sarcoma de *Kaposi*, Tumor de *Askin*, Linfoma de *Hodgkin* (Fernandes Júnior, 2000; DeVITA Jr et al. 1997).

1.2 Carcinogênese

A partir da década de 70, muitos trabalhos no campo da genética vieram mostrar o que realmente acontece na intimidade do núcleo de uma célula normal e de uma célula neoplásica.

Genes que regulam a proliferação celular e o desenvolvimento das células normais (protoncogenes) começaram a ser identificados e catalogados. Hoje, muitos deles já estão fortemente relacionados à gênese de muitas neoplasias (SHERR, 1996).

Muitos modelos foram propostos para tentar explicar os primeiros passos as carcinogênese. O modelo da iniciação/promoção é o que mais têm se mostrado mais confiável. Nele, uma única célula, ou raramente mais, em meio a um tecido aparentemente normal, sofre um determinado estímulo e sofre certas alterações genotípicas. De acordo com muitos estudos, é a iniciação a primeira etapa deste processo. A alteração inicial pode comprometer os mecanismos reguladores do crescimento e desenvolvimento celular, ou seja, os próprios protoncogenes. Em uma segunda rodada de alterações, têm-se então a promoção oncogênica, onde uma determinada célula, já alterada, passa a se multiplicar, expressando em suas células-filha alterações fenotípicas provenientes da alteração genotípica inicial. Estas células passam então a apresentar autonomia, se multiplicando e formando uma série de clones alterados. Estes clones passam então a se reproduzirem, podendo alguns apresentar potencial de invasão tecidual e metastização. Esta fase, sistêmica em relação às iniciais, recebe o nome de progressão (Zur Hausen, 1999).

Atualmente, sabe-se também que, grande parte das neoplasias, resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais, sendo a contribuição exclusivamente genética responsável por apenas 5% de todos os tumores e o restante pode ser atribuída a fatores ambientais que atuam em conjunto com a suscetibilidade genética. Estima-se que mais de 80% das neoplasias malignas tenham origem através de estímulos ambientais. Dentre estes estímulos, podemos destacar a exposição aos carcinógenos químicos, representando a grande maioria; carcinógenos físicos e vírus causadores de câncer, como o caso do HPV, o papiloma vírus humano (Rossit & Froes, 2000; Zur Hausen, 1999).

1.3 Carcinógenos e Fatores de risco

Exposições ocupacionais, tabagismo, ingestão de álcool, hábitos dietéticos e microrganismos parecem influir na incidência de aberrações cromossômicas, neoplasias e câncer (Barale *et al.*, 1998; Gonsebatt *et al.*, 1997; Hagmar *et al.*, 1994). Sendo que os fatores de risco mais envolvidos na etiologia do câncer são o fumo e o consumo excessivo de álcool (Ziegler, 1986).

Existem evidências substanciais de que os carcinomas de células escamosas (CEC) são etiologicamente relacionados com o uso de tabaco, de betel ou com o consumo excessivo de álcool ou destilados. Porém, alguns pacientes desenvolvem CEC mesmo sem terem hábitos de

fumo ou etilismo, ou predisposição genética ao câncer. Há aproximadamente duas décadas, foram descobertas as primeiras evidências de que agentes infecciosos poderiam também ser agentes etiológicos para o câncer. Estudos evidenciaram a presença de genoma viral em associação com CEC, sugerindo um possível envolvimento viral no desenvolvimento de determinados cânceres, principalmente dos carcinomas ano-genitais e de cabeça e pescoço (Zur Hausen, 1999).

1.3.1 Carcinógenos químicos

Os carcinógenos químicos podem agir como agentes iniciadores, promotores ou ambos, dependendo das propriedades químicas de cada um ou de seus metabólitos, assim como o seu mecanismo de lesão celular. Existe a necessidade de se salientar que a fase de iniciação é conhecida por sua irreversibilidade, enquanto a subsequente fase de promoção pode se reverter ou não. Temos como exemplos de carcinógenos químicos os nitritos, benzopirenos, aflotoxina B1, benzeno, asbestos, nitrosoaminas, medicamentos (muitos quimioterápicos e hormônios), além do fumo ou tabaco e do álcool etílico, quando utilizado cronicamente (Gonsebatt, 1997; Fedman, 1993).

1.3.1.1 Tabagismo

A fumaça do cigarro é uma mistura complexa composta de mais de 4000 substâncias, das quais, pelo menos, 150 são os principais componentes que podem formar adutos com o material genético (Bosso *et al*, 2002).

Existem dois tipos de tabagismo, o ativo e o passivo. Sendo que o ativo é caracterizado pelo uso direto de derivados do tabaco. Já o passivo é decorrente da inalação involuntária da poluição decorrente da fumaça dos derivados do tabaco, por indivíduos não fumantes que convivem com fumantes (INCA/MS, 2003 A).

A fumaça inalada pelo fumante passivo contém três vezes mais nicotina e monóxido de carbono, além de cinquenta vezes mais substâncias cancerígenas do que a fumaça que entra pela boca do fumante depois de passar pelo filtro do cigarro. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o tabagismo passivo é a terceira maior causa de morte evitável do mundo, subsequente ao tabagismo ativo e ao consumo excessivo de álcool (INCA/MS, 2004 A).

Os efeitos mutagênicos resultantes do uso de tabaco apresentam resultados contraditórios. Embora alguns autores tenham observado aumento na frequência de aberrações cromossômicas estruturais em fumantes, resultados negativos também foram documentados (Au *et al.*, 1998; Perera *et al.*, 1987; Reuterwall, 1990). A técnica de

citogenética com hibridização (*in situ Hybridization*), vem se mostrando útil na detecção de aberrações cromossômicas que ocorrem em baixa frequência. Por meio dessa técnica de citogenética molecular observou-se aumento significativo na frequência de translocações cromossômicas em fumantes (Conforti-Froes *et al.*, 1998; Van Diemen *et al.*, 1995).

1.3.1.2 Etilismo

O consumo crônico de bebidas alcoólicas tem sido relacionado a diferentes tipos de câncer (Jensen *et al.*, 1996) e com o aumento, estatisticamente significante, na frequência de linfócitos com aberrações cromossômicas numéricas e estruturais (Obe & Anderson, 1987). Isso ocorre mesmo após longos períodos de abstinência sugerindo uma ação do álcool na capacidade de reparo celular e nas funções oxidativas da célula (Gattás & Saldanha, 1997; Matshina, 1987).

O alcoolismo é um dos mais bem estabelecidos fatores etiológicos do câncer da faringe e da laringe. O consumo deste pode causar problemas agudos e crônicos, distúrbios psicossociais, doença hepática crônica, neuropatias periférica ou central, distúrbios da coagulação, síndrome de abstinência, que inclui tremores, distúrbios visuais, taquicardia, ansiedade e agitação. Sendo assim é importante uma avaliação cuidadosa dos itens referidos e da possibilidade do afastamento do paciente do álcool impedindo um pós-operatório tumultuado e a trágica cumplicidade da infusão alcoólica parenteral ou enteral que, sem dúvida, favorece à formação de fístulas nos pacientes submetidos às cirurgias na faringe, na laringe e na hipofaringe (Brandão & Ferraz, 1989 v. 1).

1.3.2 Carcinógenos físicos

Os carcinógenos físicos são mais bem representados pelas radiações, que agem como iniciadoras do processo neoplásico, por causarem lesão direta no DNA da célula exposta. A medula óssea é o maior alvo dos efeitos deletérios das radiações, acompanhado pela tireóide. A exposição aguda ou contínua à radiação pode provocar leucemias, linfomas e neoplasia maligna da tireóide, entre outras patologias. A exposição à radiação solar, além de provocar queimaduras na pele, pode provocar alterações pré-neoplásicas e neoplásicas na mesma, principalmente pela ação dos raios UVB (Baracat *et al.*, 2000; Hirvonem, 1995).

1.3.3 Carcinógenos virais e o Papiloma vírus Humano (HPV)

Acredita-se que os carcinógenos virais são responsáveis por cerca de 25% das neoplasias malignas humanas induzidas por fatores ambientais. Tais vírus produzem

rotineiramente quadros infecciosos, mas também podem levar a um processo de iniciação de uma ou de toda uma população de células em um determinado tecido. Indiretamente, podem produzir a supressão de mecanismos de defesa imunológica contra tumores, como no caso, provável, do HIV. Está claro para a medicina que a maior incidência de alguns tipos de linfoma, sarcoma de Kaposi e lesões malignas de canal anal em portadores desse vírus (Zur Hausen, 1999).

Por outro lado, de forma direta, os vírus podem produzir alterações no genoma celular, desencadeando de forma complexa o processo neoplásico. Alguns exemplos são o HTLV-1, causador de alguns tipos de leucemia; o vírus Epstein-Barr (EBV), envolvido com o aparecimento de alguns tipos de linfoma e carcinoma de nasofaringe em algumas regiões da Ásia e África Central; os vírus da hepatite B e C (HBV e HCV) com o aparecimento de tumores benignos no fígado, os hepatomas, assim como tumores malignos do parênquima hepático, hepatocarcinomas, em países pouco desenvolvidos e populosos; e o papilomavírus humano, o HPV, causadores de carcinomas do colo do útero, períneo, ânus, pênis, boca, glote, laringe, e regiões da faringe (Lindel *et al*, 2001; Zur Hausen, 1999; Bosch & Munoz, 1989).

A infecção por HPV resulta em hiperplasia, papilomatose e lesões verrucosas em células escamosas que podem evoluir para tumores primários benignos, autolimitados. Existem aproximadamente 160 tipos conhecidos de HPV, alguns deles, porém, são conhecidos como de alto risco oncogênico, incluindo os HPVs 16, 18, 33 e 52, que induzem lesões com elevado risco de progressão ao Carcinoma Cervical (Scully, 2002; de Villiers, 1994). Adicionalmente, estudos recentes apontam especificamente a relação entre a infecção por HPV de alto risco e o desenvolvimento de câncer cervical (Deluca *et al*, 2004).

A prevalência de HPV apresenta um papel central na etiologia dos cânceres cervicais. Estudos epidemiológicos apresentam as infecções por HPV como os fatores de maior risco de desenvolvimento dos carcinomas de cérvix uterina, de regiões anal, perianal, vulvar e de pênis (Sonoda *et al*, 2003). Evidências recentes demonstraram conexões entre a infecção viral por HPV de alto risco e o desenvolvimento de determinados subgrupos de carcinomas de cabeça e pescoço, particularmente de laringe e orofaringe (Lindel *et al*, 2001).

Os HPVs são pequenos vírus de DNA circular, dupla fita, pertencentes à família Papoviridae que infectam células de pele e mucosas (Lindel *et al*, 2001). O genoma do HPV está organizado em três segmentos gerais de diferentes tamanhos. Uma região longa de controle, uma região de expressão precoce E (do inglês, *early*) e a região de expressão tardia L (do inglês, *late*). A oncoproteína viral E6 pode formar um complexo com a proteína supressora de tumor humana P53, levando à degradação de P53 e a supressão dos pontos de

checagem da fase G1/S mesmo em células com dano em seu DNA. Por sua capacidade de manipular reguladores transcricionais, a proteína E2 do vírus permite a transcrição e replicação do genoma viral a despropósito da integridade do genoma do hospedeiro. Isso leva a alterações na expressão de genes vitais e ao estado mutado da célula. Vários autores tem relacionado a questão de existência de HPV em tumores de cabeça e pescoço e sua relevância prognóstica (Scheffner *et al*, 1998 apud Lindel *et al*, 2001).

A infecção persistente por papilomavírus humano (HPV) de alto risco tem sido associada ao carcinoma cervical. Uma fase obrigatória no desenvolvimento deste câncer é a integração do DNA viral ao DNA das células hospedeiras. A integração viral promove a degradação do gene E2 do papilomavírus humano e leva a um aumento descontrolado das proteínas E6 e E7. Estas proteínas virais, de HPVs oncogênicos, inativam os produtos dos genes supressores de tumor p53 e Rb. Inativação da proteína p53 é o resultado de vários fatores incluindo mutação no gene para p53 (Oliveira *et al*, 2004).

2.0 ASPECTOS GERAIS DA HIPOFARINGE

2.1 Anatomia

A faringe serve aos sistemas respiratório e digestivo, funcionando como passagem para o ar e os alimentos. Comunica-se anteriormente com as cavidades nasal, oral e com a laringe. Por isso, está dividida em nasofaringe, orofaringe e laringofaringe (Figura 1.1). Abaixo da abertura que dá na laringe, a faringe é tubular; continua-se com o esôfago, inferiormente (Ross, 1993; Dângelo & Fattini, 2002).

A hipofaringe, região inferior da faringe, também chamada de laringofaringe ou faringolaríngica, estende-se da epiglote ao nível do osso hióide até o esôfago, ao nível da borda inferior da cartilagem cricóide, delimitada no seu interior pelas pregas, faringoepiglóticas (acima) e cricofaríngica, na transição com o esôfago. A parede anterior consiste na parte posterior das cartilagens aritenóide e cricóide. O recesso epiglótico (da mucosa) conecta a epiglote à cartilagem aritenóide, constituindo o limite lateral da hipofaringe. Lateral à cartilagem aritenóide há uma “fossa”, o seio piriforme.

O seio piriforme, também conhecido como recesso ou goteira faringolaríngica, é constituída por uma invaginação da mucosa da hipofaringe (Camargo & Ferreira, 1989 v. 1).

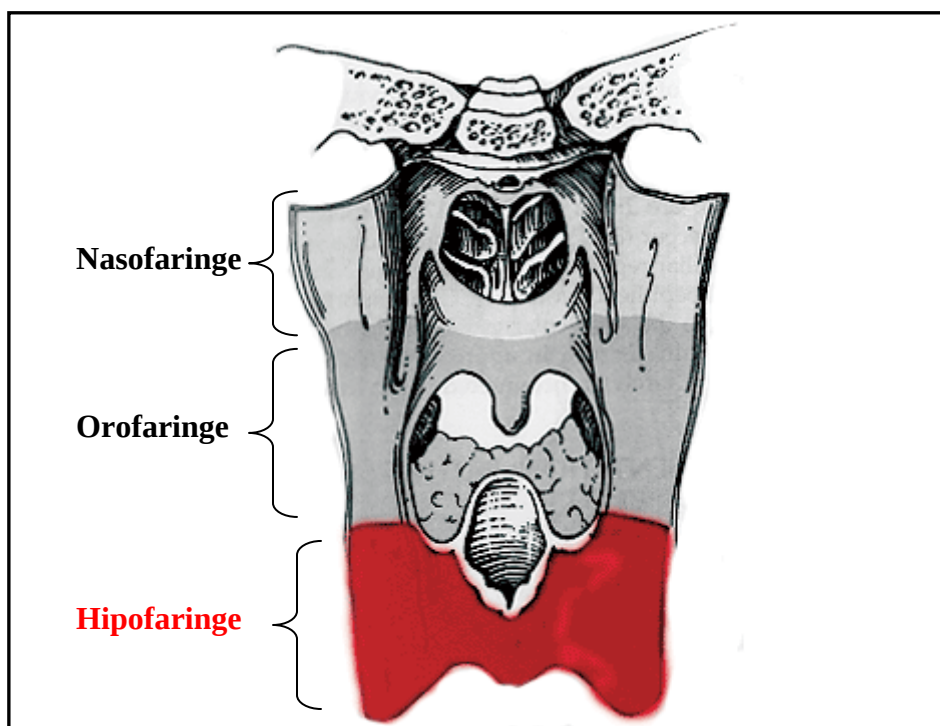


Figura 1.1 Desenho esquemático das regiões da Nasofaringe, Orofaringe e Hipofaringe.
Fonte: UICC-2004

2.2 Histologia

A hipofaringe é composta de tecido epitelial escamoso estratificado não-queratinizado, com grande quantidade de glândulas seromucosas. A parede da hipofaringe tem cinco túnicas: mucosa, submucosa, fibrosa (fáscia faringobasilar), muscular, tecido conectivo frouxo (fáscia bucofaríngea). A camada externa da hipofaringe é composta pelos músculos constritores superior, médio e inferior, já a composição da camada interna é feita pelo palatofaríngeo, salpingofaríngeo e estilo faríngeo (Wenig, 1993).

2.3 Morfologia

As estatísticas mostram que entre 85 e 90% dos cânceres que acometem a hipofaringe são carcinomas espinho-celulares ou, então, pertencem a uma de suas variedades. Os linfomas, melanomas e tumores glandulares são pouco frequentes. A lesão inicial no seio piriforme apresenta-se macroscopicamente sob o aspecto de um nódulo ou úlcera, tendo como característica principal, a rápida disseminação pela submucosa (Brandão & Ferraz, 1989 v 1; Sennes *et al.* 1997).

Os tumores do seio piriforme apresentam como característica a possibilidade de disseminação submucosa, invadindo estruturas por contigüidade e comprometendo

precocemente as cadeias de drenagens linfáticas cervical ipsi e contra-lateral ao tumor inicial, além de início insidioso, o que leva a diagnóstico inicial em estágio avançado na maioria das vezes (Rapoport, 1987; Keane, 1982).

Atualmente, com a associação de cirurgias radicais e radioterapia pós-peratória aumentou-se o controle locorregional destes tumores, contudo, a sobrevida global não sofreu alterações em decorrência das metástases à distância, o que não representa uma falha no tratamento realizado e sim uma evolução natural devido à característica invasiva desse tipo de neoplasia (Costa *et. al.*, 2003).

2.4 Manifestações Clínicas

A disfagia e a odinofagia são os sintomas mais proeminentes, porém, no início, os tumores malignos da hipofaringe são assintomáticos. Os doentes referem sensação de “bola na garganta” ou de “bola na garganta que sobe e desce”, podendo tais sintomas não serem relevantes ao clínico, tendo-se então a impressão de que sejam portadores de distonia neurovegetativa, hipocondria ou até mesmo os sintomas podem ser confundidos, como manifestações iniciais de histeria. Há a necessidade de laboriosa investigação, com ênfase à clínica e ao minucioso exame da hipofaringe, levando-se em conta os grupos de risco e os antecedentes dos pacientes. É preferível várias endoscopias negativas, do que a não investigação de uma lesão positiva (Brandão & Ferraz, 1989 v. 1).

Tanto a disfagia, como a odinofagia não são geralmente manifestações iniciais da doença, bem como a otalgia, que é mediada pelo IX e X nervos cranianos, mas, clinicamente, os pacientes podem apresentar de modo gradativo uma série de alterações, como: laivos de sangue na saliva, sialorréia, dispnéia, disfonia, halitose e tosse freqüente. O pescoço deve ser pesquisado, cuidadosamente, pois é sede muito comum de metástases cervicais ganglionares silenciosas (Brandão & Ferraz, 1989 v. 1).

2.5 Avaliação diagnóstica

O diagnóstico do carcinoma de hipofaringe começa, assim como em todos os diagnósticos médicos, com uma anamnese e um exame físico. O paciente, acometido a alguma sintomatologia, procura o médico, devendo este ouvi-lo atentamente. A queixa de uma tumoração no pescoço, por exemplo, nos faz pensar automaticamente em alguma neoplasia. Porém, na grande maioria das vezes, os sintomas são inespecíficos, e podem, até mesmo, provir de um processo benigno. A tosse, exemplificando, pode ser vista em muitas patologias, porém, o médico deve estar atento a esta queixa, quando proveniente de um

indivíduo tabagista de longa data. Cuidado igual deve ser dado à rouquidão, a dificuldade de deglutição, o aparecimento de sangue nas secreções glóticas, o surgimento de nodulações em determinadas regiões do corpo (DeVITA Jr *et al.* 1997).

Sintomas ainda mais gerais, como o aparecimento de febre ou febrículas de maneira continuada e sem outras causas, de emagrecimento sem outras explicações para tal, de astenia, adinamia ou fraqueza, a dor, de maneira continuada em certas regiões do corpo, até alterações psiquiátricas e mesmo quadros infecciosos repetidos, podem ainda denotar uma doença neoplásica em curso (DeVITA Jr *et al.* 1997).

A anamnese deve ser concluída com uma pesquisa acerca dos antecedentes pessoais e hábitos do paciente. Questões sobre tabagismo, o tempo, o número de maços ou unidades consumidas ao dia; alcoolismo, tempo, tipo de bebida (fermentada ou destilada) e quantidade; o uso de drogas, medicamentos contínuos, hábitos alimentares, sexuais e a ocupação profissional, devem ser acrescentados rotineiramente em uma anamnese (DeVITA Jr *et al.* 1997).

Feita a anamnese, o agente de saúde deve então proceder ao exame físico, objetivando encontrar sinais físicos que possam conduzi-lo a um diagnóstico. Para o diagnóstico do câncer de hipofaringe são necessários exames através da faringoscopia indireta. Nesta ocasião a laringe também deve ser vista, porque as lesões da hipofaringe podem produzir imobilidade das cordas vocais e comprometimento da região supraglótica. Na faringoscopia indireta pode-se perceber lesões do seio piriforme, da parede posterior da faringe e nas lesões avançadas da doença e nos tumores da região pós-cricóide, lança-se mão da faringoscopia direta. Outra forma de diagnóstico é o exame radiológico simples das partes do pescoço (lateral). Este exame pode ser completado com o deglutograma e a laringografia, porém recentemente estes exames perderam muita importância, dando lugar à planigrafia e à tomografia computadorizada que, associadas ao exame endoscópico e clínico, participam do planejamento terapêutico mais amigável. O exame radiológico torácico é feito rotineiramente, no sentido de identificar lesões metastáticas nos campos pulmonares (Brandão & Ferraz, 1989 v. 1).

2.6 Estadiamento

Para o diagnóstico de um câncer, o corpo clínico estabelece o estadiamento da doença, com o intuito de definir o nível de comprometimento em que o paciente se encontra. O estágio de um tumor reflete não apenas a taxa de crescimento e a extensão da doença, mas também o tipo de tumor e sua relação com o hospedeiro (INCA/MS, 2002 c).

Diversos sistemas de estadiamento poderiam ser concebidos, tendo por base uma ou mais variáveis. O sistema de estadiamento mais utilizado é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. Este sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em consideração as características do tumor primário (T), dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente (INCA/MS, 2002 D).

A classificação TNM da UICC leva em consideração para descrição da lesão, os seguintes aspectos topográficos da hipofaringe: a) seio piriforme, que se estende da prega faringoepiglótica à extremidade superior do esôfago. Medialmente, é limitado pela superfície da prega ariepiglótica e as cartilagens aritenóide e cricóide e lateralmente pela cartilagem tireóide; b) parede posterior da faringe, que se estende do nível do soalho da valécula ao nível da junção crico-aritenóideas; c) região pós-cricóide (junção faringoesofágica), que se estende do nível das cartilagens aritenóides e pregas de conexão à borda inferior da cartilagem cricóide (Brandão & Ferraz, 1989 v. 1).

2.6.1 Estádio T (Tumor)

Tabela 1.1. Classificação do tumor primário para o câncer de hipofaringe.

Classificação	Descrição
Tis	Carcinoma pré-invasivo
Tx	Impossibilidade de preenchimento dos requisitos mínimos para avaliar o tumor primário
T0	Sem evidência de tumor primitivo
T1	Tumor limitado a uma região
T2	Tumor estendendo-se a uma localização ou região adjacente, sem fixação da hemilaringe
T3	Tumor estendendo-se a uma localização ou região adjacente, com fixação da hemilaringe
T4	Tumor estendendo-se ao osso, cartilagem ou tecidos moles.

Fonte: Brandão & Ferraz, 1989 v 1

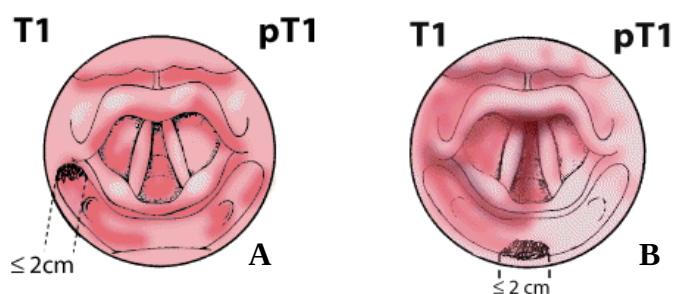


Figura 1.2 Desenho esquemático demonstrando posições de tumor em estágio T1 (A e B).

Fonte: UICC-2004.

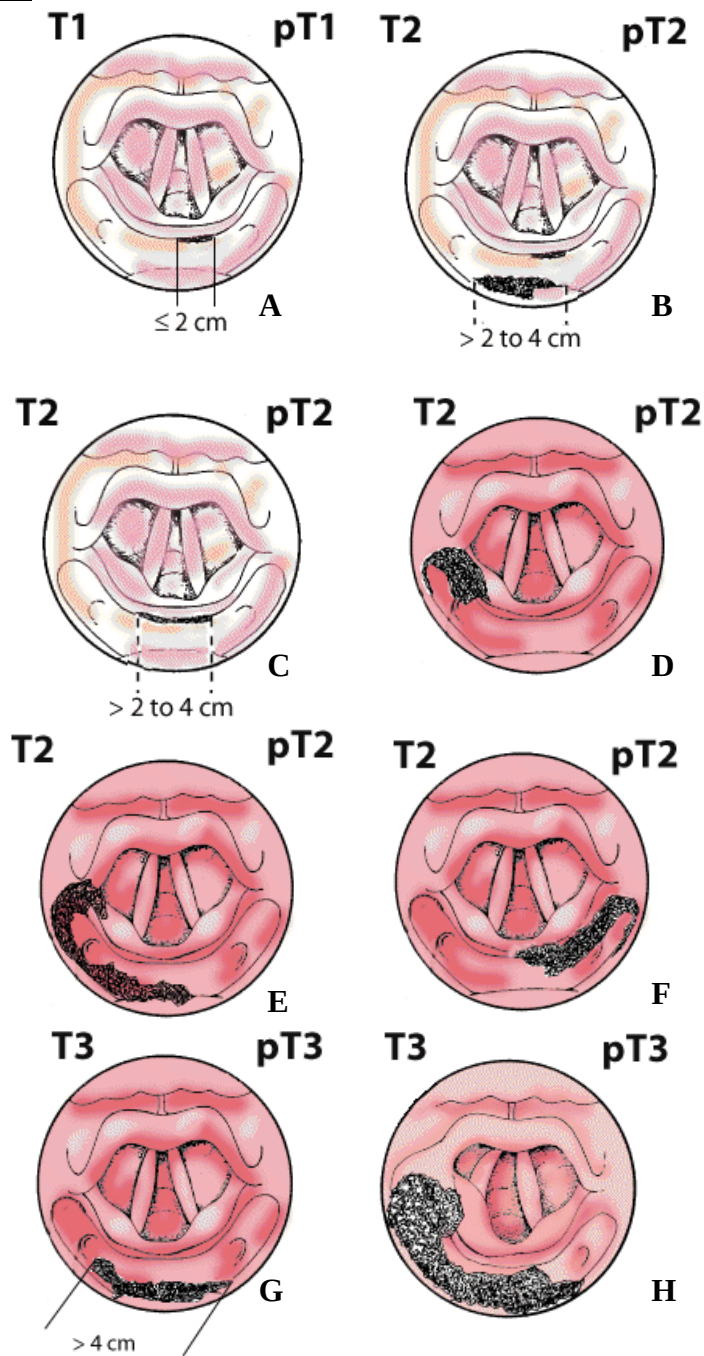


Figura 1.3 Desenho esquemático demonstrando posições de tumor em estádios T1 (A), T2 (B, C, D, E e F) e estágios T3 (G e H) e seus respectivos tamanhos iniciais.
Fonte: UICC-2004.

2.6.2 Estádio N (Nódulo Linfático Regional)

Tabela 1.2 Classificação dos nódulos linfáticos (N) para os tumores de hipofaringe.

Classificação	Descrição
N0	Ausência de linfonodo palpável
N1	Linfonodo homolateral móvel
N2	Linfonodo bilateral ou contralateral móvel
N3	Linfonodo fixo

Fonte: Brandão & Ferraz, 1989 v 1.

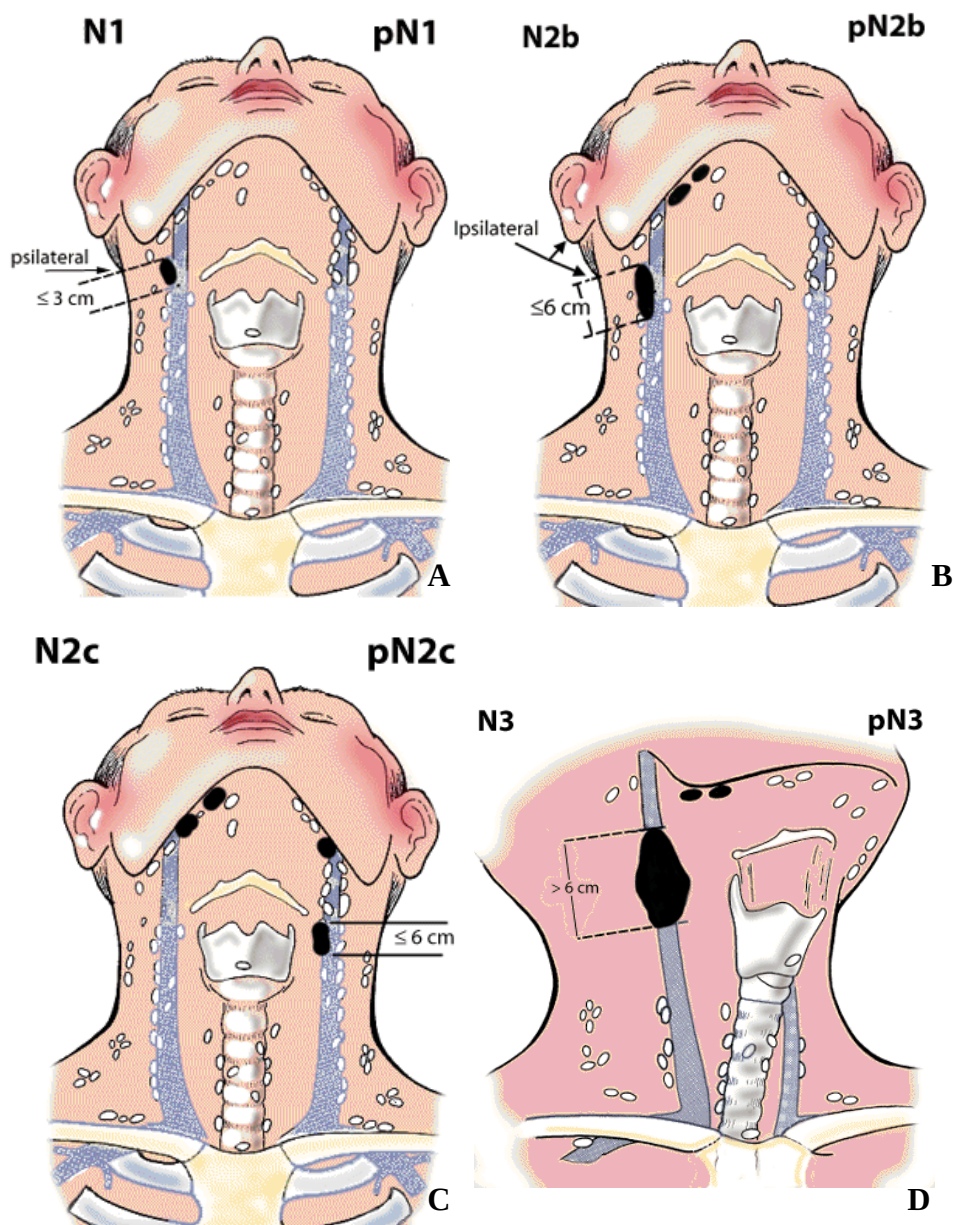


Figura 1.4 Desenhos esquemáticos demonstrando posições e tamanhos de tumores em estágio N1 (A), N2 (B e C) e N3 (D) no linfonodos regionais da hipofaringe. Fonte: UICC-2004

2.6.3 Estádio M (Metástase à distância)

Tabela 1.3 Classificação de metástases à distância para o câncer de hipofaringe

Classificação	Descrição
M0	Sem evidência de metástase à distância
M1*	Evidência de metástase à distância

Fonte: Brandão & Ferraz, 1989 v 1.

*A categoria M1 pode ser especificada pelas notações: PUL - Pulmonar; OSS - Ósseo; HEP - Hepática; CER ou BRA - Cerebral; LIN ou LYM - Linfonodos; MED - Medula óssea; PLE - Pleura; PER - Peritoneal; CUT ou SKI - Pele e OUT ou OTH - Outros.

2.6.4 Grupamento por Estádios

Tabela 1.4 Grupamento por estágio para o câncer de hipofaringe

Classificação	Descrição
Estádio I	T ₁ N ₀ M ₀
Estádio II	T ₂ N ₀ M ₀
Estádio III	T ₃ N ₀ M ₀ – T ₁ , T ₂ , T ₃ N ₁ M ₀
Estádio IV	T ₄ N ₀ M ₀
	T ₄ N ₁ M ₀
	Qualquer T N ₂ , N ₃ M ₀
	Qualquer T, qualquer N M ₁

Fonte: Brandão & Ferraz, 1989 v 1.

2.7 Classificação Internacional das Doenças para Oncologia (CID-O)

A Classificação Internacional de Doenças (CID) é usada mundialmente para codificação e tabulação dos dados de morbidade e mortalidade, além de auxiliar os médicos no preenchimento dos prontuários, visando armazenar e recuperar dados (SILVA, 2003)

Para a classificação das doenças oncológicas, utiliza-se a CID-O que é uma ampliação do capítulo sobre neoplasias da 9ª Revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-9). Sendo que, a CID-O caracteriza todas as neoplasias por sua topografia, histologia e comprometimento biológico, mas não trata da extensão da doenças, lateralidade, método de diagnóstico e tratamento (Silva *et al.*, 2003)

A Tabela 1.5 mostra as classificações para o câncer de hipofaringe.

Tabela 1.5 Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O). Topografia, Regiões e CID-O

Regiões	CID-O
Seio Piriforme	C12.x
Seio Piriforme	
Porta Piriforme	C12.9
Hipofaringe	C13.x
Região pós-cricóidea	
Cricóide, SOE*	
Cricofaringe	C13.0
Face hipofaríngea da peça artepiglótica	
Prega ariepiglótica, SOE* (exclui face laríngea da prega ariepiglótica C32.1)	C13.1
Parede posterior da hipofarínge	C13.2
Lesão sobreposta da hipofarínge	C13.8
Hipofaringe, SOE*	
Parede da Hipofaringe	C13.9

Fonte: CID-O, 2000.

*SOE: sem outras especificações

2.8 Tratamento

As modalidades terapêuticas para o câncer de hipofaringe são: a radioterapia, a cirurgia e a quimioterapia, métodos que podem ser associados para melhores resultados.

O tratamento cirúrgico tem como objetivo o tratamento local dos tumores sólidos, através de sua extração, assim como regiões adjacentes a este, no sentido de impedir sua

propagação regional ou metástases. Este tratamento deve incluir todos os cuidados referentes aos princípios gerais da cirurgia e ao preparo do paciente e seus familiares sobre as alterações fisiológicas e/ou mutilações que poderão advir.

A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes. Este tratamento pode ser utilizado como método complementar a uma cirurgia oncológica curativa ou usado como um método paliativo ao crescimento de tumores.

A quimioterapia, por sua vez, é o método que utiliza compostos químicos, denominados quimioterápicos, que são capazes de exterminar ou impedir o crescimento tumoral. Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é chamada de quimioterapia antineoplásica ou antitumoral (INCA/MS, 2003 B).

3.0 CONCLUSÕES

A hipofaringe é uma região que, apesar de compor – conjuntamente com a nasofaringe e a orofaringe – a faringe, apresenta um dos piores prognósticos, quando envolvida no processo tumoral. Seu tecido, composto por um epitélio escamoso estratificado não-queratinizado, se mostra bastante sensível à ação de carcinógenos, principalmente àqueles formados pela queima do tabaco, assim como pelo excesso de exposição ao álcool. Os seios piriformes, que fazem limite com a epiglote e a cartilagem aritenóide, apresentam grande capacidade de disseminação de células tumorais para outras regiões do pescoço, como faringe, esôfago e laringe (Costa *et. al.*, 2003).

Estudos epidemiológicos revelam que a grande maioria dos indivíduos acometidos por cânceres de hipofaringe, apresenta como hábitos, o consumo excessivo de álcool e o tabagismo exacerbado, por um longo período de tempo. Tais hábitos, combinados com a idade avançada e o diagnóstico tardio, auxiliam na baixa sobrevida apresentada pelos pacientes (INCA/MS, 2004 A)

Os primeiros sintomas de alterações na hipofaringe é o aparecimento de dores durante a deglutição e a sensação de ter um “caroço” na garganta ao engolir. Esses sintomas podem ser, facilmente, confundidos com irritação ou inflamação de garganta proveniente de uma gripe. Como a maioria dos pacientes diagnosticados com tumores de hipofaringe está entre a 5 e 6 décadas de vida, tende-se a procurar por alterações na glote ou pulmonares, deixando-se de lado as regiões da faringe, devido à maior incidência de alterações malignas nessas regiões. Desta forma, o primeiro contato entre o agente de saúde e o paciente, a anamnese, deve ser realizado de forma criteriosa e cautelosa. Uma entrevista médica, como qualquer outro tipo de

entrevista, possui técnicas, que devem ser seguidas rigorosamente, para que se possa aproveitar ao máximo o tempo que o médico dispõe para um atendimento, levando a um diagnóstico seguro e a um tratamento correto do paciente. Sabe-se hoje que a anamnese, quando bem conduzida, é responsável por 85% do diagnóstico na clínica médica, liberando 10% para o exame físico e apenas 5% para os exames complementares. Assim, o primeiro contato com o paciente com suspeita de câncer de hipofaringe é crucial para o bom prognóstico do tratamento (DeVITA Jr *et al.* 1997).

O tratamento mais utilizado para combater o câncer de hipofaringe, segundo estudos epidemiológicos, é a cirurgia, principalmente devido ao diagnóstico tardio e a grande capacidade de disseminação dos carcinomas de hipofaringe, o que dificulta o emprego de outros tratamentos, como a radioterapia e a quimioterapia. Por isso, é importante intensificar as campanhas de prevenção e diagnóstico das neoplasias de cabeça e pescoço, com o objetivo de aumentar a sobrevida do paciente, otimizando o tratamento e melhorando o prognóstico (INCA/MS, 2004 B; Zamarro *et al.*, 2001).

CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DO CÂNCER DE HIPOFARINGE EM GOIÂNIA, NO PERÍODO DE 1998 A 2003

Resumo

Os tumores malignos de hipofaringe não são freqüentes, representando entre 5 a 10% das neoplasias das vias aerodigestivas superiores e apenas 0,5 % de todos os cânceres. Porém, do conjunto das neoplasias malignas da região da cabeça e pescoço, tumores de hipofaringe apresentam o pior prognóstico. Realizou-se então uma avaliação das tendências epidemiológicas apresentadas pelo câncer de hipofaringe em Goiânia no período de 1998 a 2003, analisando os dados disponíveis pelo Registro de Câncer de Base Populacional da Associação de Combate ao Câncer em Goiás. A sobrevida relativa dos pacientes do sexo masculino diagnosticados com câncer de hipofaringe foi de 38% após 60 meses de segmento, enquanto que para o feminino apresentou-se uma sobrevida máxima de 100%, com todas as pacientes curadas. Dentre os tratamentos realizados, a cirurgia apresentou a menor taxa de sobrevida (34%) ao passo que para a quimioterapia foi associada uma sobrevida de 54%. A sobrevida dos pacientes tabagistas (43%) se mostrou muito inferior à dos indivíduos que não eram tabagistas (60%). Em fim, ao longo de cinco anos de segmento deste estudo, a taxa de sobrevida relativa para portadores de tumores malignos da hipofaringe foi de aproximadamente 38%, estimada para cinco anos com uma censura de apenas 5%. A taxa de sobrevida relativa é diminuída uma vez que cerca de 45% dos casos, o diagnóstico é feito tardiamente. Vale ressaltar a importância de campanhas preventivas, evitando assim o crescimento de patologias as quais são relativamente ligadas aos hábitos do tabagismo e etilismo.

Palavras-chave: hipofaringe, câncer, epidemiologia.

Abstract

Present study evaluate epidemiological trends of hypo pharynx cancer in Goiania on period 1998 to 2003 analyzing data derived from Cancer Registry of Association for Cancer Combat of Goias. The relative survival rate for men diagnosed with hypo pharynx cancer was 38% past 60 months while women presented a survival rate of 100%. Surgery was the treatments that present fewer rates (34%) and chemotherapy was associated to the most survival rate (54%). Patients that use tobacco presented a survival rate of 43% while non-tabagists present a rate of 60% of surviving. Relative survival rate for patients diagnosed with hypo pharynx tumor was 38% and estimated censure for 5 years was just 5%. Survival rate was extremely decreased due to 45% of cases were diagnosed in advanced stages of disease. It is important to point out that preventive campaign is important to evade the increasing of these pathologies that are related to behavior of tabagism and etilism.

Key-words: hypo pharynx, cancer, epidemiology.

1.0 INTRODUÇÃO

Os tumores malignos de hipofaringe não são freqüentes, representando entre 5 a 10% das neoplasias das vias aerodigestivas superiores e apenas 0,5 % de todos os cânceres. Porém, do conjunto das neoplasias malignas da região da cabeça e pescoço, tumores de hipofaringe apresentam o pior prognóstico. É comum a classificação dos tumores malignos da hipofaringe como tumores da laringe, e esta categoria apresenta alta incidência no Brasil, correspondendo ao sendo o sexto sítio anatômico mais comumente afetado para o sexo masculino (Costa *et al.*, 2003).

O carcinoma de hipofaringe é uma doença devastadora. As taxas de sobrevida de 2 e 5 anos para pacientes com este tipo de carcinoma em estágio III e IV são estimadas de 0 a 50%. Dos pacientes considerados passíveis de tratamento radical, somente 1 em 3 sobrevive a dois anos e menos de 1 em 5 sobrevive por mais de 5 anos. As taxas de sobrevida com tratamento radioterápico isolado são desanimadoras, pois giram em torno de 4 a 10%. Adicionalmente, a radioterapia como único tratamento tem se mostrado insuficiente como terapêutica de pacientes com metástases cervicais (Costa *et al.*, 2003; Amar *et al.*, 2002). Novos avanços vêm sendo incorporados no tratamento radio e quimioterápico dos cânceres de cabeça e pescoço. Apesar do prognóstico reservado dos tumores avançados, a incorporação de protocolos combinados de quimioterapia e radioterapia com intuito de preservação de órgãos ou palição em estágios de doença recorrente ou localmente avançada, que não são bons candidatos à cirurgia, têm mostrado resultados animadores (Herchenhorn & Dias, 2004).

A hipofaringe é dividida em três sítios anatômicos: os recessos piriformes, a parede posterior e a área retrocricoaritenóidea. Os tumores do seio piriforme apresentam como característica comum a possibilidade de disseminação submucosa, invadindo estruturas por contigüidade e comprometendo precocemente as cadeias de drenagens linfáticas cervical ipsi e contra-lateral. O tumor tem início insidioso, resultando em diagnóstico inicial já em estágio avançado na maioria das vezes (Rapoport, 1987; Keane, 1982).

Atualmente, com a associação de cirurgias radicais e radioterapia pós-operatória aumentou-se o controle locorregional destes tumores. Contudo, a sobrevida global não sofreu alterações em decorrência das metástases à distância, o que não representa uma falha no tratamento realizado e sim uma evolução natural devido à característica invasiva desse tipo de neoplasia (Costa *et al.*, 2003).

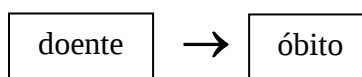
1.1. Estimativa de Sobrevida

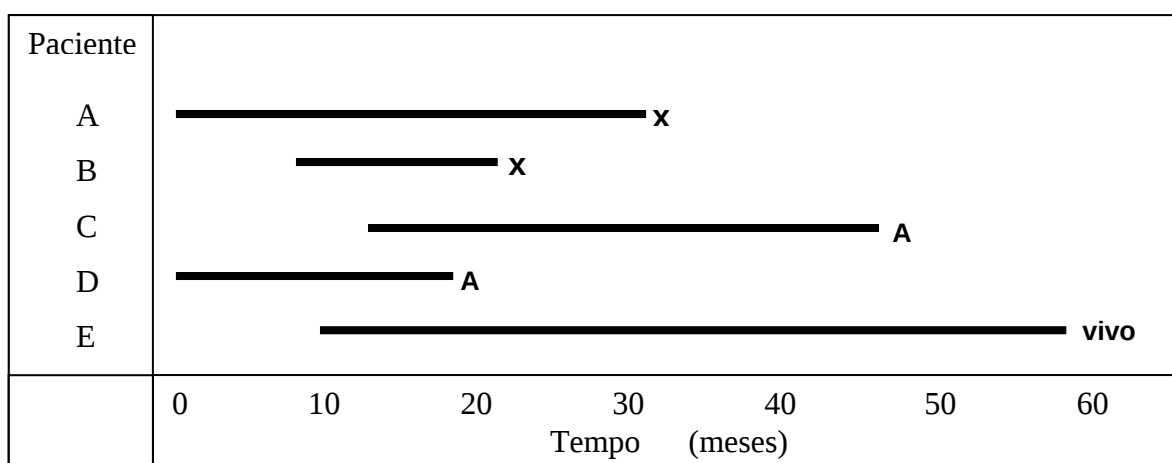
Em estudos de coorte ou ensaios clínicos há o acompanhamento de indivíduos durante um período de tempo até a ocorrência de um evento de interesse. Nestes estudos não se quer analisar, simplesmente, a ocorrência deste evento, mas, sim, as probabilidades de ocorrência do mesmo ao longo do tempo. O tempo é definido, então, como função de diversas variáveis independentes, e há a possibilidade de se avaliar a sua influência no comportamento do tempo decorrido entre o início da observação e o evento. Há interesse, também, em se verificar o efeito de fatores de risco ou de fatores prognósticos (sejam eles quantitativos ou qualitativos) no tempo de sobrevivência de um indivíduo de um grupo, bem como definir as probabilidades de sobrevida em diversos momentos no seguimento do mesmo. Sobrevivência, no presente trabalho, é considerada como o tempo desde a entrada do indivíduo no estudo, até a ocorrência do evento de interesse (falha) ou até a censura (observação incompleta devido à perda de acompanhamento, término do estudo, etc) [Croley & Breslow, 1984; Harris & Albert, 1991].

Em estudos de sobrevida as pessoas são acompanhadas a partir de um momento, como, por exemplo, o diagnóstico da doença, a realização de uma cirurgia, ou o nascimento. Geralmente, as pessoas são incluídas no estudo em diferentes tempos do ano calendário (Gráfico 3.1), porém, na análise, todos os indivíduos têm seu tempo de sobrevivência contado a partir da entrada no estudo, que é considerado como tempo zero (Gráfico 3.2). Os inícios são, portanto, truncados à esquerda, ou seja, a observação de cada indivíduo começa a partir de determinado momento, sem levar em conta o que aconteceu no passado (Croley & Breslow, 1984).

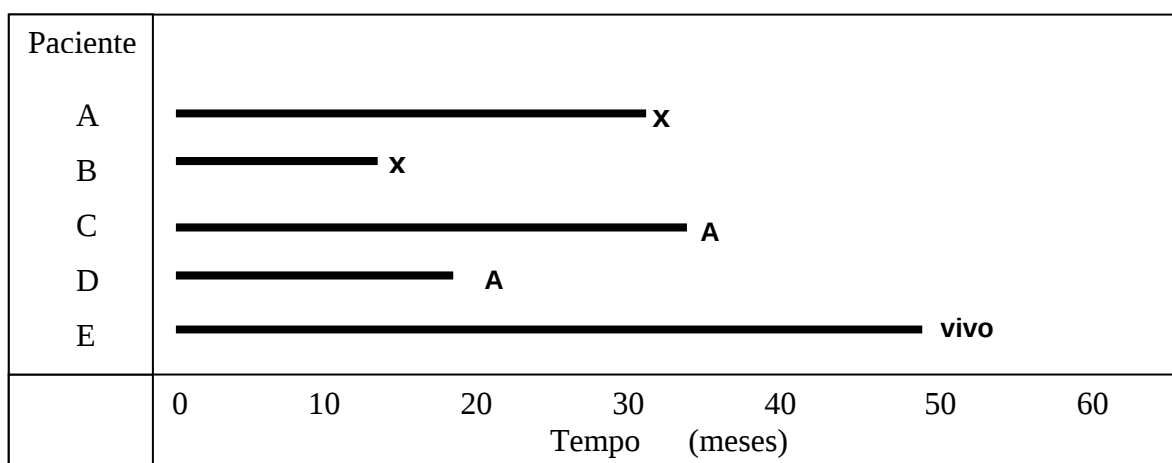
Uma grande vantagem nesta estratégia é que não é necessário esperar que todos os indivíduos apresentem o evento de interesse – como, por exemplo, o óbito – para se fazer a análise; aqueles indivíduos que não apresentaram falha ao término do estudo são considerados com censura (Croley & Breslow, 1984).

O indivíduo é seguido até uma (ou mais) mudança(s) de estado (também denominado compartimento). O esquema mais simples de estudo é aquele onde o indivíduo é acompanhado até a ocorrência de apenas um evento de interesse, como, por exemplo, do início da doença até o óbito.



**Gráfico 2.1.** Exemplo de como os indivíduos são seguidos no tempo (calendário).

Fonte: Croley & Breslow, 1994.

**Gráfico 2.2.** Exemplo de como os indivíduos são considerados na análise.

Fonte: Croley & Breslow, 1994.

No entanto, pode haver interesse em estudar o tempo até a ocorrência de diversas mudanças de estado, como cura e/ou recuperação, recorrência ou óbito. Os compartimentos que descrevem os diversos “estados de saúde” (ou “de doença”) obedecem a um processo de Markov finito, onde os estados são considerados etapas transitórias, com exceção do óbito que é considerado um estado absorvente, pois uma vez atingido esse estado a pessoa ali permanece (Croley & Breslow, 1984; Harris & Albert, 1991).

Um esquema diferente é aquele em que o desfecho de interesse pode ser classificado em diversas categorias, geralmente diferentes causas de óbito. Para esse tipo de análise é introduzida a metodologia de riscos competitivos, que são modelos que envolvem a teoria de cadeias markovianas. Quando se trabalha com riscos competitivos, os tempos de sobrevivência para cada uma das causas formam um sistema, em que cada um deles é uma variável aleatória (Croley & Breslow, 1984; Harris & Albert, 1991).

À medida que os modelos se tornam mais complexos, ou seja, com os indivíduos podendo ocupar diversos compartimentos no tempo (processo de Markov de nascimento – imigração – morte), é necessário se aplicar o modelo de intensidade multiplicativa que foi introduzido por AALEN (Croley & Breslow, 1984; Harris & Albert, 1991).

Em estudos onde há seguimento pode ocorrer que alguns indivíduos não sejam observados até a ocorrência da falha, ou seja, têm seu tempo de observação incompleto. Esse tipo de perda no tempo de observação é denominado censura. Isso pode ocorrer quando os indivíduos permanecem sem mudança de estado (falha) ao término do estudo, ou falecem por causas não relacionadas com a doença de interesse, ou abandonam o estudo ou são perdidos de observação. Por vezes a cura e/ou recuperação também podem ser consideradas como censura na observação. Uma suposição importante é a de que os indivíduos censurados em determinado tempo t são representativos de todos os indivíduos que estavam sujeitos ao risco de ter falha em t (Croley & Breslow, 1984; Harris & Albert, 1991).

1.2. Tábua de Vida Atuarial (Dados Completos)

Os estudos envolvendo a tábua de vida demográfica iniciaram-se no século XVII com Edmund Halley. Nesse modelo todas as observações são completas (isto é, não existe censura) e seu objetivo é fornecer o padrão de sobrevivência de indivíduos de um grupo, sujeitos a coeficientes de mortalidade específicos por idade (ou faixa etária). Através dessa técnica o tempo de seguimento é dividido em intervalos de tempo (ou de idade) fixos. Em cada intervalo x ($x = t + \Delta t$), tem-se :

d_x : número de óbitos que ocorreram no intervalo x ,

l_x : número de pessoas expostas ao risco de morrer no início do intervalo x ,

q_x : probabilidade de morrer no intervalo x , e

p_x : probabilidade de sobreviver no intervalo x .

$$\text{onde: } \begin{cases} q_x = \frac{d_x}{l_x} \\ p_x = 1 - q_x = \frac{l_x - d_x}{l_x} \end{cases}$$

A partir da tábua de vida para dados completos (demográfica) pode-se estimar a esperança de vida e, neste caso, é necessário fazer uma correção na estimativa do q_x :

$${}_nq_x = \frac{n.M_x}{1 + a_x.n.M_x}, \text{ onde}$$

$$a_x = \text{fator de separação na faixa etária } x = \begin{cases} 0,8, & \text{para } < 1 \text{ ano} \\ 0,7, & \text{para } 1 \text{ a } 4 \text{ anos} \\ 0,5, & \text{para } 5 \text{ anos e mais} \end{cases}$$

${}_nM_x$ = coeficiente de mortalidade específico para a faixa etária x

n_x = número de indivíduos na faixa etária

1.3. Tábua de Vida Atuarial (Dados Incompletos)

Somente nas décadas de 50 e 60 é que o conceito de censura foi incorporado na tábua de vida atuarial. Nessa tábua de vida o tempo também é dividido em intervalos fixos e a probabilidade de óbito é calculada para cada um dos intervalos. Na tábua de vida atuarial com dados incompletos, isto é, na presença de censura, é feito um pequeno ajuste no número de pessoas expostas ao risco no início do período x , diminuindo-se metade das censuras do total de expostos ao risco no início do período (Harris & Albert, 1991). Nesse caso supõe-se que as censuras ocorreram uniformemente durante o período x e o número de indivíduos expostos corrigidos pela censura (l_x^*) é:

$$l_x^* = l_x - \frac{w_x + u_x}{2}$$

Onde:

w_x = número de pessoas que terminaram vivas o estudo, no intervalo x

u_x = número de pessoas perdidas de observação

Para exemplificar esta situação, suponhamos que um grupo de 150 pacientes com câncer de hipofaringe (dados hipotéticos) tenha sido seguidos por 60 meses. A tabela 3.1 apresenta o cálculo da probabilidade de sobrevivência acumulada neste período.

Tabela 2.1. Exemplo do cálculo de probabilidade de sobrevida

Tempo meses	Lx	dx	Ux	wx	L'x	q'x = dx/L'x	p'x = 1-q'x	S(x)
0 a 12	150	20	1	12	143,5	0,14	0,86	0,86
13 a 24	117	39	3	13	109	0,36	0,64	0,55
25 a 36	62	12	1	7	58	0,21	0,79	0,44
37 a 48	42	9	2	5	38,5	0,23	0,77	0,34
49 a 60	26	1	0	3	24,5	0,04	0,96	0,32
mais de 60	22	2	0	17	13,5	0,15	0,85	0,27

Fonte: Harrys & Albert, 1991.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Grupo de Estudo

A presente análise epidemiológica corresponde a um estudo retrospectivo de pacientes diagnosticados com câncer de hipofaringe do Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia (RCBP) da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), no período de 1998 a 2003.

Foram analisados 36 prontuários, levando em consideração as seguintes variáveis: idade, data do diagnóstico, data de óbito, data de cura e hábitos de vida, incluindo tabagismo e etilismo. Os dados diferentes aos tumores foram caracterizados segundo CID-O (classificação Internacional das Doenças para Oncologia), morfologia, topologia, estadiamento TNM e o diferente tipo de tratamento.

Para a estimativa dos coeficientes de incidência (CI), foram consideradas as datas do diagnóstico individual. O coeficiente de incidência foi calculado pela seguinte fórmula:

$$CI = \left[\frac{\text{Número de novos casos de carcinoma de hipofaringe}}{\text{Número de pessoas expostas ao risco de desenvolver câncer de hipofaringe no mesmo período}} \right] \times 100.000 \text{ habitantes}$$

Para a determinação dos coeficientes de mortalidade (CM), foram usadas as datas dos óbitos coletadas diretamente dos prontuários. O coeficiente de mortalidade foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$CM = \left[\frac{\text{Número de mortes por câncer de hipofaringe em um período de tempo específico}}{\text{Número de pessoas expostas ao risco de morrer de carcinoma de hipofaringe no mesmo período}} \right] \times 100.000 \text{ habitantes}$$

Os dados dos respectivos pacientes foram tabulados em planilhas, visando à obtenção da curva de sobrevida apresentada pelo grupo. Para o cálculo da sobrevida foi utilizado o método de estimador atuarial, que considera o uso de dados incompletos dos prontuários, incluindo data do diagnóstico, intervalo livre de doença, avaliado através da presença ou ausência de recidivas e condições de saúde do paciente em sua última visita de acompanhamento (Silva, 1999). A sobrevida relativa (SR) é uma estimativa de como seria a sobrevida do paciente com câncer de hipofaringe na ausência de outras causas de morte. A SR foi definida por:

$$SR = \left[\frac{\text{Sobrevida observada o grupo de pacientes}}{\text{Sobrevida esperada na população geral}} \right]$$

Para os cálculos estatísticos dos coeficientes de incidência e mortalidade e das sobrevidas, foi utilizado o *software Microsoft Excel*[®] (*Microsoft Corporation, EUA*) e confecção dos gráficos de sobrevida, o *software SPSS*[®] (*SPSS Inc., EUA*). O teste de logrank foi aplicado para comparar as diferenças estatísticas entre as curvas de sobrevida (Rosner, 1995).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a sobrevida geral dos pacientes diagnosticados com câncer de hipofaringe em Goiânia, no período de 1998 a 2003, foi encontrada a taxa de sobrevida de 38% (Gráfico 3.3), após cinco anos de seguimento.

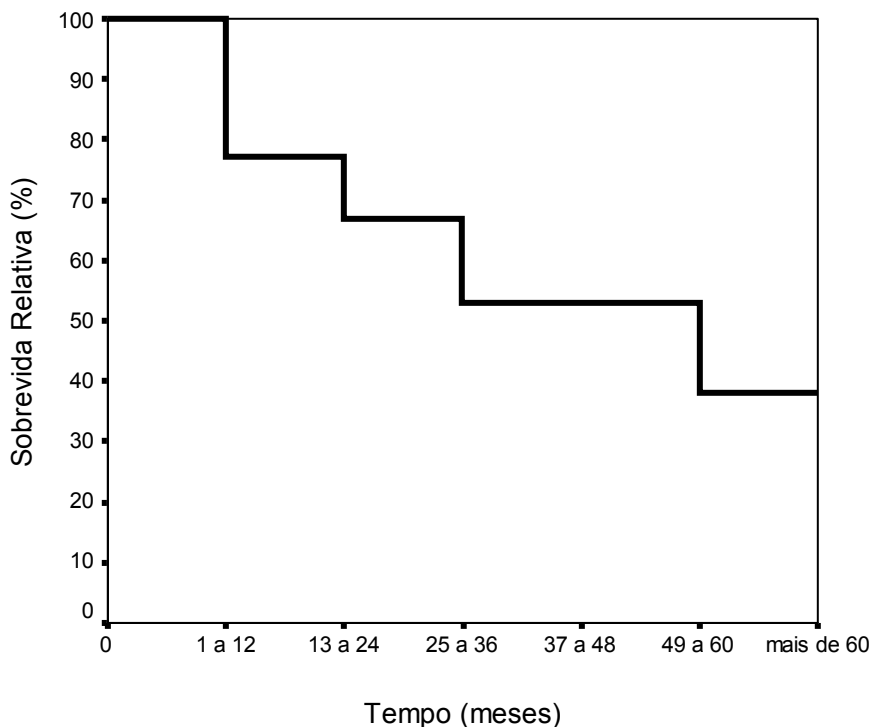


Gráfico 2.3. Sobrevida Relativa Geral para o câncer de hipofaringe na população de Goiânia, no período de 1998 a 2003.

A distribuição percentual de casos de câncer de hipofaringe no período estudado entre os dois sexos (Gráfico 2) demonstrou um acometimento maior da doença pela população masculina, em uma proporção de 17:1 em relação aos casos femininos.

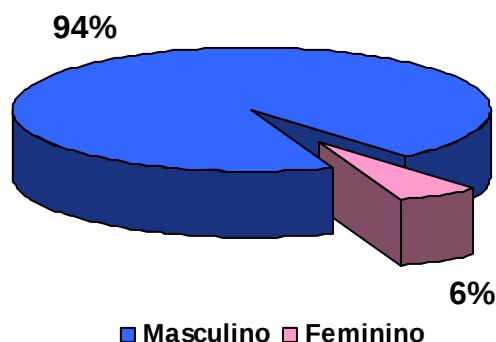


Gráfico 3.4. Distribuição percentual de Casos de Câncer de Hipofaringe entre os sexos em Goiânia, no período de 1998 a 2003.

Para os dois sexos, a faixa etária mais acometida pelo câncer de hipofaringe é a da 7ª década (Tabela 3.2), sendo mais comum na raça branca que em raças não brancas, numa proporção de 2:1.

Tabela 2.2. Distribuição de casos de Câncer de Hipofaringe por faixa etária.

Faixa Etária (anos)	Percentual
0 – 10	0,00
11 – 20	0,00
21 – 30	2,78
31 – 40	5,56
41 – 50	13,89
51 – 60	25,00
61 – 70	44,44
71 – 80	5,56
81 – 90	2,78
91 - ...	0,00
Total	100,00

A sobrevida relativa entre os sexos se mostrou bastante diferente no estudo (Gráfico 3.5). Os indivíduos do sexo masculino apresentaram uma sobrevida de 38% após 60 meses de seguimento, sendo bastante inferior ao sexo feminino, que, por sua vez, apresentou uma sobrevida máxima de 100%, com todas as pacientes curadas.

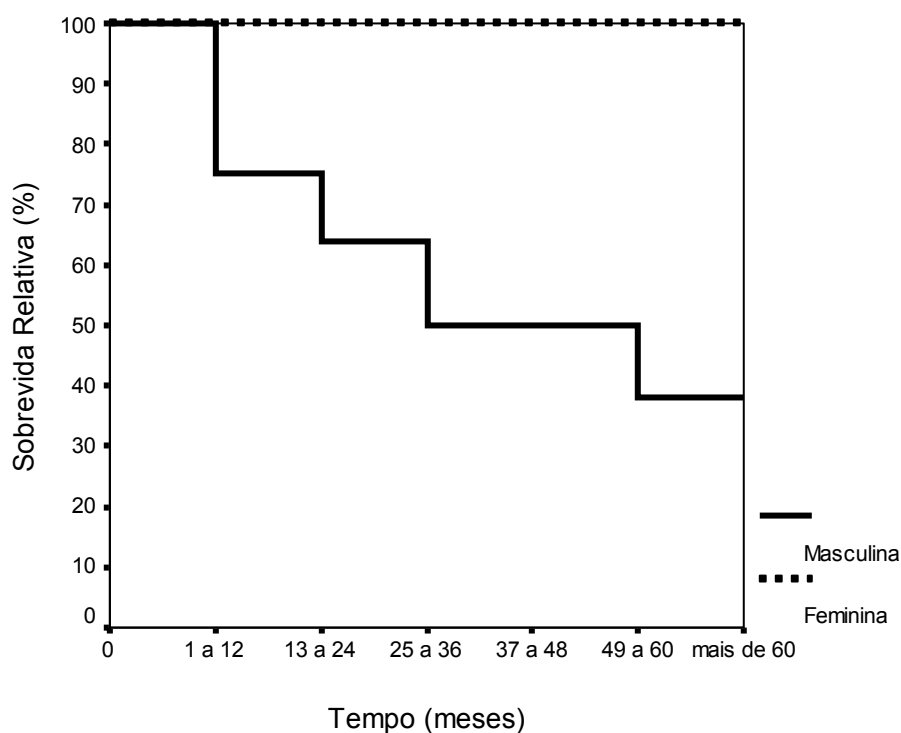


Gráfico 2.5. Sobrevida Relativa entre os sexos para o câncer de hipofaringe na população de Goiânia, no período de 1998 a 2003.

A grande maioria dos pacientes, 32 dos 36, portando 89% deles, apresentou hábitos de tabagismo e etilismo crônicos. Alguns dos pacientes tinham registrado em seus prontuários médicos, o hábito de fumar por quase 50 anos, ou pouco menos, uma quantidade de 10, ou mais, cigarros por dia. Tais resultados se refletem principalmente nos resultados relativos à população masculina, onde o tabagismo e o etilismo estão muito presentes. A sobrevida entre os pacientes que fazem o uso do tabaco ou fumo (Gráfico 3.6), se mostrou bastante inferior (43%) à dos indivíduos que não eram tabagistas (60%).

Em relação ao hábito de etilismo, alguns dos pacientes apresentavam um quadro de alcoolismo severo, ou intensa ingestão de bebidas alcoólicas, por um intervalo longo de tempo, fato retratado, por exemplo, em um paciente que consumia de 500ml a 1l de cachaça quase que diariamente durante 40 anos. Apesar de tudo, a sobrevida relativa entre os pacientes não etilistas foi pouco superior (37%) que a sobrevida de pacientes etilistas (30%). Os dados obtidos nesse estudo (Gráfico 3.7) estão de acordo com as análises epidemiológicas dos cânceres de cabeça e pescoço, que apontam para o uso do fumo e de bebidas alcoólicas como os principais fatores de risco exógenos nesse tipo de tumor, existindo entre estes hábitos um sinergismo responsável no efeito multiplicativo do risco (Menezes *et al.*, 2002).

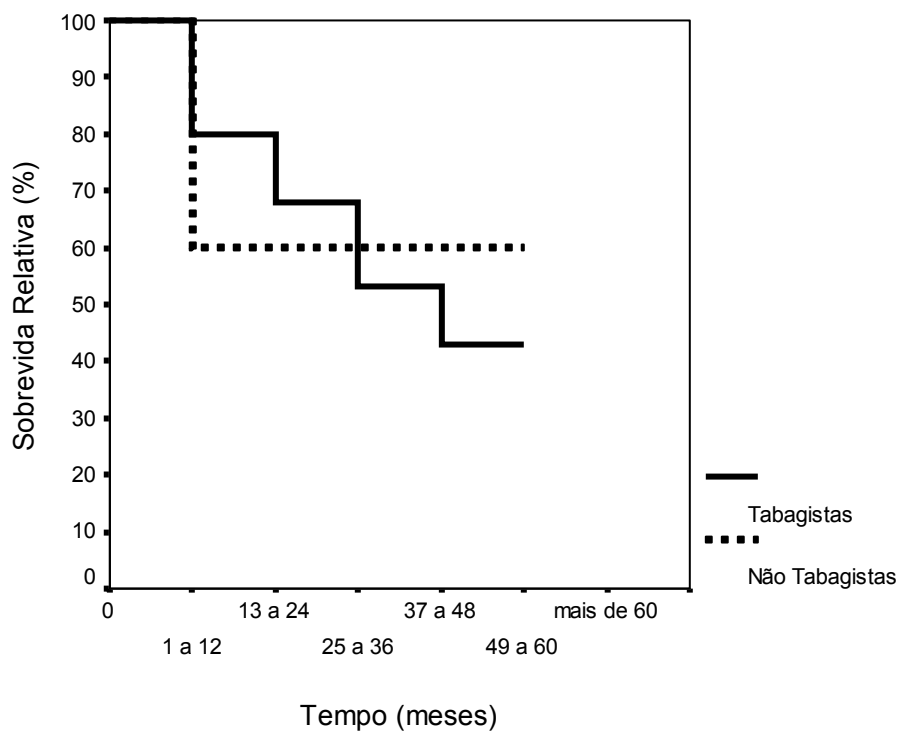


Gráfico 2.6. Sobrevida Relativa entre os pacientes com hábito tabagista e não tabagista

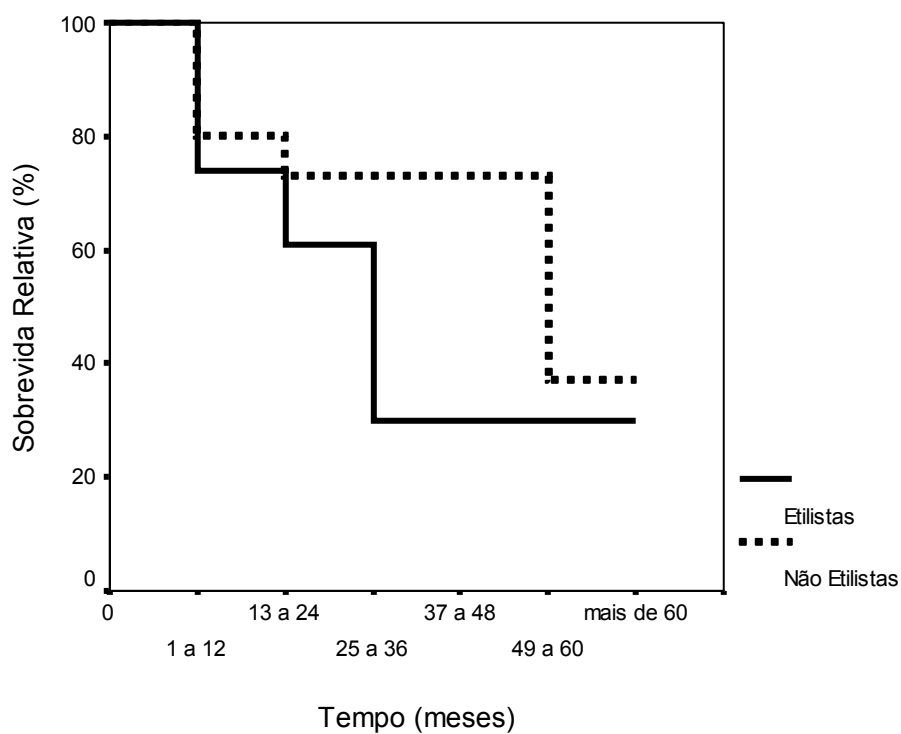


Gráfico 2.7. Sobrevida Relativa entre os pacientes com hábito etilista e não etilista

O diagnóstico em cerca de 76% dos casos ainda é feito tardiamente, afetando consideravelmente a sobrevida individual. A taxa de sobrevida relativa diminui muito quando o diagnóstico é feito nos estádios tardios (Gráfico 3.8 e 3.9). De acordo com Zamarro e colaboradores (2001) os fatores de risco que estão mais associados à mortalidade e, conseqüentemente, a baixa sobrevida dos pacientes nos estágios terminais do câncer da laringe, região anatômica próxima a hipofaringe, são, em ordem de importância: presença de metástase à distância, gânglios histologicamente afetados, sugerindo um risco duas vezes maior de recidiva locorregional (Menezes *et al.*, 2002).

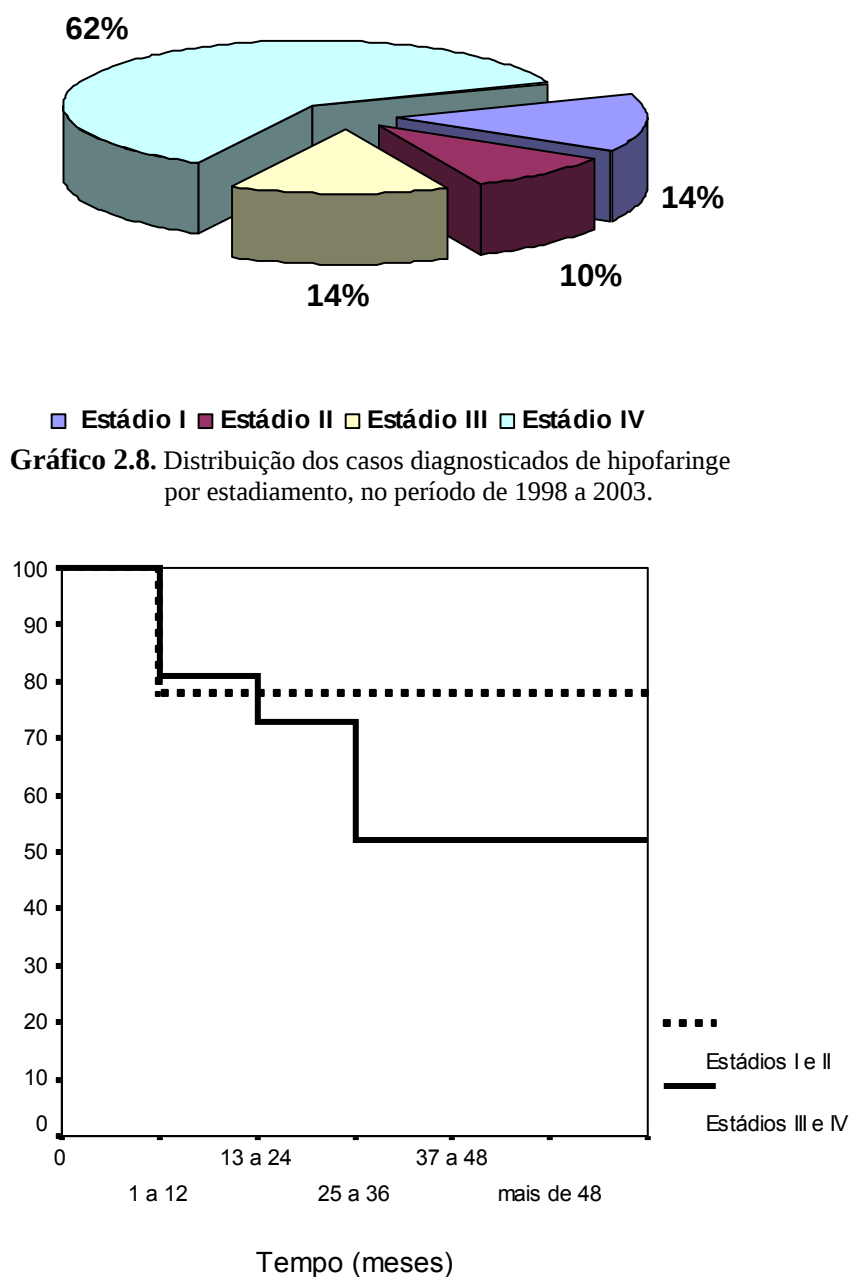


Gráfico 2.9. Sobrevida Relativa entre os pacientes diagnosticados em diferentes estádios da doença, no período de 1998 a 2003.

Dentre os tratamentos a quimioterapia foi associada a uma maior sobrevida relativa (54%), provavelmente porque esse tipo de tratamento é indicado para pacientes em estádios I e II do desenvolvimento do câncer, refletindo a maior sobrevida para estes pacientes, que estão em estágios iniciais da doença. A cirurgia, por sua vez, apresentou a taxa de sobrevida mais baixa entre os tratamentos adotados (34%). A intervenção cirúrgica é sempre tomada como a opção derradeira de tratamento, pois trata-se da forma mais invasiva e traumática de tratamento a qual um paciente pode sofrer, sendo desta forma, aplicada somente em pacientes em estados muito avançados da doença, ou como forma paliativa ao desenvolvimento do tumor.

Os registros falham ao classificar a maioria dos cânceres de hipofaringe como CID-O C12.9 (Hipofaringe SOE) a maioria dos casos (40%). Tais falhas também são percebidas no registro da morfologia do tumor, pois a vasta maioria dos casos (89%), foi enquadrada na categoria CEC-SOE (Carcinoma espinocelular sem outras especificações). Topograficamente, o sítio anatômico do seio piriforme representaram 33%, a hipofaringe (58%) e a região pós-cricóide somente 3% dos casos diagnosticados.

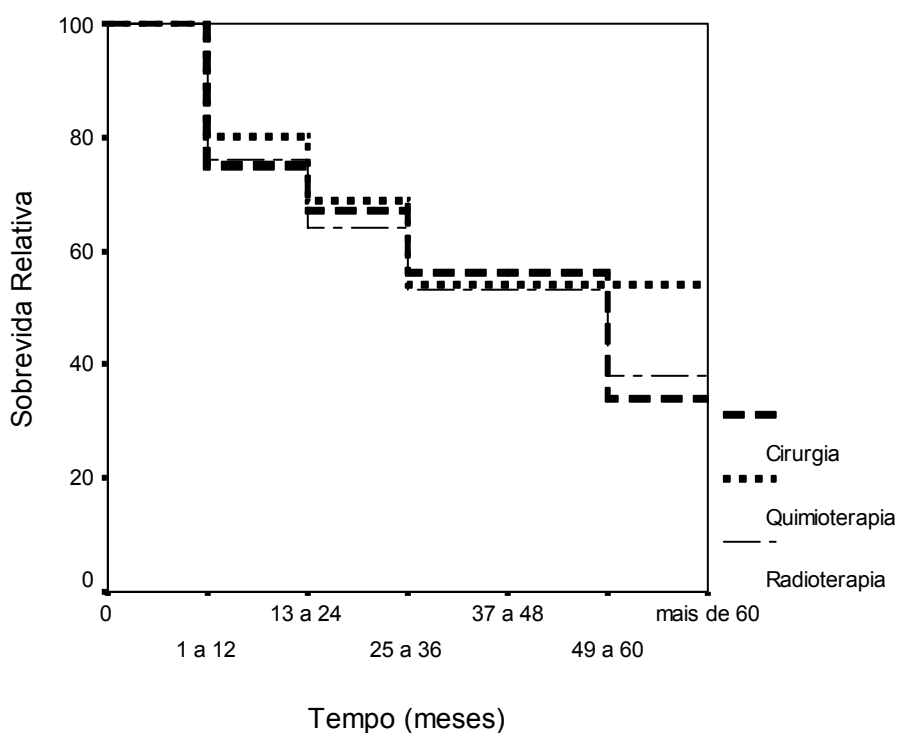


Gráfico 2.10. Sobrevida Relativa entre os tratamentos utilizados para o câncer de hipofaringe.

Todas as taxas de sobrevida foram corrigidas e, por isso, são denominadas taxas de sobrevida relativa, isso acontece devido ao fato da informação, sobre a causa de morte dos pacientes, muitas vezes ser incerta, não disponível e pouco confiável. Isso porque é difícil distinguir os óbitos relacionados com a doença em estudo com aqueles relacionados à toxicidade do tratamento ou a outras causas independentes, comuns em doenças crônicas, como nas neoplasias. Por isso é preferível considerar, na análise das sobrevidas, os óbitos por todas as causas e corrigi-las utilizando a sobrevida da população total a qual o grupo pertence.

Assim, obtém-se a sobrevida relativa, que é definida pela razão entre a sobrevida observada no grupo de pacientes e aquela esperada em um grupo de pessoas da população geral, sendo desta forma, uma estimativa de como seria a sobrevida do paciente com câncer da laringe na ausência de outras causas de morte (Curado & Latorre, 2000) . Assim, ao longo de 5 anos de seguimento deste estudo, a taxa de sobrevida relativa para portadores de tumores malignos da hipofaringe foi de aproximadamente 38%, estimada para cinco anos, com uma censura de apenas 5%.

No período estudado, o coeficiente médio de incidência anual para o câncer da hipofarínge foi de 2,3/100.000 habitantes para o sexo masculino e 0,1/100.000 habitantes para o sexo feminino. Para o mesmo período, o coeficiente médio de mortalidade anual para a mesma doença foi de 0,45/100.000 habitantes no sexo masculino e de 0/100.000 habitantes para o sexo feminino, pois todas as pacientes foram curadas.

4. CONCLUSÕES

Os dados epidemiológicos do câncer da laringe e hipofaringe no mundo e, principalmente, no Brasil, têm fornecido tendências preocupantes, que devem alertar para a importância de se promover estudos relacionadas com este tipo particular de câncer. A sobrevida de 38% se mostra muito reduzida, até mesmo se comparada com cânceres de regiões próximas como a laringe, que apresenta sobrevida geral de 46% (Silva, 2003).

Os resultados comprovaram ainda que, hábitos como tabagismo e etilismo, são de grande importância para o desenvolvimento e prognóstico da doença, uma vez que os tabagistas e etilistas representaram 89% dos indivíduos estudados e, com isso, apresentaram uma sobrevida bastante inferior a dos que não faziam uso do fumo e álcool, 43% contra 60%.

Adicionalmente, mais uma vez foi observado o diagnóstico tardio da doença, 76% dos casos, o que afeta a sobrevida e a chance de cura do paciente (Zamarro *et al*, 2001). Desta

forma, devem-se intensificar as campanhas de prevenção, na tentativa de diminuir a incidência e diagnosticar o câncer nos estágios iniciais da doença, oferecendo maior chance de cura para o paciente (Curado & Latorre, 2000).

CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA DA MUCOSA ORAL DE PACIENTES COM TUMORES DE HIPOFARINGE

Resumo

A análise citogenética em células esfoliadas da mucosa oral tem sido usada para avaliações da frequência das alterações citotóxicas e genotóxicas apresentadas por determinados grupos de pessoas expostas à possíveis mutágenos. As frequências das alterações obtidas são utilizadas para comparação entre indivíduos expostos e não expostos. Além de micronúcleo, outras anomalias nucleares resultam de eventos citotóxicos e genotóxicos, sendo assim, bons biomarcadores relacionados à exposição de um tecido a determinadas substâncias. Sendo assim, o aumento na frequência de micronúcleos pode representar um sinal precoce indicador do aumento do risco relativo individual para o desenvolvimento de câncer. O presente estudo avaliou as alterações citogenéticas nucleares de pacientes portadores de câncer na região da hipofaringe. Foram analisados 36 indivíduos do grupo de casos, constituído de pacientes diagnosticados com tumores de hipofaringe, e 36 indivíduos saudáveis do grupo controle. Para obtenção dos dados foram considerados hábitos de consumo como tabagismo e etilismo e principalmente o tempo de exposição. Foram contadas 5000 células por indivíduo e as frequências de micronúcleo, binucleadas, *broken eggs* e demais aberrações nucleares, foram calculadas para ambos os grupos. A frequência de micronúcleo mostrada entre o grupo controle e o de casos não apresentaram diferença estatística. Porém, foi observado, por parte do grupo de casos, um grande número de células com *broken eggs* e binucleadas. Tais resultados demonstraram diferença estatística ($p = 0,03$). A binucleação e a formação de dois núcleos em forma de *broken egg* sugere que agentes como o tabaco e o alcoolismo crônico podem estar relacionados com a indução e progressão de tumores em pessoas susceptíveis, devido à capacidade desses mutágenos afetarem o ciclo celular.

Palavras-chave: Citogenética, Mucosa oral, Biomarcadores, Micronúcleos, Hipofaringe.

Abstract

Present study evaluates cytogenetically individuals diagnosed with hypo pharynx cancer. Cytogenetic analysis of exfoliated cells is largely used to evaluate cytotoxic and genotoxic alterations on people exposed to potentially mutagens. A number of 36 individuals were analyzed, representing case group, and 36 healthy individuals composed control group. Data was collected and analysis was performed to estimate main nuclear alterations. Standard protocols were adopted to collect and counting cells. Micronuclei test was used to determinate the frequency of cytotoxic and genotoxic alterations. Besides than micronuclei others alterations like broken-eggs, binucleated cells and piknotic nuclei are good markers of cell alterations because they are resulted from cytotoxic events frequently related to occupational exposure. Behaviors like tabagism, etilism and exposition time were also investigated to correlate cells alterations. The correlation between micronuclei frequencies of case and control group test doesn't show statistic difference. Broken egg and binucleated cells were the most observed anomalies on case group and showed up significant statistic difference ($p=0.03$). Results indicates a high grade of cytotoxic anomalies on individuals with hypo pharynx cancer, specially in tabagists and chronic etilists individuals, behaviors that are correlated to induct and promote tumors in susceptible people due their capabilities to affect cell cycle.

Keywords: Cytogenetics, Exfoliated cells, Micronuclei, Broken egg, Hypo pharynx.

1.0 INTRODUÇÃO

Devido à exposição da população em geral a diversos agentes potencialmente citotóxicos e genotóxicos, testes rápidos e eficazes estão sendo desenvolvidos como dosímetros biológicos ou biodosímetros de exposição. A citogenética estuda o comportamento cromossômico na célula e utiliza marcadores citogenéticos para a determinação do potencial genotóxico, mutagênico e clastogênico de agentes físicos e químicos. Dentre os marcadores mais utilizados na análise citogenética, estão as aberrações cromossômicas estruturais instáveis (cromossomos dicêntricos, tricêntricos, anéis cêntricos, fragmentos acêntricos) e estáveis (translocações, deleções e inversões) de linfócitos T e as alterações citocrônicas evidenciadas pelo teste de micronúcleo (MN) em células da medula óssea, esfoliado oral e linfócitos de sangue periférico (da Silva & da Cruz, 2002; Rabello-Gay *et al.*, 1991).

1.1. Testes citogenéticos

Dentre os testes citogenéticos para avaliação de potencial genotóxico, o teste do micronúcleo de células esfoliadas da cavidade oral e de sangue periférico, apresenta-se com uma alternativa eficiente para avaliar os efeitos genotóxicos de exposição das populações humanas à baixas doses de substâncias carcinogênicas, às quais as populações humanas estão usualmente expostas. (Stich *et al.*, 1982). O aumento na frequência de micronúcleos está relacionado com quebra cromossômica ou com a uma interferência que possa ter ocorrido durante o processo da mitose celular, (da Cruz *et al.*, 1994), em que o núcleo fragmenta, formando estruturas extranucleares contendo pequenos fragmentos de DNA. Estes danos sofridos pelo DNA da célula expostas aos agentes ambientais são incorporados como erros, uma vez que não são reparados pelos complexos sistemas de reparo da célula. Conseqüentemente, ocorre um aumento na instabilidade genética que é a causa subjacente do desenvolvimento de neoplasias. (Chaves *et al.*, 2002).

A molécula de DNA é responsável pelo controle de todo metabolismo que a célula desempenha durante o ciclo celular. Alterações na estrutura da molécula de DNA podem resultar em descontrole das funções celulares. Assim, eventos que desregulem o ciclo celular são as causas que antecedem a iniciação ou promoção tumoral. Cromossomos aberrantes, frequência aumentada de micronúcleos (MN) e a troca entre cromátides irmãs frequentes, sejam espontâneos ou induzidos por agentes genotóxicos, são bons indicadores de danos biológicos ao material genético (da Cruz *et al.*, 1994). O aumento do dano genético no epitélio é um fator de risco associado ao aparecimento de tumores da cavidade oral (Kayal *et*

al., 1993; Nair *et al.*, 1991). “O aumento na frequência de micronúcleos é um bom indicador da ação clastogênica de um agente ambiental sobre o material genético e, conseqüentemente, pode ser usado como marcador de genotoxicidade” (Tolbert *et al.*, 1991). A avaliação da frequência de micronúcleos induzidos em células por agentes mutagênicos e clastogênicos tem sido amplamente usada na análise de danos citogenéticos (Bloching *et al.*, 2000; Prasad *et al.*, 1995).

1.2. O tecido epitelial

Os tecidos são formados por células e moléculas e agem associados uns aos outros formando os diferentes órgãos e sistemas do corpo. Apesar de sua grande complexidade, o organismo humano é constituído por apenas quatro tecidos básicos, a saber: o epitelial, o conjuntivo, o muscular e o nervoso. Os epitélios, por sua vez, são constituídos por células poliédricas justapostas e, por essa causa, existe muito pouca substância extracelular. Além disso, as células epiteliais se aderem firmemente umas às outras por meio de junções intercelulares e devido à essa capacidade de adesão, às células do tecido epitelial são capazes de se organizarem como folhetos (Junqueira & Carneiro, 2004).

As principais funções dos epitélios são a de revestir as superfícies externas do corpo, formando a pele; compor os revestimentos internos das cavidades corporais; organizar-se em unidades secretoras, chamadas de glândulas e de receber e perceber estímulos, através dos neuroepitélios (Junqueira & Carneiro, 2004).

Dessa forma, pelo fato das células epiteliais recobrirem todas as superfícies do corpo, tudo que entra ou sai do organismo naturalmente, deve atravessar um folheto epitelial.

A forma e tamanho das células epiteliais variam muito, indo desde as grandes e altas células colunares, até as pequenas células pavimentosas, achatadas como ladrilhos. Outro fato importante sobre a morfologia celular dessas células é a forma poliédrica presente em todas elas, que está relacionada ao fato das células epiteliais estarem sempre justapostas entre si, formando folhetos ou aglomerados tridimensionais (Gartner & Hiatt, 1999).

Como as células epiteliais se encontram muito justapostas, impedem a perfeita observação de seus limites, onde uma começa e outra termina. Assim, os núcleos celulares e suas formas, nos dão indiretamente uma idéia do tamanho, da forma e do número de camadas das células epiteliais. Outro fato salutar é que praticamente todas as células epiteliais estão apoiadas sobre um tecido conjuntivo. Quando o tecido epitelial reveste as cavidades corporais, chamamos o tecido conjuntivo que apóia o tecido epitelial adjacente de lâmina

própria. Dessa forma, a face do tecido epitelial voltada para a lâmina própria é chamada de porção basal ou pólo basal. A extremidade oposta da célula epitelial, voltada para a cavidade, se denomina porção ou pólo apical, a superfície formada pelos pólos basais das células epiteliais é chamada de superfície livre e as laterais das células, justapostas contiguamente, são chamadas de paredes laterais (Junqueira & Carneiro, 2004; Gartner & Hiatt, 1999).

A lâmina basal é uma estrutura que aparece na superfície de contato entre o tecido epitelial e o tecido conjuntivo adjacente, sendo somente é visível sob microscopia eletrônica. Com cerca de 20 a 100 nm de espessura, é formada por uma delicada rede de delgadas fibrilas, chamada de lâmina densa. Os componentes principais das lâminas basais são colágeno tipo IV, as glicoproteínas laminina e entactina e proteoglicanas (Gartner & Hiatt, 1999).

As lâminas basais não existem somente em tecidos epiteliais, mas também em todas as outras células que entram em contato com o tecido conjuntivo. Os componentes das lâminas basais são secretados pelas células epiteliais, musculares e adiposas, existindo também, fibras produzidas pelas células conjuntivas chamadas de fibras reticulares, que quando associadas à lâmina basal, formam a lâmina reticular (Gartner & Hiatt, 1999).

As lâminas basais têm várias funções, desde papel estrutural e filtradora de moléculas, podendo influenciar na polaridade das células, regular a proliferação e diferenciação celular se ligando a fatores de crescimento, influir no metabolismo celular, organizar as proteínas nas membranas plasmáticas das células ligadas a ela afetando a transdução de sinais que correm através das membranas celulares; até servindo como suporte e caminho para a migração de determinadas células. A lâmina basal também parece conter informações para algumas interações célula-célula (Junqueira & Carneiro, 2004).

Já a membrana basal é uma camada situada abaixo dos epitélios, formada pela fusão de duas lâminas basais ou de uma lâmina basal e de uma lâmina reticular, e por isso ela é bem mais espessa, medindo de 100 a 300 nm (Gartner & Hiatt, 1999)..

1.3. Formação do micronúcleo

Os micronúcleos emergem durante a mitose das células que constituem a camada basal do epitélio e aparecem como uma parte de DNA extranuclear, constituídos por fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal das células filhas durante o processo de divisão celular. (Majer *et al.*, 2001).

A formação de micronúcleos pode estar associada ao atraso da disposição do cromossomo na parte equatorial da célula, e conseqüentemente um cromossomo ou mais sofrem erros de disjunção e são simplesmente eliminados do núcleo principal. Assim, por representar danos nucleares, os micronúcleos podem ser utilizados como marcadores de anormalidades associadas a citotoxicidade ou genotoxicidade. Conseqüentemente os micronúcleos são indicadores de exposição individual a agentes físicos ou químicos presentes nos ambientes e que possam ser absorvidos, inalados ou ingeridos pelo indivíduo exposto (Tolbert *et al.*, 1991).

A formação de micronúcleos é um indicativo de genotoxicidade de um determinado agente capaz de causar mutações na fita de DNA, principalmente grandes deleções. Dessa forma, ocorre um aumento da instabilidade genética que é a causa subjacente ao desenvolvimento de neoplasias (Chaves, 1999).

Adicionalmente os eventos de caráter citotóxico e genotóxico podem resultar em material genético extranuclear, com a formação de estrutura semelhante ao micronúcleo clássico, além de serem eventos correlacionados com os processos de iniciação e/ou promoção tumoral (Tolbert *et al.*, 1991).

Existem alguns critérios que devem ser considerados para a correta classificação determinação da frequência de Micronúcleos. De acordo com da Cruz e colaboradores (1994) quatro aspectos devem ser observados: (1) o diâmetro do Mn deve ser menor que um terço do núcleo principal; (2) o Mn não deve ter refração; (3) a coloração do Mn não deve ser mais escura que a coloração do núcleo principal; (4) o Mn não deve estar unido ao núcleo.

Os eventos citotóxicos podem induzir ainda outros estados celulares como a formação de células com núcleo em forma de *broken egg* (Be).

Em geral, os biomarcadores são divididos em três grupos: o primeiro grupo de biomarcadores serve para definir a exposição aos agentes carcinogênicos, o segundo grupo de biomarcadores indica os efeitos biológicos dos agentes ambientais no tecido alvo e o terceiro grupo de biomarcadores fornecem dados informativos sobre a susceptibilidade individual a aquele tipo de exposição. (Bloching *et al.*, 2000).

A avaliação da frequência de micronúcleos é um marcador eficaz de genotoxicidade ou citotoxicidade de agentes ambientais de exposição individual. As células da mucosa oral em situações normais, renovam-se a cada três semanas. Assim os danos que são causados ao material genético das células da camada basal do epitélio geram fragmentos extranucleares, indicando a citotoxicidade ou genotoxicidade dos agentes aos quais os indivíduos estão expostos. (Bloching *et al.*, 2000)

2.0. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Grupo Amostral

No presente estudo, foram analisados 36 pacientes diagnosticados com câncer de hipofaringe, registrados no Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia (RCBP) da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG). Foram considerados apenas casos diagnosticados como carcinomas primários da hipofaringe, cuja Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O) varia de C12.0 a C13.9, incluindo as várias topografias possíveis para os tumores da hipofaringe.

Os pacientes com carcinoma da hipofaringe foram selecionados à partir dos registros provenientes do Registro de Câncer de Base Populacional, do Hospital Araújo Jorge, da ACCG. Os indivíduos que fizeram parte do grupo controle foram recrutados em clínicas ortopédicas, cirúrgicas e clínica geral, dos hospitais participantes do estudo, Hospital de Urgências de Goiânia (HUGO), Hospital Santa Casa de Misericórdia de Goiânia e Hospital Geral de Goiânia (HGG). O pré-requisito para a inclusão no grupo controle era de não ter nenhuma história e/ou suspeita de câncer nas vias aéreas superiores e região do pescoço, nenhum histórico médico de sintomas de doenças virais, uso de medicamentos e exposição à agentes químicos nos últimos seis meses.

A participação individual do grupo controle se deu de forma voluntária, onde os integrantes deste grupo estavam cientes da proposta do estudo e por ocasião da coleta das amostras biológicas, todas as dúvidas por eles apresentadas foram imediatamente sanadas. Todos os indivíduos responderam a um questionário contendo informações biométricas, hábitos e possíveis exposições ocupacionais a agentes genotóxicos. Ao final da entrevista, foi solicitada aos participantes, a assinatura de um termo de consentimento informado. Todos os registros tomados foram tratados como de caráter sigiloso e de natureza completamente confidencial.

2.2. Coleta das Amostras

A mucosa oral é formada pelo tecido epitelial pavimentoso estratificado não queratinizado. Este tecido apóia-se sobre a membrana basal que, por sua vez, está apoiada à lâmina própria, sendo constituído por várias camadas celulares. As células vão achatando a partir da lâmina basal e diferenciam-se à medida que se aproximam da superfície da mucosa.

(Junqueira e Carneiro, 2004). Assim, torna-se possível a coleta de células esfoliadas deste epitélio. As células coletadas foram do tecido epitelial estratificado não-queratinizado da mucosa oral, utilizando-se uma escova macia previamente umedecida em água.

Antes da coleta de material, solicitou-se ao participante que enxaguasse a boca com água potável, a fim de se eliminar possíveis resíduos de alimentos e reduzir a concentração de bactérias. Com movimentos ascendentes e descendentes, a escova foi friccionada na região interna das bochechas e gengivas. Com a escova, fizeram-se esfregaços em lâminas de microscopia, previamente limpas e secas. As lâminas foram transportadas, do Hospital Araújo Jorge para o Núcleo de Pesquisas Replicon, acondicionadas em câmara fria a, aproximadamente, 10°C. No laboratório, as lâminas foram fixadas em álcool etílico absoluto a 99,5°GL por 15 minutos e armazenadas a temperatura ambiente, para uma posterior hidrólise, coloração e análise citogenética em microscópio óptico.

2.3. Hidrólise, coloração e fixação das amostras

Os esfregaços das células da mucosa oral foram preparados em lâminas de vidro limpas e secas. Para hidrólise, as lâminas foram fixadas em álcool a 99,5 °GL.

Hidrólise das lâminas

Realizou-se a hidrólise a um título de 1:10 (10%), usando-se ácido clorídrico (HCl) e água destilada (H₂O_d). Ao se preparar a solução, acrescentou-se o ácido lentamente a fim de diminuir a evaporação e formação de bolhas. As lâminas foram deixadas em solução de HCl 10% por, aproximadamente, 2 minutos a temperatura ambiente e em seguida, por 6 minutos em banho-maria à 60°C, onde, previamente, havia-se esperado atingir a temperatura especificada para se colocar as lâminas. Finalmente, as lâminas foram levadas de volta à temperatura ambiente.

Coloração das lâminas:

Dissolveu-se 1g de fucsina básica em 200mL de água destilada a 100° C. A solução foi então filtrada em papel-de-filtro e manteve-se ao abrigo da luz.

Mergulharam-se as lâminas em solução de fucsina básica por 15 minutos ao abrigo da luz e logo após, enxaguou-se levemente com água para retirar o excesso de corante.

2.4. Contra-coloração com *Fast Green*

Foram depositadas 250 mg de *Fast Green* em um frasco, onde se adicionou etanol 95% em uma quantidade suficiente para 500mL.

Levou-se as lâminas à solução de *Fast Green* por 10 segundos. Passado o tempo, as lâminas foram enxaguadas em álcool a 70%.

2.5. Lavagem e retirada de depósitos

As lâminas foram então levadas à observação através de microscopia óptica. Aquelas lâminas que apresentaram depósitos de corantes, resíduos de luvas e outros materiais sofreram, após a coloração, uma bateria de lavagem com etanol a 95% por 1 minuto, butanol por 1 minuto, butanol/xileno, em uma mistura 50:50, por 1 minuto e, por fim, xileno, deixando-se no xileno até a montagem com o bálsamo do Canadá.

2.6. Análise Citogenética

As lâminas foram observadas em microscopia óptica, utilizando um aumento de 400 vezes. No decorrer da análise citogenética, buscou-se contar cerca de 5000 células para cada indivíduo. Uma maior quantidade de células observadas, aumenta a qualidade da observação, uma vez que se reduz o confundimento causado pela variabilidade individual ou acuidade do analizador. Durante a análise, somente células livres de manchas e depósitos, sem agrupamentos ou sobreposições, que não apresentavam cariólise e aquelas contendo núcleo intacto, foram consideradas. As alterações observadas foram anotadas e conferidas posteriormente.

Os fragmentos citoplasmáticos de DNA extranuclear foram contados como micronúcleos (MN) sob as seguintes condições: (1) citoplasma e núcleo principal (NP) intactos; (2) diâmetro máximo do MN de 1/3 do NP; (3) MN apresentando mesma coloração e textura do NP; e (4) MN no mesmo plano focal do NP (Bloching *et al.*, 2000; da Cruz *et al.*, 1994). Além dos micronúcleos, outras alterações citológicas foram consideradas como: (1) binucleação ou presença de dois núcleos numa única célula; (2) núcleo com aspecto *broken eggs*; (3) cariorréxis ou desintegração nuclear envolvendo perda da integridade do núcleo principal (Tolbert *et al.*, 1991).

2.7. Análise estatística

Na análise estatística, foi utilizado o teste *t* (student) para cálculo da significância e testes de correlação para a comparação entre o grupo exposto e o grupo controle. Os cálculos foram desenvolvidos utilizando o programa Microsoft Excel 2002® (*Microsoft Corporation, EUA*).

Inicialmente, foram calculadas as frequências das alterações analisadas, dividindo o número de observações pela quantidade de células contadas, em torno de 5000 por indivíduo. As frequências médias foram comparadas entre os grupos caso e controle pelo teste *t* de Student, bicaudal, comparando as médias e presumindo variâncias diferentes. O nível crítico de rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0,05$), valor muito frequentemente utilizado na literatura (Beiguelman, 1996).

O teste estatístico escolhido pressupõe que as variâncias dos dois intervalos de dados sejam diferentes. Isso porque, este teste, em particular, é utilizado para determinar se as médias apresentadas pelos dois grupos de amostras são iguais, quando os grupos em estudos são considerados diferentes (Beiguelman, 1996; Wassertheil-Smoller, 1995).

3.0. RESULTADOS

As principais características que descrevem o perfil dos 72 indivíduos, que participaram deste estudo, foram coletadas do questionário aplicado previamente à coleta das amostras. As características relacionadas com sexo e idade estão contidas na Tabela 3.1.

A distribuição percentual de casos de câncer de hipofaringe dentre os indivíduos estudados entre os dois sexos demonstrou um acometimento maior da doença pela população masculina, em uma proporção muito maior em relação aos casos femininos, de 1 caso feminino para 17 casos masculinos.

Tabela 3.1 Resultado da análise estatística descritiva das variáveis da idade e sexo dos indivíduos participantes do estudo.

Grupo	Caso (n = 36)	Controle (n = 36)
Sexo	Média de Idade (anos) $\pm$ DP Intervalo (anos)	
Masculino (n = 34)	58,8 $\pm$ 12,4	49,5 $\pm$ 12,6
Intervalo	25 83	21 78
Feminino (n = 2)	60 $\pm$ 1,4	54 $\pm$ 1,8
Intervalo	59 61	48 60
Total (n = 36)	58,8 $\pm$ 12,0	57,0 $\pm$ 12,3
Intervalo	25 83	21 78

Observou-se também a grande amplitude de idade apresentada pelos indivíduos do sexo masculino, com representantes variando da 3 e atingindo até a 9 década de vida, um intervalo de aproximadamente 58 anos, muito maior que o apresentados pelas mulheres, que apresentaram um valor de apenas 2 anos e idade mais avançada, final da sexta década de vida.

Referente aos hábitos de vida, cerca de 86% (31/36) dos casos e 80,5% (29/36) dos controles fumavam. O etilismo foi observado em 58,3% (21/36) dos casos e 50% (18/36) dos controles (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Resultados da análise estatística descritiva dos hábitos de vida dos casos e controles do estudo, distribuídos por sexo.

Hábitos de vida	Sexo	Caso (n = 36)		Controle (n = 36)	
		Número	(%)	Número	(%)
Tabagistas	Masculino	30	83,3	27	75
	Feminino	1	2,8	2	5,5
	Ambos	31	86	29	80,5
Não Tabagistas	Masculino	4	11,1	7	19,5
	Feminino	1	2,8	0	0
	Ambos	5	13,9	7	19,5
Total		36	100	36	100
Etilistas	Masculino	21	58,3	17	47,2
	Feminino	0	0	1	2,8
	Ambos	21	58,3	18	50
Não Etilistas	Masculino	13	36,1	17	47,2
	Feminino	2	5,6	1	2,8
	Ambos	15	42	18	50
Total		36	100	36	100

Quando analisados sob o tempo médio de consumo de tabaco, a prática desse hábito entre os casos foi de 48 anos, chegando ao extremo de 61 anos de consumo de fumo. Para o grupo controle, o tempo foi de cerca de 32 anos (Tabela 3.3). Em relação ao etilismo, houve pouca diferença no tempo de consumo para ambos os grupos avaliados.

Tabela 3.3 Tempo médio do hábito de fumar, apresentado pelos indivíduos estudados do grupo controle e casos

Hábito de vida	Sexo	Caso	Controle
		TM (anos) $\pm$ DP	TM (anos) $\pm$ DP
Tabagistas	Masculino	55 $\pm$ 9,2	32 $\pm$ 9,3
	Feminino	27 $\pm$ 17,6	24 $\pm$ 7,2
	Ambos	48 $\pm$ 14,8	32 $\pm$ 8,7

A análise estatística das alterações nucleares (tabela 3.4), observadas nos grupos caso e controle não mostrou diferença significativa quando analisados somente micronúcleos, exceto para as células binucleadas e núcleos em forma de *broken-eggs* ($p = 0,003$).

Foi observada também uma grande quantidade de núcleos picnóticos, o que pode sugerir uma exposição do tecido epitelial dos indivíduos a agentes citotóxicos.

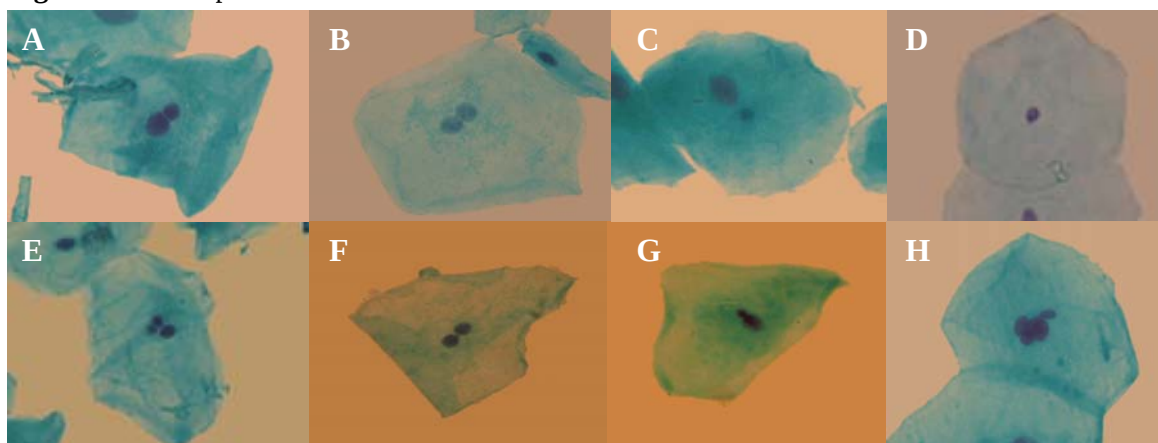
Tabela 3.4. Análise estatística das alterações nucleares observadas para os grupos caso e controle, mostrando as frequências percentuais e as probabilidades de diferença entre as frequências.

Grupo	Micronúcleo			Binucleada			Broken Eggs			Cariorréxis		
	<i>n total</i> *	<i>f (%)</i> **	<i>p</i>	<i>n total</i>	<i>f (%)</i>	<i>p</i>	<i>n total</i>	<i>f (%)</i>	<i>p</i>	<i>n total</i>	<i>f (%)</i>	<i>p</i>
Caso	21	0,0116	0,906	373	0,207	0,003	243	0,135	0,002	603	0,335	0,002
Controle	19	0,0105		113	0,062		97	0,053		385	0,213	

n total*: número total de alterações nucleares, contado em todo o grupo; *f (%)*: frequência percentual média

As principais alterações nucleares que puderam ser observadas em células esfoliadas de indivíduos com câncer de hipofaringe estão na Figura 3.1.

Figura 3.1. Principais biomarcadores observados no estudo.



(A) Célula com núcleo em forma de *Broken egg*. (B) Célula binucleada. (C) Célula apresentando micronúcleo. (D) Célula com núcleo picnótico. (E) Célula binucleada com núcleo em forma de *Broken egg* (seta). (F) Célula binucleada. (G) Célula apresentando micronúcleo. (H) Células possivelmente sobrepostas, o que pode causar o confundimento na análise.

4.0. DISCUSSÃO

O aumento do dano genético no epitélio é um fator de risco associado ao aparecimento de tumores da cavidade oral, possivelmente está relacionado com o desenvolvimento de câncer na hipofaringe (Kayal *et al.*, 1993; Nair *et al.*, 1991; Sarto *et al.*, 1987). Dentre as várias alterações celulares possíveis, a formação de micronúcleos é um bom indicador de ação clastogênica sobre o material genético e, conseqüentemente, este marcador pode ser usado

para investigar a ação de agentes genotóxicos sobre o epitélio (Ghose & Parida, 1995; Tolbert *et al.*, 1991). Assim, a medida da frequência de MN induzido por agentes mutagênicos tem sido amplamente usada na análise de danos citogenéticos (Bloching *et al.*, 2000; Prasad *et al.*, 1995).

Vários estudos e análises de dados epidemiológicos têm mostrado que o hábito de fumar é o principal fator de risco para o desenvolvimento carcinogênico, pois expõe o epitélio da cavidade oral e das vias aéreas às agressões químicas e físicas derivadas do uso do tabaco, produzindo assim, eventos que podem levar à tumorigênese (Kim *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2002; Flamini *et al.*, 1998).

Os eventos genotóxicos de exposição podem induzir ainda, além de micronúcleos, diversos outros estados nucleares como a formação de células binucleadas ou núcleos do tipo *broken egg*. Uma outra situação de defesa celular contra o dano genético é a apoptose. Em regras gerais, a apoptose representa a morte celular programada por genes específicos. A apoptose também pode produzir núcleos picnóticos, cromatina condensada e cariorréxis (Tolbert *et al.*, 1992).

Maier e colaboradores, já em 1992, relacionava a associação entre o etilismo e o tabagismo crônicos como agentes que atuavam sinergisticamente, potencializando o desenvolvimento de neoplasias malignas, entre elas a laringe e a faringe, órgãos onde se encontra o sítio anatômico da hipofaringe. O risco de desenvolver câncer da laringe é de 5 a 35 vezes maior em fumantes que em não-fumantes; e cerca de 2 a 5 vezes maior em indivíduos etilistas crônicos e, finalmente, para indivíduos tabagistas e etilistas crônicos o risco relativo é 100 vezes maior (ACS, 2004). Com a hipofaringe, tais resultados não são diferentes, indivíduos fumantes apresentam um risco de 10 a 50 vezes maior e naqueles que associam o tabaco ao álcool, o risco relativo de desenvolver câncer de hipofaringe sobe para quase 90 vezes maior.

Outro fator que pode afetar a incidência de câncer de hipofaringe em indivíduos é uma possível infecção por agentes virais. Dentre eles os que mais se destacam na evolução dos carcinomas de cavidade oral, laringe e faringe são os vírus Epstein-Barr o vírus do herpes simples tipo II e, mais recentemente, o papiloma vírus humano (HPV). (Zur Hausen, 1999). Um elevado número de células com binucleação e a formação de núcleos em *broken eggs*, sugere que as células sofreram exposição a agentes que interferem, não diretamente sobre seus cromossomos no momento da migração da anáfase, mas no momento da divisão celular (Tolbert *et al.*, 1991).

O aumento na frequência das células binucleadas e de *broken eggs*, sugere que os mecanismos envolvidos na carcinogênese dos tumores da hipofaringe, comprometem a cariocinese na telófase do ciclo celular, em todo o tecido epitelial, da cabeça e pescoço, incluindo o da mucosa oral. O comprometimento da cariocinese tem sido considerado como um provável evento associado à infecção da cavidade oral por vírus e bactérias. Os agentes infecciosos causam distúrbios no ciclo celular, denominados efeitos patológicos nos tecidos, dificultando e desorganizando o processo de divisão das células esfoliadas. Desta forma, deve-se destacar a associação do HPV com os carcinomas da hipofaringe e outras patologias ligadas ao tecido epitelial de laringe e faringe, bem como da cavidade oral, como a papilomatose (Aaltonen *et al.*, 2002, Zur Hausen, 1999).

CAPÍTULO 4. A INFECÇÃO POR HPV EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMAS DE CABEÇA E PESCOÇO

Resumo

Estudos desenvolvidos desde o início da década de 1980 até a atualidade, apesar de extensos e aprofundados, ainda não nos permitem definir com precisão qual o possível papel do HPV na carcinogênese de cabeça e pescoço, no entanto, na cérvix uterina, o mesmo já se encontra bem muito bem estabelecido. Dentre os fatores que geram controvérsias, podemos destacar o achado freqüente de variados tipos de HPV em mucosa oral normal, numa incidência que varia de 0% a quase 100% em diversos estudos, com numerosos métodos de identificação, incluindo entre eles um método altamente sensível, a PCR. A importância da infecção pelo HPV na carcinogênese de células epiteliais é suportada pela capacidade dos HPVs de alto risco, principalmente os tipos 16 e 18, de imortalizar os queratinócitos orais, quando em análise *in vitro*. O processo de imortalização pode envolver a desativação de proteínas supressoras de tumores pré-formadas pelas oncoproteínas virais, o bloqueio da transcrição de genes supressores de tumores como resultado da inserção do oncogene do HPV, ou a estimulação da transcrição do oncogene celular pela inserção de seqüências ativadoras de transcrição derivadas do próprio genoma do HPV. No presente estudo, o grupo amostral foi constituído de 24 pacientes diagnosticados com carcinoma de hipofaringe. Os casos foram obtidos do Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia/GO da Associação de Combate ao Câncer em Goiás. Todos os pacientes considerados foram diagnosticados como carcinomas de hipofaringe (CID-O: C12.0 a C13.9). Todas as amostras foram submetidas a uma PCR com os *primers* genéricos MY09/11 e GP05/06 para detecção em amplo espectro do genoma de HPV. Posteriormente, utilizou-se a mesma abordagem, com os *primers* tipo-específico para HPVs 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45 e 58. Em 9 das 24 amostras utilizadas, foi observada amplificação com os *primers* genéricos, identificando-se o genoma de HPV em 37,5% (6/24) dos casos. Em 67% (6/9) das amostras, o genoma viral foi detectado por MY09/11 e em 33% (3/9) pelos *primers* GP05/06. As amostras positivas foram então submetidas a uma segunda PCR para a genotipagem dos HPVs, tendo sido observados os tipos 16, 18 e 45. Os tipos virais mais associados ao câncer da hipofaringe, no presente estudo, foram os HPV 16 e 18, presente em 6 amostras e o HPV45, encontrado em 1 amostra. Em um paciente foi observada a co-infecção de tipos virais de HPVs 16 e 18. Contudo, mesmo diante de tantas pesquisas realizadas, há muito para ser explorado, apesar de uma hipótese possível para a carcinogênese ser a interação sinérgica de carcinógenos químicos, virais, oncogenes e genes supressores de tumores.

Palavras-chave: Papilomavírus humano, oncogênese, genotipagem viral, carcinomas, hipofaringe.

Abstract

Studies about relationship between Human Papillomavirus (HPV) and cancer development are performed since 80's. Although the correlation of HPV and cervical cancer are well established, the possible role of HPV and head and neck cancer are still unclear. Among controversial factors of HPV and carcinogenesis of squamous epithelial cells, there is a viral incidence that oscillates from 0 to almost 100% on studies that includes a myriad of viral genome detect methods, such Blotting and PCR. Importance of HPV infection and epithelial carcinogenesis is related to capabilities of High risk HPV 16 and 18 to promote cell alterations, by tumor suppressor proteins inactivation, tumor suppressor genes blockage and insertions of HPV oncogenes. On present study, HPV detection and typing was performed on tumors derived from hypo pharynx of 24 patients diagnosed with cancer (CID-O: C12,0 to C13,9). All samples was submitted to PCR with generic primers MY09/11 and GP05/06, as specific primers to HPV 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45 and 58. Results shows that on 9 of 24 samples, HPV were detected by generic primers (a rate of 37,5%) and HPV types 16, 18 and 45 were identified, with a sample presenting coinfection of HPV 16 and 18.

Keywords: Human Papillomavirus (HPV), viral oncogenesis, PCR, Hypo pharynx, High risk HPV.

1.0. INTRODUÇÃO

Os Papilomavírus humanos oncogênicos (HPVs) têm uma associação bem estabelecida com o carcinoma anogenital e cervical uterino, entretanto, a relação do HPV com o carcinoma epidermóide oral, da laringe e faringe, apesar de já ter sido amplamente sugerida, ainda não está bem estabelecida. A possível relação do HPV na etiologia das lesões cancerizáveis e no câncer oral foi primeiramente estimada em 1983, quando foram descritas alterações citopáticas de HPV (coilocitos) em cânceres orais, idênticas àquelas previamente encontradas em lesões pré-cancerosas e carcinomas da cérvix uterina (Figura 4.1). A formação de um halo ao redor do núcleo celular, a coilocitose, é tida como um efeito citopático que sugere a infecção da célula por vírus, principalmente por HPV (Scully *et al*, 1985; Syrjänen *et al*, 1983).

No decorrer dos anos, vários estudos têm investigado o papel dos HPVs no carcinoma e em outras lesões orais potencialmente malignas, outros trabalhos indicam ainda que o HPV é um fator de risco independente para o carcinoma epidermóide oral. Contudo, os estudos do envolvimento do HPV na iniciação e progressão das neoplasias da cavidade oral e região laringofaríngea, ainda têm gerado resultados conflitantes (Bouda *et al.*, 2000).

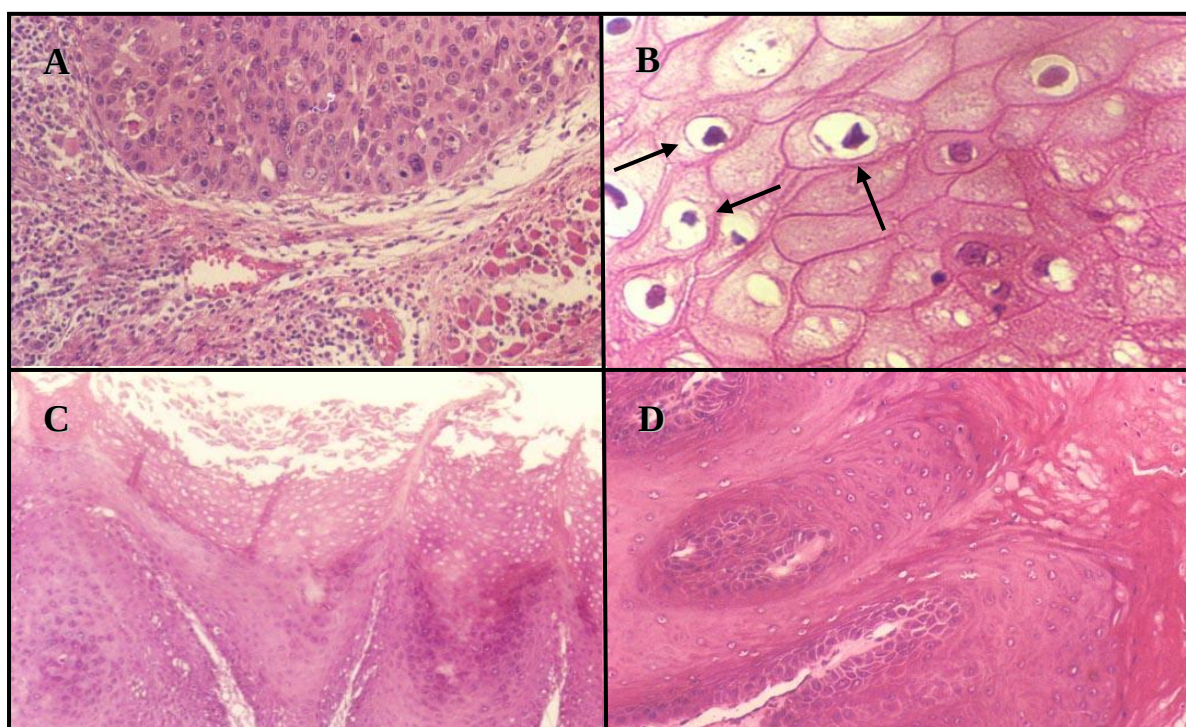


Figura 4.1. Cortes histopatológico do tecido da hipofaringe e da cavidade oral de pacientes com carcinoma epidermóide, corado por Hematoxilina-Eosina. **(A)** Em aumento de 400x. **(B)** Células de carcinoma oral com coilocitose (setas) em aumento de 1000x. **(C)** Células apresentando hiperqueratose, aumento de 100x. **(D)** Células epiteliais apresentando papilomatose em aumento de 200x.

A discrepância observada nos resultados é atribuída, principalmente, à variação da sensibilidade dos métodos empregados e a fatores epidemiológicos dos grupos de pacientes examinados. (Kojima *et al.*, 2002).

1.1. O Papilomavírus humano

Os papilomavírus são vírus ubíquos de DNA epiteliotrópicos, que infectam os epitélios cutâneo e mucoso, produzindo diversas neoplasias epiteliais benignas e malignas em animais e humanos. São associados com uma variedade rara de lesões orais, e têm aumentado a suspeita de que eles podem estar implicados em algumas lesões pré-malignas e malignas de laringe e faringe. É um vírus de 55 nm de diâmetro e contém proteína e uma molécula circular única enrolada de DNA de fita dupla. As partículas icosaédricas do papilomavírus contêm 72 capsômeros. Os HPVs são dependentes do meio de diferenciação terminal dos queratinócitos para replicação, síntese do capsídeo e montagem do vírus. Como a maioria dos vírus, os HPVs não podem ser suficientemente cultivados em culturas teciduais ou em modelos animais (Terai *et al.*, 2001).

O genoma do papilomavírus humano pode ser dividido em três regiões: uma região longa de controle (LCR, do inglês *long control region*), compreendendo cerca de 10% do genoma e as regiões precoce (E, do inglês *early*) e tardia (L, do inglês *late*). O alinhamento das seqüências de DNA do HPV revela uma organização genética de regiões que codificam proteínas virais, os quadros aberto de leitura (ORF, do inglês, *open reading frames*). Essas estão presentes em só uma fita de DNA e suas funções foram apontadas em parte através da comparação com a estrutura do papilomavírus bovino tipo 1 (HBV-1), o qual foi extensivamente caracterizado em linhagens celulares de camundongos geneticamente transformados (zur Hausen, 2000).

Em geral, as regiões E são expressas logo após a infecção e codificam as proteínas envolvidas na indução e regulação da síntese de DNA. Por outro lado, as regiões L são expressas em estágios posteriores da infecção e codificam as proteínas relacionada ao capsídeo viral. As regiões E são designadas E1 a E7, e a região L é dividida em regiões L1 e L2. Do ponto de vista da transformação celular, as regiões E5, E6 e E7 são de maior importância. A seqüência entre o fim de L1 e o começo de E6 é chamada de região longa de controle (LCR) e é conhecida também como região não codante (NCR, do inglês *Non-coding region*). Essa região contém muitas das seqüências regulatórias cis, que controlam a transcrição e a replicação do genoma viral (zur Hausen, 2000, Kitasato *et al.*, 1994).

Estudos indicam que existem evidências substanciais de que a progressão do câncer induzida pelo HPV é um processo de múltiplas etapas. Postula-se que as LCRs são um alvo direto de um mecanismo regulatório intra-celular. A progressão para a malignidade é acompanhada pela perda desse mecanismo intracelular de inspeção, o qual correlaciona-se com uma abundante expressão gênica viral (zur Hausen, 2000, Kitasato *et al*, 1994).

A infecção pelo HPV é iniciada quando uma partícula viral penetra em células basais e células indiferenciadas e em divisão do epitélio. Ao menor trauma, que ocorreria durante a relação sexual, através de sexo vaginal e/ou oral, permitiria ao vírus penetrar na camada basal do epitélio. Nas células basais e parabasais, o DNA viral replica em um baixo padrão e apenas genes precoces são transcritos, também em baixo padrão. A multiplicação extensiva do DNA viral e transcrição de todos os genes virais, bem como formação do capsídeo, ocorre apenas nas camadas mais superficiais do epitélio. O vírus multiplica-se exclusivamente no núcleo de células infectadas. Contudo, observa-se que a manifestação patológica associada ao HPV é confinada aos sítios onde a infecção foi iniciada (Teraí & Burk, 2001).

Partículas virais maduras, com capsídeos formados e completos, estão, portanto, ausentes nas células basais, e a replicação produtiva do HPV está restrita às células nos estratos espinhoso e granuloso do epitélio (zur Hausen, 2000).

De acordo com o potencial de risco de desenvolvimento de neoplasias malignas em humanos, a Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), em 1997, classificou os HPVs 16 e 18 como carcinogênicos em humanos (grupo 1), os HPVs 31 e 33 como provavelmente carcinogênicos em humanos (grupo 2A), e alguns dos tipos remanescentes de HPV como, possivelmente, carcinogênicos em humanos (grupo 2B). Outra classificação quanto ao potencial de malignidade classifica-os em tipos de baixo (6, 11), intermediário (31, 33, 35) ou alto risco de malignidade (16, 18). Podem ser classificados também de acordo com o sítio anatômico de infecção e/ou análise filogenética em HPVs mucosos e HPVs cutâneos (Kay, 2002; Sugerman & Shillitoe, 1997; van Ranst *et al*, 1996, De Villiers, 1989)

Shima e colaboradores (2000), sugeriram que o HPV é ubíquo e que achados comuns dos mesmos tipos de HPV (6, 11, 16 e 18) em mucosa genital e oral são um forte indicativo para a transmissão orogenital. Estudos revelaram ainda que o HPV tem um amplo tropismo no epitélio mucoso, podendo ser adquirido através de contato sexual, sendo a maioria das infecções por HPV, o produto de uma auto-inoculação de um sítio genital ou oral próprio para o outro. Outro fato observado nos estudos é que o HPV pode também ser transmitido ainda

precocemente, durante o nascimento, do trato genital da mãe para a cavidade oral da criança (Llewellyn *et al*, 2001; Lynch, 2000; Praetorius, 1997).

1.2. A presença de HPV em mucosas normais

Uma grande variação na incidência de infecção por HPV detectada em mucosa normal de indivíduos saudáveis tem sido relatada, numa extensão de 0% a 91,1% em vários estudos, usando variados métodos e em um número limitado de indivíduos. Verificou-se uma alta prevalência (91,1%) na cavidade oral normal de adultos usando um método altamente sensível, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polimerase Chain Reaction*). Foi sugerido que a prevalência do HPV incluiu infecções sub-clínicas e/ ou latentes e que a infecção com um baixo número de cópias do vírus é comum, ao menos na cavidade oral (Teraí, 1999).

Surpreendentemente, o HPV 18 foi o mais freqüente genótipo encontrado em mucosa oral normal. A infecção por HPV 18 na cavidade oral, sem lesões, sugere que o mesmo, de forma persistente e freqüente, infecta as mucosas, as quais podem então atuar como reservatórios de HPV. De qualquer forma, permanece ainda indefinido se a infecção por HPV 18 é subclínica e/ou latente e se é uma persistente e/ou transitória. Por outro lado, outros estudos encontraram uma maior prevalência do HPV 16 em mucosa oral normal, presente de forma assintomática ou latente. Enfim, sob uma visão mais ampla, a literatura define que os HPVs 6, 11, 16 e 18 são os mais prevalentes nas mucosas, sobretudo em mucosa oral. Desde que se tornou claro que a infecção por HPV da mucosa oral normal é comum, as funções patogênicas do HPV no desenvolvimento de câncer permanecem, ainda que correlacionadas, indefinidas e limitadas (Giovanelli *et al*, 2002; Gillison *et al*, 2000; Praetorius, 1997).

1.3. Os HPVs e a Carcinogênese

A importância da infecção pelo HPV na carcinogênese de células epiteliais é suportada pela capacidade dos HPVs de alto risco, principalmente os tipos 16 e 18, de imortalizar os queratinócitos orais, quando em análise *in vitro* (Sugerman & Shillitoe, 1997).

O processo de imortalização pode envolver a desativação de proteínas supressoras de tumores pré-formadas pelas oncoproteínas virais, o bloqueio da transcrição de genes supressores de tumores como resultado da inserção do oncogene do HPV, ou a estimulação da transcrição do oncogene celular pela inserção de seqüências ativadoras de transcrição derivadas do próprio genoma do HPV. Desta forma, a infecção de queratinócitos com HPV de

alto risco pode ser envolvida na patogênese de alguns carcinomas epidermóides orais, como também carcinomas de laringe e faringe. A prevalência do HPV nos carcinomas tem variado de 0% a 100% nos trabalhos da literatura, principalmente por variações no tamanho da amostra, população estudada e sensibilidade das técnicas empregadas. Entretanto, em lesões genitais, como condilomas, neoplasias intraepiteliais e carcinomas escamosos cervicais, o HPV tem sido reconhecido atualmente como agente causal inequívoco (Giovanelli *et al*, 2002).

Sabe-se que a proteína E7 do HPV-16 é capaz de ligar-se à pRb, que regula a transição G1/S do ciclo celular, seqüestrando-a, como possível mecanismo pelo qual o HPV poderia contribuir para a carcinogênese. O complexo E7-pRb é detectado em queratinócitos humanos transformados, apesar do mesmo não ser considerado essencial para a imortalização dessas células. Proteínas E7 de HPVs de alto e baixo risco são completamente similares na composição de aminoácidos e organização estrutural, diferindo em seu potencial de transformação e em outras propriedades bioquímicas. As proteínas E7 dos HPVs de alto risco formam complexos de alta afinidade com várias proteínas celulares do hospedeiro, incluindo a pRb, enquanto aquelas dos HPVs de baixo risco ligam-se com baixa afinidade (Lee *et al*, 1998).

A proteína E7 liga-se preferencialmente à pRb hipofosforilada. Como resultado, os fatores de transcrição E2F são liberados da pRb e ativados. Esses fatores induzem a transcrição de genes importantes no controle da divisão celular, por promover a progressão do ciclo celular, atuando nas fases G1 e S (Hanahan & Weinberg, 2000).

A proteína E6 do HPV também demonstra desempenhar um importante papel na transformação celular, graças à sua capacidade para formar complexo com a p53, que protege a integridade do genoma celular. Esta oncoproteína dos HPVs tipos 16 e 18, têm mostrado não só a capacidade de formar este complexo, mas também de degradar a p53, por um caminho ubiquitina dependente (Summersgill *et al*, 2000).

A proteína E6 do HPV é um polipeptídeo composto por cerca de 150 aminoácidos, com um aparente peso molecular de 18kD. Esta proteína tem uma meia-vida de 30 minutos a 4 horas em células transformadas. Suas atividades oncogênicas têm sido refletidas em muitas análises, incluindo a capacidade de imortalização de células primárias, transformação de linhagens celulares estabelecidas, resistência à diferenciação terminal, tumorigênese e anulação do ponto de checagem do ciclo celular (Shima *et al*, 2000).

Uma vez estabelecida a ligação entre a proteína E6 e a p53, a proteína viral estimula a degradação da proteína residente, o que leva esta última a níveis muito baixos em muitos

tumores humanos, o que faz com que as células desses tumores falhem na parada do ciclo celular em G1, seguindo então o dano no DNA celular (Hanahan & Weinberg, 2000).

Desde que a proteína E6 do HPV liga-se e degrada a p53, é intuitivo propor que ela suprimiria a apoptose. De fato, muitos estudos nos últimos anos associando a proteína E6 a este evento celular têm sido realizados onde é observada uma interferência desta proteína neste mecanismo em diferentes linhagens celulares e em resposta a diferentes agentes indutores (Hanahan & Weinberg, 2000).

Recentes evidências sugerem que o gene E5 do HPV16 também pode induzir transformação em células epiteliais, possivelmente aumentando a transdução de sinal intracelular mediado por fatores de crescimento. Sendo assim, genes E5, E6 e E7 do HPV induziriam a transformação celular e poderiam estar envolvidos na carcinogênese (Uobe *et al*; 2001).

A integração do DNA viral também é responsável por prejuízo genético, e a localização cromossômica da integração do HPV foi mapeada. Essas contribuições virais são eventos precoces no desenvolvimento do câncer, e a integração viral pode ser um indicador de um prognóstico pobre. O tipo de dano genético poderia ocorrer de diferentes formas, tal como amplificação gênica, translocação cromossomal e perda da heterozigose (LOH) na integração do HPV35 (Shima *et al*, 2000).

Na grande maioria dos tumores e linhagens celulares estudadas, no processo de integração do DNA do vírus na célula hospedeira, ocorre uma clivagem no DNA viral em algum ponto localizado entre os genes E1 e E2 ou entre E1 e L1. Quando esta separação ocorre, parece acontecer, como consequência imediata, a interrupção do controle transcricional exercido pela unidade de tradução (ORF) E2 sobre os genes da região precoce. Isso resultaria na expressão aumentada das proteínas E6 e E7, o que provocaria uma proliferação celular descontrolada e a instalação do processo neoplásico. O genoma do HPV replica-se como um episssomo em lesões benignas e pré-invasivas, mas é integrado ao DNA celular na maioria dos cânceres. Entretanto, a integração do HPV no DNA do hospedeiro parece não ser comum no câncer oral (Miller & Johnstone, 2001; Shima *et al*, 2000).

1.4. Detecção molecular do HPV

Os avanços no campo da genética e biologia molecular têm contribuído decisivamente para o estudo dos Papilomavírus humanos. A detecção direta dos genomas do HPV e seus transcritos pode ser conseguida com procedimentos que incluem imunoperoxidase,

hibridizações *Southern blot*, *Northern blot*, *dot blot* e *in situ*, PCR, captura híbrida e sequenciamento de DNA, entre outros (Teraí & Takagi, 2001).

A sensibilidade e especificidade dos vários métodos de detecção do HPV disponíveis variam amplamente. São três as categorias que avaliam a sensibilidade dos métodos de análise: os de baixa sensibilidade (imunoperoxidases, imunofluorescências e as hibridizações *in situ*), por só detectarem o vírus quando presente em mais de 10 cópias do DNA viral por célula; os considerados de moderada sensibilidade (*Southern blot*, *dot blot* e *hibridização dot reversa*), por só detectarem o vírus quando de 1 a 10 cópias do DNA viral estiverem presentes e os de alta sensibilidade (PCR), por detectarem o vírus quando menos de uma cópia do DNA viral estiver presente. É muito importante, de qualquer modo, considerar em que contexto o método está sendo usado. A hibridização *Southern blot* é considerada como padrão de análise do genoma do HPV e requer fragmentos de DNA de comprimento total. Muito valiosa atualmente por oferecer informações adicionais importantes, como integração viral e subtipagem. Entretanto, de todas as técnicas de detecção de DNA do HPV, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é a mais sensível. Mais de 140 tipos de HPV foram identificados até o presente. Desses, 24 tipos foram associados com lesões orais (HPV-1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 35, 45, 52, 55, 57, 59, 69, 72 e 73). Sendo o tipo de HPV mais prevalente, tanto em lesões orais como em lesões genitais o HPV 16 e 18 (Bouda *et al.* 2000).

Através da PCR, pequenos segmentos de DNA são amplificados, sendo, portanto, considerado um método de grande sensibilidade. Pode então amplificar genomas de HPV que resultem em um aumento exponencial e reprodutível das seqüências de ácidos nucléicos presentes no espécime biológico. Sob ótimas condições experimentais, é o método de detecção mais sensível. Os métodos de amplificação de DNA devem assegurar qualidade, pureza e no caso da PCR deve-se evitar contaminação. Tecidos fixados e embebidos em parafina podem também causar problemas por causa do tempo de fixação e o tipo de fixador usado pode afetar consideravelmente a qualidade dos ácidos nucléicos extraídos. Na seleção de um método adequado, esses fatores devem sempre ser considerados.

Dois métodos mais amplamente usados e que têm equivalência em sensibilidade são captura híbrida e PCR com *primers* gerais. Este tipo de PCR é potencialmente capaz de detectar todos os HPVs mucosos. Protocolos genéricos de PCR extensivamente aplicados fazem uso de um dos pares de *primers* consenso GP5+/GP6+ e *primers* degenerados MY09/1142. A distinção total de mais de 40 tipos pode ser conseguida por hibridização *dot blot* aplicando múltiplas sondas tipo-específicas⁴³ ou polimorfismos de comprimentos dos fragmentos de restrição (RFLP).

2.0. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Grupo amostral

O grupo amostral foi constituído de 24 pacientes diagnosticados com carcinoma de hipofaringe. Os casos foram obtidos do Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia/GO da Associação de Combate ao Câncer em Goiás. Todos os pacientes considerados foram diagnosticados como carcinomas de hipofaringe (CID-O: C12.0 a C13.9). A participação foi de caráter voluntário e no ato da coleta da amostra, os pacientes foram submetidos a uma entrevista e preencheram um questionário sobre hábitos de vida para determinar possíveis associações entre hábitos e os carcinomas da hipofaringe.

2.2. Obtenção das amostras

As amostras biológicas dos tumores foram obtidas na ocasião de realização de biópsias ou cirurgias. Após a retirada cirúrgica, as biópsias foram transportadas em câmara fria, em temperatura média de 10°C, armazenadas sem conservantes e fixadores em criotubos e acondicionadas a -80°C até o momento do uso.

2.3. Extração de DNA

Para a extração de DNA, as biópsias foram levadas à temperatura ambiente, onde o tecido sofreu ação de enzimas proteolíticas. Posteriormente, o tecido tratado foi submetido à extração do DNA com o *kit* de purificação do DNA genômico *Wizard*[®] (*Promega Corporation, EUA*), seguindo-se, todas as instruções do fabricante (Anexo 9).

2.4. Reação em cadeia da Polimerase

Todas as amostras foram submetidas a uma primeira PCR com os *primers* genéricos MY09/11 e GP05/06 para detecção em amplo espectro do genoma de HPV. Em seguida, fez-se uma segunda PCR com os mesmos *primers*, utilizando o produto da PCR anterior. Assim, as amostras só foram consideradas negativas para o HPV após serem submetidas a duas PCRs, com posterior repetição das reações para confirmação do resultado. Posteriormente, utilizou-se a mesma abordagem, com os *primers* tipo-específico para HPVs 6, 11, 16, 18, 33, 35, 45 e 58 (Jacob *et al.*, 2002; Hart *et al.*, 2001; Fernández-Contreras *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000; Karlsen *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1995).

As amostras foram também submetidas à PCR para amplificação de fragmentos genômicos específicos do gene da β -Globina humana. Para isso, foi utilizado o *primer*

D8S135 (GIBCO - Life Technologies). O primer D8S135 é muito usado para controle e comprovação de amplificação de material humano, principalmente pelo fato de amplificar fragmentos gênicos que se repetem em várias regiões cromossômicas (FÜZESI et al., 1997).

A sequência dos *primers* e o tamanho esperado dos fragmentos amplificados encontram-se na Tabela 4.1 e na Figura 4.2. O protocolo termal completo da PCR encontra-se no Anexo x.

Tabela 4.1. Sequências consenso dos *primers* utilizados na genotipagem e o tamanho esperado do fragmento amplificado, segundo Karlsen e colaboradores (1996).

Tipos	S*	Sequências 5' → 3'	Fragmento (pb)
HPV 6	F	CAC GTC TGC AAC GAC CAT AG	195
	R	CCA TGA AAT TCT AGG CAG CA	
HPV 11	F	CGC AGA GAT ATA TGC ATA TGC	90
	R	AGT TCT AAG CAA CAG GCA CAC	
HPV 16	F	TCA AAG CCA CTG TGT CCT GA	119
	R	CGT GTT CTT GAT GAT CTG CAA	
HPV 18	F	CCG AGC ACG ACA GGA ACG ACT	172
	R	TCG TTT TCT TCC TCT GAG TCG CTT	
HPV 33	F	AAC GCC ATG AGA GGA CAC AAG	211
	R	ACA CAT AAA CGA ACT GTG GTG	
HPV 35	F	CCC GAG GCA ACT GAC CTA TA	230
	R	GGG GCA CAC TAT TCC AAA TG	
HPV 45	F	ACC AGA TTT GTG CAC AGA AT	236
	R	TTT TTT CCA GTG TCT CTC CA	
HPV 58	F	GGA CAT TGC ATG ATT TGT GT	314
	R	TTT CTT GTG GAC ACA ATG GT	
D8S135	F	GGG AGG CTT TAT AAT TAT TTA GC	100
	R	CTG GGC AAC AGA GTG GGA C	
MY 09	R	CGT CCA AGA GGA TAC TGA TC	450
MY 11	F	GCC CAG GGT CAT AAC AAT GG	
GP 05	F	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC	170
GP 06	R	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C	

*S: Sentido - F: *Forward* (Direto) e R: *Reverse* (Reverso).

Resumidamente, o *mix* para amplificação por PCR foi composto por um volume final de 25 µL para cada amostra, contendo 10 µL de DNA amostral, 2µL de cada *primer* a uma concentração de 15 pM/µL, 0,2 µL de Taq Polimerase (Promega®, USA) a concentração de 5u/µL; 2,5 µL de tampão para PCR 1x contendo 50 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl em pH 8,3; 1,5mM MgCl mais 200 µM de cada dNTP. O volume foi completado com 10,3 µL de água destilada. O protocolo de amplificação utilizado no experimento baseou-se no procedimento de termociclagem em *touchdown* (Gráfico 4.1), sugerido por da Cruz (1997),

onde se diminui gradativamente a temperatura de anelamento de forma a ampliar a concorrência dos *primers* com a região alvo até seu ponto ótimo. Desta forma a ação da enzima Taq polimerase é potencializada, aumentando assim a probabilidade de amplificação e, conseqüentemente, a quantidade de material amplificado. O protocolo em *touchdown* foi somente utilizado para os *primers* genéricos.

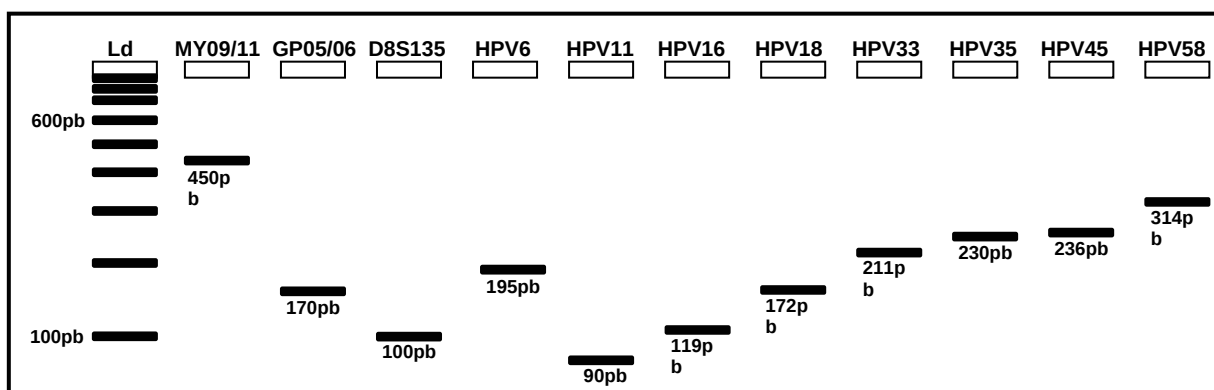


Figura 4.2. Diagrama esquemático da posição das bandas amplificadas pelos *primers* descritos na Tabela 4.1. Ld: marcador de tamanho de 100pb (*Promega Corporation, EUA*). Figura baseada em Silva e colaboradores, 2003.

Foi utilizado um termociclador *Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler AB (Applied Biosystems, Applied)* onde se submeteu o material à uma desnaturação inicial a temperatura de 95°C por um período de 5 minutos, seguida por 10 ciclos contínuos de desnaturação à 95°C por 1 minuto, anelamento iniciando a 60°C e baixando 1°C a cada ciclo até atingir a temperatura de 50°C no último ciclo e extensão a 72°C por um minuto. Terminada esta fase, o material foi então submetido a mais 30 ciclos contínuos de desnaturação à 95°C, por 1 minuto, seguida de anelamento a 51°C por mais 1 minuto e extensão a 72°C por mais um minuto. Terminados os 30 ciclos, o material permaneceu por mais 5 minutos à temperatura de 72°C de forma a favorecer um maior tempo de extensão. Com a totalidade dos 40 ciclos, as possíveis cópias da região alvo espera-se estarem em número de bilhões (Griffiths *et al.*, 1998).

2.5. Análise dos fragmentos de PCR

O material amplificado por PCR, foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% em solução tampão TBE a 2x para a análise dos produtos (Anexo x e Anexo x). Para a visualização do DNA amplificado, o gel foi corado em banho de solução de brometo de etídio (5µg/mL) por 15 minutos ou por impregnação por nitrato de prata (Anexo

x). As imagens foram capturadas e reveladas pelo sistema de vídeo documentação *ImageMasterVDS*[®] (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) [Anexo x].

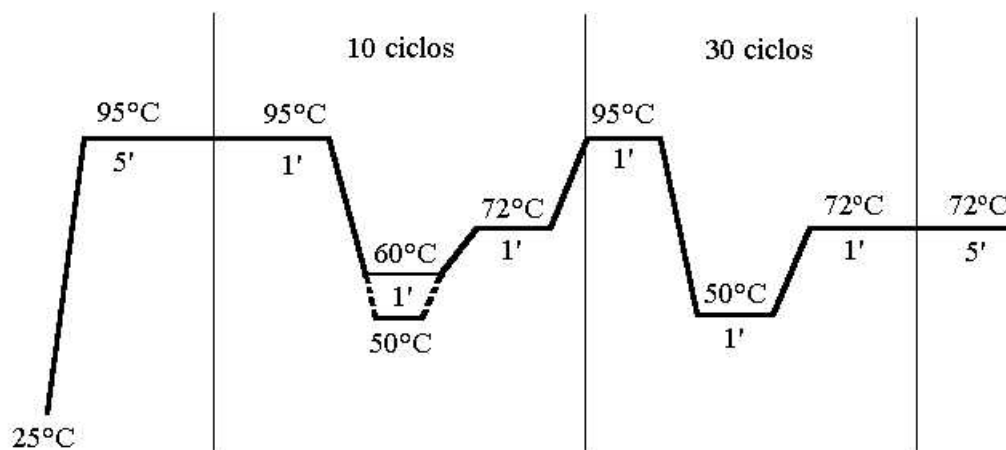


Gráfico 4.1. Protocolo de termociclagem em *touchdown*, utilizado para amplificação dos fragmentos de genoma de HPV utilizando os *primers* genéricos.
Fonte: da Cruz (1997)

3.0. RESULTADOS

O grupo amostral foi composto por 22 (91,7 %) homens e 2 (8,3%) mulheres, diagnosticados com câncer de hipofaringe. A média das idades do grupo foi de 59 anos e 4 meses, sendo a região mais acometida o seio piriforme, com 21 (87,5%) casos. Um total de 23 (95,8%) casos apresentou a morfologia de carcinoma espinocelular invasivo e 17 (70,8%) pacientes foram diagnosticados nos estádios avançados III e IV da doença (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Estatística descritiva dos casos participantes da avaliação molecular dos carcinomas de hipofaringe.

Grupo	Número		Média de Idades (anos) $\pm$ DP	Topografia		Morfologia		Estadiamento	
	n	f(%)		Sítio	n f(%)	Tipo	n f(%)	Estádio	n f(%)
Mas	22	91,7	59 $\pm$ 12,9	Seio Piriforme	19 79,1	CEC	0 0	I	3 12,5
				Região Pós-Cricóidea	0 0	CEC invasor	21 87,5	II	4 16,6
				Parede posterior da hipofaringe	1 4,2	SOE	1 4,2	III	6 25
				Hipofaringe SOE	2 8,3			IV	9 37,5
Fem	2	8,3	58 $\pm$ 5,6	Seio Piriforme	1 4,2	CEC	0 0	I	0 0
				Região Pós-Cricóidea	1 4,2	CEC invasor	2 8,3	II	0 0
				Parede posterior da hipofaringe	0 0	SOE	0 0	III	1 4,2
				Hipofaringe SOE	0 0			IV	1 4,2
Total	24	100	59 $\pm$ 12,4		20 100		20 100		20 100

Em 9 das 24 amostras utilizadas, foi observada amplificação com os *primers* genéricos, identificando-se o genoma de HPV em 37,5% (6/24) dos casos. Em 67% (6/9) das

amostras, o genoma viral foi detectado por MY09/11 e em 33% (3/9) pelos *primers* GP05/06. As amostras positivas foram então submetidas a uma segunda PCR para a genotipagem dos HPVs, tendo sido observados os tipos 16, 18 e 45. Os tipos virais mais associados ao câncer da hipofaringe, no presente estudo, foram os HPV 16 e 18, presente em 6 amostras e o HPV45, encontrado em 1 amostra. Em um paciente foi observada a co-infecção de tipos virais de HPVs 16 e 18.

4.0. DISCUSSÃO

Estudos desenvolvidos desde o início da década de 1980 até a atualidade, apesar de extensos e aprofundados, ainda não nos permitem definir com precisão qual o possível papel do HPV na carcinogênese de cabeça e pescoço, no entanto, na cérvix uterina, o mesmo já se encontra bem muito bem estabelecido. Dentre os fatores que geram controvérsias, podemos destacar o achado freqüente de variados tipos de HPV em mucosa oral normal, numa incidência que varia de 0% a quase 100% em diversos estudos, com numerosos métodos de identificação, incluindo entre eles um método altamente sensível, a PCR (Aaltonen *et al.*, 2002; Scully *et al.* 1985).

O emprego de métodos de alta sensibilidade é uma condição fundamental para a realização de estudos de prospecção e alta confiabilidade. Nesse contexto, a técnica que reúne o mais elevado padrão de sensibilidade e especificidade é a Reação em Cadeia da Polimerase, por permitir uma identificação e tipificação precisas do vírus (Aaltonen *et al.*, 2002).

Quanto à população estudada, sugeriu-se que a prevalência de infecção é mais alta em lesões de pacientes da Índia e mais baixa nos países ocidentais (América do Norte e Brasil), o que influi significativamente nos resultados, além do fato de que quanto maior a amostra empregada no estudo, mais confiáveis serão os resultados. Um outro aspecto a ser destacado, é a existência de outros carcinógenos que atuam sobre o epitélio de revestimento da mucosa oral, e dentre eles assumem importante destaque o fumo e o álcool, que pela potência e freqüência, têm uma ação oncogênica comprovada sobre os epitélios oral, laríngeo e faríngeo, o que dificulta ainda mais o estudo sobre a ação do HPV, pela coexistência de dois outros agentes tão ou mais importantes do que esse ora estudado (Bosso *et al.*, 2002; Zur Hausen, 1999; Gonshebbatt, 1997).

Contudo, diante dos resultados obtidos no presente estudo, fica clara que a participação do HPV na carcinogênese está associada a uma parte dos carcinomas e que a sua ação nesse processo tem características sinérgicas, ou seja, possivelmente está associada a outros carcinógenos químicos e físicos de grande importância, como o fumo e o álcool.

Um percentual considerável de carcinomas de hipofaringe estaria também associado à ação das proteínas virais E5, E6 e E7, sem a participação efetiva de carcinógenos químicos e físicos, como pode se observar em pacientes que desenvolveram câncer de hipofaringe e não apresentavam hábito de tabagismo ou etilismo crônico (Terai, 2001).

O papel dos HPVs de alto risco na carcinogênese tem se tornado mais evidente a cada dia. A grande maioria dos trabalhos publicados envolvendo o papel do vírus nesse processo, nos mais diversos países, em mostrado um índice de positividade mínimo de 20%. Além disso, a imortalização de ceratinócitos orais *in vitro* por HPVs de alto risco tem sido comprovada por vários pesquisadores, ratificando a importância desse vírus como um agente biológico carcinogênico. Não obstante, o papel das proteínas E5, E6 e E7 dos HPVs de alto risco tem sido elucidado a cada dia mais, enfatizando a participação do vírus no processo carcinogênico, ao induzirem transformação celular (Terai, 2001; Villa, 1999).

Apesar do grupo estudado não apresentar um grande número amostral, tais indivíduos são representativos de grande parte dos pacientes diagnosticados com tumores de hipofaringe em Goiânia, registrados por um período superior a cinco anos. No presente estudo, corroborado por resultados obtidos por Villa e colaboradores (1999), observou-se a infecção por HPV em células mucosas epiteliais de indivíduos com diagnóstico de câncer de hipofaringe em uma frequência de 37,5% dos casos. Destes, mais de 65% estavam infectados por tipos de HPVs definidos como de alto risco oncogênico (HPVs 16 e 18) o que vem a indicar ainda mais a relação desses HPVs com o desenvolvimento de carcinomas de cabeça e pescoço, assim como acontece com os cânceres cervicais.

Contudo, mesmo diante de tantas pesquisas realizadas, há muito para ser explorado, apesar de uma hipótese possível para a carcinogênese ser a interação sinérgica de carcinógenos químicos, virais, oncogenes e genes supressores de tumores. Desta forma, métodos de detecção eficazes e medidas preventivas são absolutamente imprescindíveis na batalha contra o vírus carcinogênico HPV e a busca de evidências cada vez mais fortes da sua participação na carcinogênese de cabeça e pescoço, tem sido e será motivo de estudo para muitos pesquisadores da área na atualidade e no futuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALTONEN LM, RIIKANEN H, VAHERI A. Human papillomavirus in larynx. **The Laryngoscope** 2002;112:700-7.

AMAR, A.; CARVALHO, M. B.; RAPOPORT, A. Metastatização linfática oculta no carcinoma epidermóide das vias aerodigestivas superiores. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v.68, n.4 , pp.558-561. 2002.

BARALLE, R. *et al.* Sister chromatid Exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1.650 subjects in an Italian population: II. Contribution of se, age nd lifestyle. **Enviromental Molecular Mutagenesis**, n. 31. pp.228-242. 1998.

BLOCHING, M; HOFMANN, A; LAUTENSCHLAGER, CH; BERGHAUS, A AND BOSCH, FX & MUNOZ, N. Human papillomavirus and cervical neoplasia: a critical review of the epidemiological evidence. **IARC Sci Publ**1989;94:135-51

BOUDA M, GORGOULIS VG, KASTRINAKIS NG, GIANNOUDIS A, TSOLI E, DANASSI-AFENTAKI D *et al.* "High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. **Mod Pathol** 2000; 13(6):644-53.

BRANDÃO, LG & FERRAZ, AR. **Cirurgia de Cabeça e Pescoço**. 1ed. Livraria Roca LTDA. São Paulo, v. I. p. 832. 1989.

BRANDÃO, LG & FERRAZ, AR. *Tumores Malignos da Hipofaringe*. Cirurgia de Cabeça e Pescoço. 1ed. Livraria Roca LTDA. São Paulo, 1989. v. I. Cap. 36, p. 372 -373.

CAMARGO, RS. & FERREIRA, EAB. *Anatomia Básica da Faringe, do Esôfago Cervical e do Mediastino Superior*. In. BRANDÃO & FERRAZ. Cirurgia de Cabeça e Pescoço. 1ed. Livraria Roca LTDA. São Paulo, v. I. Cap. 31, pp.329-339. 1989.

CHAVES, S. R.; CHAVES FILHO, J. T.; FONTES, B.T.; OLIVEIRA, M. U. P.; CUNHA, E.C.F.C.; NETTO, P.L.S.; BORGES, F.R. Frequência de Micronúcleos em Células Esfoliadas da Mucosa Oral de Indivíduos Ocupacionalmente Expostos ao Pó de Mármore e Granito. **Estudos Vida e Saúde**, nº 29 (especial), pp. 19 – 32. 2002.

CHAVES, S.R. Avaliação da frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos ocupacionalmente expostos ao pó de mármore e granito. Goiânia, pp 23, 1999.

COSTA, C. C.; CHAGAS, J. F. S.; PASCOAL, M. B. N.; CAMARGO, J. G. T. & AQUINO, J. L. B. Resultado do tratamento cirúrgico das neoplasias do seio piriforme. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v.69, n.1, pp.29-33. 2003.

COSTA, CC; CHAGAS, JFS; PASCOAL, MBN; CAMARGO, JGT & AQUINO, JLB. *Resultado do tratamento cirúrgico das neoplasias do seio piriforme*. Rev Bras Otorrinolaringol, v.69, n.1, pp.29-33. 2003.

CROLEY, J. & BRESLOW, N. *Statistical analysis of survival data*. Assoc. Rev. Public. Health, n.5. pp.385-411. 1984.

CRUZ IBF, SNIJDERS PJF, STEENBERGEN RDM, MEIJER CJLM SNOW GB, WALBOOMERS JMM *et al.* Age-dependence of human Papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, Eur J Cancer 1996; 32B(1):55-62.

CURADO, M. P. & LATORRE, M. R. D. O., 2000. *Câncer em Goiânia: Tendências (1988-1997)*. Associação de Combate ao Câncer de Goiás.

CURTIS, H. **Biologia**. Segunda edição. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan. 1977. 964p.

DA CRUZ, A.D.; MC ARTHUR, A.G.; DA SILVA, C.C.; CURADO, M.P.; GLICKMAN, B.W. Human Micronucleus counts Are Correlated With Age Smoking And Cesium – 137 Dose In The Goiânia (Brazil) Radiological Accident. **Mutation Research Environmental**, v.313, pp.57 – 58. 1994.

DA SILVA, C.C. & DA CRUZ, A.D. An Easy Procedure For Cytogenetic Analysis of Aged Chromosome Preparations Using FISH – WCP Probes. **Chromosome Research**, v. 10, pp.233 – 238. 2002.

DÂNGELO, JG; FATINI, CA. *Sistema Respiratório: Faringe. Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar*. 2ed, São Paulo, Ateneu, p. 106-120, capítulo IX, 2000.

de VILLIERS E. M. Human pathogenic papillomavirus types: an update. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.186, pp.1-12. 1994.

DE VILLIERS EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989; 63:4898-903.

DELUCA, G. D. et al. Human papillomavirus genotypes in women with cervical cytological abnormalities from an area with high incidence of cervical cancer. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**. v.46(1), pp.9-12, January-February, 2004.

EWEN, M. E. The cell cycle and the retinoblastoma protein family. **Cancer Metastasis Rev**, n.13, pp.45-66. 1994.

FLEMING, K. A.; NA, S. F.; Removal of inhibitor(s) of polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin wax embedded tissues. **Journal of Clinical Pathology**, v.44, n.11, p.924-927. 1991.

FÜZESI, L. et al. Novel enzyme immunoassay and optimized DNA extraction for the Detection of Polymerase-chain-reaction-amplified viral DNA from paraffin-embedded tissue. **American Journal of Pathology**, v.150, n.5, p.1537-1546, maio 1997.

GARTNER, LP. & HIATT, JL. **Tratado de Histologia**, Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 1999.

GATTÁS, GJF & SALDANHA, PH. *Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of abstinent alcoholics*. *Alcoholism clinical Experimental Research*, v.21, pp. 238-243. 1997.

GILLISON ML, KOCH WM, CAPONE RB, SPAFFORD M, WESTRA WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* May 2000; 92(9):709-20.

GIOVANELLI L, CAMPISI G, LAMA A, GIAMBALVO O, OSBORN, J, MARGIOTTA V et al. Human Papillomavirus DNA on Oral Mucosal Lesions. *The J Infect Dis* Mar 2002; 185:833-6.

GONSEBATT, ME. et al. *Cytogenetics effects in human exposure to arsenic*. Mutation Research, n.386. pp.219-228.1997.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T. et al. **Introdução à Genética**. Sexta edição. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan. 1998. 858p.

GRUMMT, T. *Exfoliative Cytology Of Normal Buccal Mucosa To Predict Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay*. **Oral Oncology**, v.36, n.5, pp.446 – 454. 2000.

HAGMAR, L. et al. Câncer risk in humans predicted by increased levels of chromossomal aberrations in lymphocytes: Nordic sutdy group on the health risk of chromossome damage. **Cancer Research**, n.54, pp. 2919-2922. 1994.

HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, pp.57-70. 2000.

HARRIS, EK. & ALBERT, A. **Survivorship analysis for clinical sudies**. New York, Marcel Dekker INC. 1991.

HATAKEYAMA, M. & WEINBERG. R. A. The role of Rb in cell cycle control. **Prog Cell Cycle Res**, n.1, pp.9-19. 1995.

HELLER, M.J., et al. An efficient method for the extraction of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue by sonication. **BioTechniques**. v.11, n.3, p.372-375. 1991.

HERCHENHORN, D. & DIAS, F. L. Advances in radiochemotherapy in the treatment of head and neck cancer. **REV. HOSP. CLÍN. FAC. MED. S. PAULO**. v.59(1), pp.39-46, 2004.

HILL R.P. *Tumour Metastasis Models*. In; **The Cancer Handbook** Vol 2. Editor-in-Chief Alison M. Nature Publishing Group, London pp. 999-1008, 2002.

HIRVONEM, A. Genetic Factors in Individual Responses to Enviromental Exposures. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v.1, pp.37 – 43. 1995.

HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B. & HARRIS, C. C. p53 mutations in human cancers. **Science**, v.253, n.5015, pp.49-53. 1991.

INCA/MS(A): Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde. *Tabagismo Passivo*. Disponível em www.inca.gov.br/tabagismo. Acesso em: 02 dez. 2004.

INCA/MS(B): Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde. *Diagnóstico e Tratamento*. Disponível em: www.inca.gov.br/diagnosticotratamento.htm. Acesso em: 02 dez. 2004.

INCA/MS(C): Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde. *Estadiamento*. Disponível em www.inca.gov.br/estadiamento.htm. Acesso em: 02 dez. 2004.

INCA/MS(D): Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde. *Como prevenir-se*. Disponível em: www.inca.gov.br/prevencao/hab_alimentares.html. Acesso em: 02 dez 2004.

INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE; GOVERNO FEDERAL. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2000**. Rio de Janeiro. 2000.

JUNQUEIRA, C. C. & CARNEIRO, J. **Tecido Epitelial, In: Histologia Básica**, 8º Ed., Rio de Janeiro, pp. 46-48, 2005.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Sexta Edição. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan. 1997. 299p.

JUNQUEIRA, LC. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

KAY P, MEEHAN K, WILLIAMSON A. The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. **J Virol Methods** 2002; 105:159-70.

KAYAL, J.J.; TRIVEDI, A.H.; DAVE, B.J.; NAIR, J.; NAIR, U.J.; BHIDE, S.V.; GOSWAMI, U.C. AND ADHVARYU, S.G. Incidence of micronuclei in oral mucosa of users of tobacco products singly or in various combinations. **Mutagenesis**, v. 8, pp.31 – 33. 1993.

KEANE, T. J. Carcinoma of the hypopharynx. **J Otolaryngol**, v.11, pp.227-231. 1982.

KITASATO H, DELIUS H, ZUR HAUSEN H, SORGER K, ROSL F, DE VILLIERS EM. Sequence rearrangements in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 6: are these involved in malignant transition? **J Gen Virol** May 1994; 75(Pt 5):1157-62.

KOJIMA A, MAEDA H, SUGITA Y, TANAKA S, KAMEYAMA Y. Human papillomavirus type 38 in oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncol** 2002; 38:591-6.

LEE JO, RUSSO AA, PAVLETICH NP. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. **Nature** 1998; 391:859-65.

LINDEL, K.; BEER, K. T.; LAISSUE, J. GREINER, R. H. & AEBERSOUL, D. M. Human Papillomavirus Positive Squamous Cell Carcinoma of Oropharynx: A Radiosensitive Subgroup of Head and Neck Carcinoma. **Am Cancer Soc**, v.92, n.4, pp. 805-813. 2001.

LLEWELLYN CD, JOHNSON NW, WARNAKULASURIYA KAAS. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people – a comprehensive literature review. **Oral Oncology** 2001; 37:401-18.

LYNCH DP. Oral viral infections. **Clinics in dermatology** 2000; 18:619-28.

MAJER, B.J.; LAKY, B.; KNASMULLER, S.; KASSIE F. Use of the Micronuclei Assay With Exfoliated Epithelial Cells as a Biomarker For Monitoring Individual at Elevated Risk of Genetic Damage and In Chemoprevention Trial . **Mutation Research**, v.489, pp.147 – 172. 2001.

MILLER CS, JOHNSTONE BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2001; 91:622-35.

NAIR, U.; OBE, G., NAIR. J.; MARU, G.B.; BHIDE, S.V.; PIEPER AND BARTSCH. Evaluation of Frequency of Micronucleated Oral Mucosa Cells as a Marker for Genotoxic Damage in Chewers of Betel Quid with or without Tobacco. **Mutation Research**, v.261, pp.163 – 168.1991.

NEUBAUER, A., et al. Analysis of gene amplification in archival tissue by differential polymerase chain reaction. **Oncogene**, v.7, p.1019-1025. 1992.

OBE, G. & ANDERSON, D.; International comission for protection against enviromental mutagens and carcinogens: Genetic effects of ethanol. **Mutation Research**, n. 186, pp. 177-200. 1987.

OLIVEIRA, L. H. S.; RODRIGUES, E. V. M.; LOPES, A. P. T. A. S.; FERNANDEZ, A. P.; DE PAULA, A. & CAVALCANTI, S. M. B. HPV 16 detection in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 gene. **Sao Paulo Med J**. v.121(2), pp.67-71. 2003.

PINTOS J, FRANCO EL, OLIVEIRA BV, KOWALSKI LP, CURADO MP, AND DEWAR R. Mate, coffe, and tea consupction and risk of cancers of the upper aerodigetive tract in Southern Brazil. **Epidemiology**, n.5. pp.583-590. 1994.

PRAETORIUS F. HPV-associated diseases of oral mucosa. **Clinics in Dermatology** 1997; 15:399-413.

PRASAD, M. P. R.; MUKUNDAN, M. A. AND KRISHNAWANY, K. Micronuclei and Carcinogen DNA Adducts as Intermediate and Point in Nutrient Intervention Trial of Precancerous Lesions in the Oral Cavity. **Oral Oncology, E'urj Cancer**, v.31B, pp. 155 – 159. 1995.

RABELLO – GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE, NETO, R. **In: Metagênese, Carcinogênese e Teratogênese – Métodos e Critérios de Avaliação**. 1 ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto – SP. 1991.

RAJ, K.; OGSTON, P. & BEARD, P. Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. **Nature**, v.402, pp.914-917, 2001.

RAOULT, D.; STEIN, A. A simple method for amplification of DNA from paraffin-embedded tissues. **Nucleic Acis Research**, v.20, n.19, p.5237-5238. 1992.

RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CORLETA, H. E. & da SILVA, I. S. B. Molecular Basis of Cervical Oncogenesis. **Rev. Bras. de Cancerol**, v.47, n.2, pp.179-184. 2001.

ROSSIT, A & FROES, NDTC. Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer. *Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia*. São Paulo, n.10, 2000.

RUAS, M. & PETERS, G. The p16^{INK4a}/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. **Biochim Biophys Acta**, n.1378, pp.F115-177. 1998.

SANDAL, T. Molecular aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer. **The Oncologist**, v.7, pp.73-81. 2002.

SCULLY C, PATH MRC, PRIME S, MAITLAND N. Papillomaviruses: their possible role in oral disease. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1985; 60:166-74.

SCULLY, C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about virus, to concern about possible sexual transmission. **Oral Oncology**, n.38, pp.227-234. 2002.

SENNES, LU; TSUJI, DH & GUIMARÃES, JR. Câncer de Laringe: Diagnósticos e Tratamento. **Arquivos da Fundação Otorrinolaringologia**. Disponível em: <http://www.forl.org.br/revistas/arq6/cancer.htm>. Acesso em 25 ago 2004.

SHERR, C. J. Cancer cell cycles. **Science**, v.274, pp.1672-1677. 1996.

SHIMA K, KOBAYASHI I, SAITO I, KIYOSHIMA T, MATSUO K, OZEKI S, et al. Incidence of human papillomavirus 16 and 18 infection and p53 mutation in patients with oral squamous cell carcinoma in Japan. **British Journal Of Oral and Maxillofacial Surgery** 2000; 38:445-50.

SILVA, AMTC; AMARAL, MVT & DA CRUZ, AD. O Papel do Papilloma Vírus Humano na Carcinogênese. **Biotecnologia**, Ciência e Desenvolvimento. n.29. 2002.

SILVA, AMTC; CURADO, MP & DA CRUZ, AD. Aspectos Gerais do Câncer da Laringe: Uma Revisão. **Revista Estudos Vida e Saúde**. v.30. 2003.

SONODA, S. et al. Prevalence of human papillomavirus infection in rural villages of the bolivian amazon. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, n.45(3), pp.131-135, May-June, 2003.

SOUTO, R.; BORGES, F. R.; CUNHA, D. M. C.; VILANOVA-COSTA, C. A.S.T. & CRUZ, A. D. O Teste de Micronúcleo como Ferramenta Qualitativa de Dano Genético: Aspectos Citotécnicos. **Revista Estudos: Vida e Saúde** (in press). 2006.

STICH, H.F.; CURTIS, J. R.; PARIDA, B. B. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. **International Journal of Cancer**, v.30, pp.553 – 559. 1982.

SUGERMAN PB, SHILLITOE EJ. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. **Oral Diseases** 1997; 3:130-47.

SUMMERGILL KF, SMITH EM, KIRCHNER HL, HAUGEN TH, TUREK LP. p53 polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity, and oral cancer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2000; 90:334-9.

SYRJÄNEN K, SYRJÄNEN S, LAMBERG M, PYRHÖNEN S, NUUTINEN J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983; 12:418-24.

SYRJÄNEN, K., et al. A simple method for isolation of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded samples for PCR. **Journal of Virological Methods**, v.35, p.39-47. 1991.

TANNOCK, I.F., HILL, R.P. Eds. **The Basic Science of Oncology** 3rd Edition. McGraw-Hill, 1998.

TERAI M, BURK RD. Complete nucleotide sequence and analysis of a novel human papillomavirus (HPV 84) genome cloned by an overlapping PCR method. **Virology** 2001; 279: 109-15.

TERAI M, TAKAGI M, MATSUKURA T, SATA T. Oral wart associated with human papillomavirus type 2. **J Oral Pathol Med** 1999; 28(3):137-40.

TERAI M, TAKAGI M. Human papillomavirus in the oral cavity. **Oral Med Pathol** 2001; 6:1-12.

THOMPSON, T.C.; TIMME, T.L.; KADMON, D.; PARK, S.H.; EGAWA, S. & ANDYOSHIDA, K. Genetic predisposition and mesenchymal-epithelial interactions in ras+myc-induced carcinogenesis in reconstituted mouse prostate. **Mol. Carcinog.**, v.7, n.3, pp.165-179.1993.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M. AND ALLEN, J. W. Micronuclei And Other Nuclear Anomalies In Buccal Smears : A Field Test In Snuff Users. **American Journal of Epidemiology**, v.134, pp.840 – 50. 1991.

UOBE K, MASUNO K, FANG Y-R, LI L-J, WEN Y-M, UEDA Y *et al.* Detection Of HPV in japanese and chinese oral carcinomas by in situ PCR. **Oral Oncology** 2001; 37:146-52.

VAN RANST M, TACHEZY R, BURK RD. IN: LAEY C. Human papillomaviruses: a never ending story? London: **Leeds Medical Information**; 1996. p.1-19.

VILLA LL. *Human papillomaviruses and cervical cancer*. In: **Advances in Cancer Res** 1997; 71:321-411.

VILLA, L. L.; PINTO, A. P.; A spin cartridge system for DNA extraction from paraffin wax embedded tissues. **Journal of Clinical Pathology: Molecular pathology**. v.51, n.1, p.48-49. 1998.

WENIG, VM. **Atlas of head and neck pathology**. Ed. W.B. Saunders Company. Pennsylvania, USA. pp. 205-206. 1993.

WINDEBANK, A. J. Mental Neuropathy. **In: Peripheral Neuropathy** (P.J. Dyck, P. K. Thomas, J. W. Crriffin, P. A. Low & J. F. Padusto, eds.), 3th ed., pp. 1549-1570, Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1993.

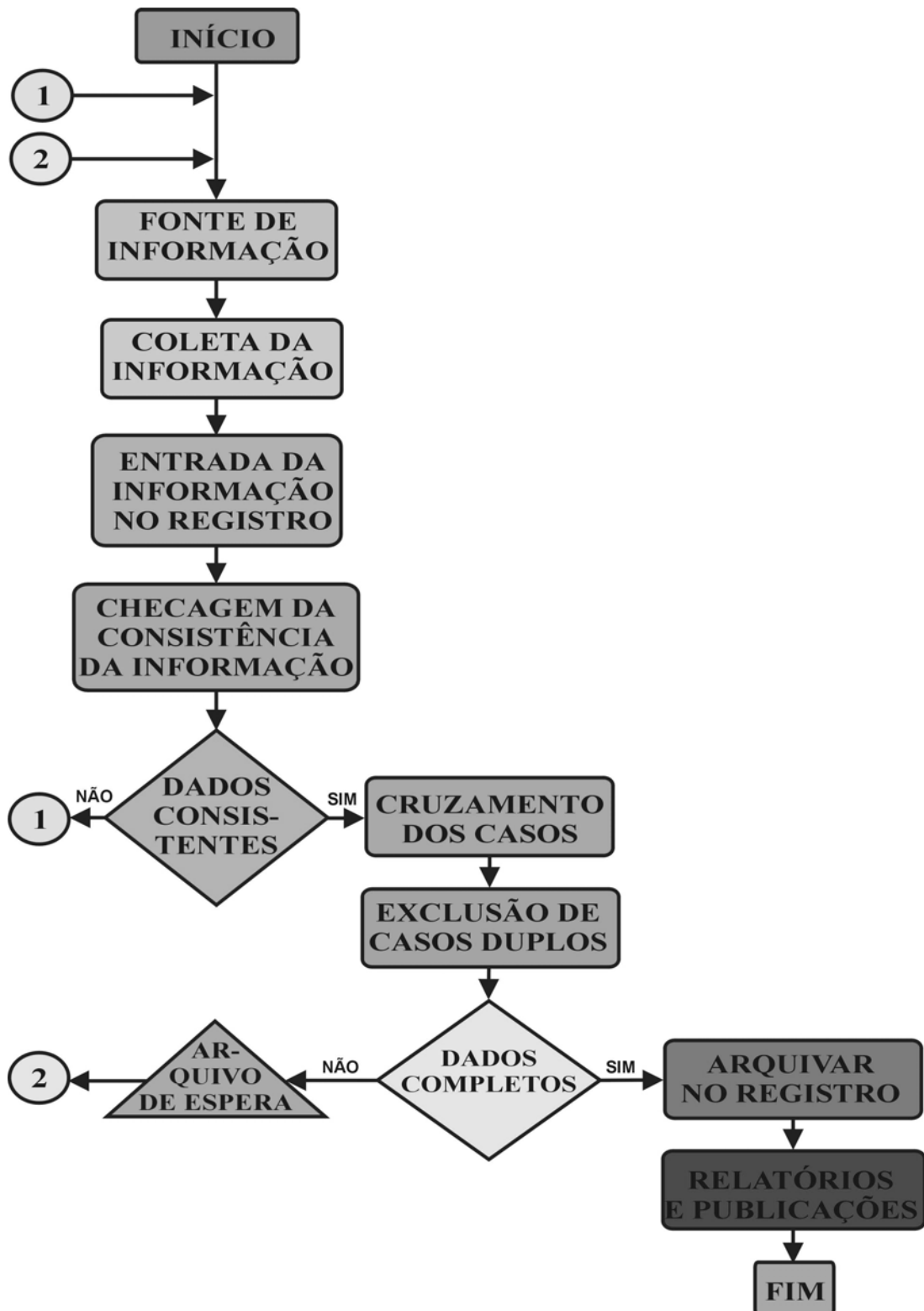
ZAHA, A. et al. **Biologia Molecular Básica**. Terceira edição. Porto Alegre, RS. Mercado Aberto. 2001. 336p.

ZIEGLER, RG. Alcohol-nutrient interactions in cancer etiology. **Cancer Research**. n. 58, pp 1942-1948. 2001.

zur HAUSEN H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute** 2000; 92(9):690-8.

zur HAUSEN, H. Papillomaviruses in human cancers. **Proc. Assoc. Am Physicians**, v.111, n.6. pp.581-587. 1999.

ANEXOS

ANEXO 1. FLUXOGRAMA DE NOTIFICAÇÃO DO REGISTRO DE
CÂNCER DE BASE POPULACIONAL DE GOIÂNIA DA ACCG

ANEXO 2. DADOS BRUTOS DE IDENTIFICAÇÃO, SOCIODEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS 36 PACIENTES QUE FIZERAM PARTE DO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO EM GOIÂNIA NO PERÍODO DE 1998 A 2003

Prontuário	Nascimento	Data Diagnóstico.	Idade	Data óbito	Saída	Situação	Tempo em meses	Tab	Et	Sexo	Cirurgia	Rádio	Químio
2001100696	12/10/1937	18/1/2001	62	1/4/2002	1/4/2002	O	14	1	0	1	1	1	2
2001103386	3/3/1933	15/1/2002	68		1/11/2004	V	33	1	0	1	1	1	1
2002105660	27/2/1977	31/5/2002	25		27/7/2004	V (cura)	26	1	1	1	1	1	1
2002109008	13/5/1931	30/10/2002	70		1/11/2004	V	24	1	2	1	1	2	2
2001111713	7/4/1946	18/12/2001	55	28/3/2003	28/3/2003	O	15	1	1	1	2	1	1
1999104687	24/11/1936	22/6/1999	62		1/11/2004	V	63	1	0	1	2	1	1
2003101593	25/12/1952	17/2/2003	49		17/7/2004	V	17	1	1	1	1	1	1
2000105204	26/10/1942	8/6/2000	57		29/1/2003	O	31	1	1	1	1	1	2
2000103016	17/12/1941	14/4/2000	58		31/8/2000	O	4	1	0	1	1	1	1
2001107920	29/8/1936	31/8/2001	64	31/10/2003	31/10/2003	O	26	1	1	1	1	1	1
1999108666	28/10/1938	14/2/2000	60		5/4/2000	O	2	1	1	1	1	1	2
2000110477	1/6/2026	20/11/2000	73		1/11/2004	V	47	1	0	1	1	1	2
2000101539	3/4/1962	21/3/2000	37	1/2/2001	1/2/2001	O	10	0	0	1	1	1	1
2000101975	16/9/2025	19/4/2000	74	24/12/2000	24/12/2000	O	8	1	1	1	1	1	2
2000110842	25/2/2017	4/12/2000	83		1/11/2004	V	46	0	0	1	2	2	2
2002101919	24/12/1931	20/2/2002	69	29/1/2003	29/1/2003	O	11	1	2	1	1	1	2
2000111056	10/8/1934	6/12/2000	65		18/4/2001	C	4	1	1	1	1	1	2
2002111289	23/10/1958	22/11/2002	43		6/4/2004	V (cura)	16	0	0	1	1	1	2
2001104050	18/3/1955	29/5/2001	46		1/11/2004	V	41	1	0	1	1	1	1
1999101467	28/2/1944	17/2/1999	54		22/11/2000	C	21	1	1	1		1	2
2000104917	15/1/1933	4/7/2000	67		1/11/2004	V	51	1	1	1	1	1	2
2003102854	20/1/1943	7/4/2003	59		1/11/2004	V	19	0	1	1	1	1	2
2000104767	19/9/1957	31/5/2000	42		28/6/2000	O	1	1	1	1	1	1	2
1999103100	7/1/1937	20/4/1999	61		18/6/2003	O	49	1	0	1	1	1	2
2000108657	11/8/1959	22/9/2000	41		1/11/2004	V	49	1	1	1	1	1	2

Prontuário	Nascimento	Data Diagnóstico.	Idade	Data óbito	Saída	Situação	Tempo em meses	Tab	Et	Sexo	Cirurgia	Rádio	Químio
2000107714	20/5/1930	24/8/2000	69		24/8/2000	O	1	0	0	1	0	2	2
2002106127	11/3/1942	21/6/2002	59		1/11/2004	V	28	1	0	2	1	1	2
2000105927	22/8/1947	7/5/2000	52	1/9/2002	1/9/2002	O	27	1	1	1	0	2	2
2000106537	9/1/1936	20/5/2004	67		1/11/2004	V	5	1	1	1	1	1	2
2002102151	26/6/1936	4/3/2002	65		1/11/2004	V	31	1	2	1	1	1	1
2000104172	16/1/1938	10/5/2000	61		14/2/2001	O	9	1	2	1	1	1	2
2000104111	29/9/2029	16/5/2000	70		25/5/2000	V (cura)	1	1	2	1	1	2	2
1999110086	12/3/1959	27/1/2000	40		1/11/2004	V	56	1	0	1	1	1	2
1998108533	24/6/1938	16/10/1998	59	27/9/2000	27/9/2000	O	23	1	1	1	1	1	2
2001104824	22/8/1930	26/6/2001	70		1/11/2004	V	40	1	0	1	1	1	2
2001102826	14/8/1939	19/3/2001	61		1/11/2004	V	43	1	0	2	1	2	2

Continuação

Prontuário	Profissão	Morfologia	Topografia	T	M	N		Estádio	Cid	Grau
2001100696	pintor de obras	8071/3	Seio Piriforme	4	1	0	CEC	I	12.9	1
2001103386	pedreiro	8070/3	Hipofaringe	3	2b	0	CEC		13.9	1
2002105660	garçon	8070/3	Hipofaringe(pared post)				CEC		13.2	2
2002109008	tratorista agrícola	8070/3	Seio Piriforme	4	3	0	CEC	IVb	12.9	1
2001111713	lavrador	8070/3	Seio Piriforme	4	3	0	CEC	IV	12.8	
1999104687	lavrador	8070/3	Hipo e Seio Piriforme	3	3	0	CEC	*	12.9	2
2003101593	lavrador	8070/3	Hipofaringe						13.9	3
2000105204	guarda noturno	8070/3	Hipofaringe	4	3	0	CEC	IV	13.9	
2000103016	lavrador	8070/3	Hipofaringe	*	*	*	CEC	*	13.9	1
2001107920	lavrador	8070/3	Hipo e Seio Piriforme	4	0	0	CEC	IV	12.9	
1999108666	carpinteiro	8070/3	Hipofaringe	3	3	0	CEC	*	13.9	3
2000110477	carroceiro	8071/3	Seio Piriforme	4	2	1	CEC	IVa	12.9	2
2000101539	serviços gerais	8070/3	Hipofaringe	3	2a	0	CEC	IV	13.8	2
2000101975	lavrador	8070/3	Hipofaringe	4	1	0	CEC	*	13.9	
2000110842	lavrador	8070/3	Seio Piriforme LE	3	2a	0	CEC	IVa	12.9	1
2002101919	funcionário público estadual	8070/3	Hipofaringe	3	2a	0	CEC	IV	13.9	2
2000111056	lavrador	8071/3	Hipofaringe	4	2c	0	CEC	IVa	12.9	2
2002111289	lavrador	8070/3	Seio Piriforme	4	x	0	CEC	IV	12.8	2
2001104050	mecânico manutenção de máquinas	8071/3	Seio Piriforme	3	0	0	CEC	IVa	12.9	2
1999101467	vaqueiro	8070/3	Hipofaringe	3	0	0	CEC	III	13.9	3
2000104917	Funcionário público	8070/3	Hipofaringe	3	1	0	CEC	III	13.9	3
2003102854	pedreiro	8070/3	Seio Piriforme	3 ou 4	3	0	CEC		12.9	
2000104767	porteiro e servente	8070/3	Seio Piriforme	3	2	0	CEC	IV	12.9	
1999103100	Auxiliar de serviços gerais	8071/3	Hipofaringe	2	2	0	*	*	13.9	
2000108657	do lar	8070/3	Seio Piriforme	1	0	0	CEC	I	12.9	2

Prontuário	Profissão	Morfologia	Topografia	T	M	N		Estádio	Cid	Grau
2000107714	lavrador	8070/3	Hipofaringe	3	3	0	CEC	II	13.9	2
2002106127	do lar	8070/3	Hipofaringe	4	1	0	CEC	IVa	13.9	2
2000105927	vendedor comércio atacadista	8070/3	Seio Piriforme	4	3	0	CEC		12.9	
2000106537	cozinheiro	8070/3	Seio Piriforme	n/d	n/d	n/d	CEC	II	12.9	2
2002102151	marceneiro	8070/3	Hipofaringe	3	0	0	CEC	III	13.9	3
2000104172	motorista em geral	8070/3	Hipofaringe	*	*	*	*	*		
2000104111	comerciante	8070/3	Hiporaringe	3	2a	0	CEC	*	12.x	
1999110086	vigia	8070/3	Hipofaringe	1	3	0	CEC		13.9	2
1998108533	motorista de caminhão	8071/3	Hipofaringe	3	1	0	CEQ	*	13.9	1
2001104824	lavrador	8070/3	Hiporafinge	*	*	*	CEC		12.9	3
2001102826	do lar	8071/3	Hipo pós-Cricóide	3	0	0	CEC	I	13.9	

ANEXO 3. TESTE *LOGRANK* (Baseado nos trabalhos de Silva *et al*, 2003)

1. Introdução

O teste *logrank* foi desenvolvido por N. Mantel, em 1966, e se tornou um dos testes mais utilizados em análise de sobrevivência. O *logrank* é muito útil na comparação de duas curvas de sobrevida, particularmente, quando a razão das funções de risco dos grupos a serem comparados é aproximadamente constante, ou seja, as populações têm as propriedades de risco proporcionais. A estatística deste teste é dada pela diferença entre o número observado de falhas (óbitos, por exemplo) em cada grupo e uma quantidade que, para muitos propósitos, pode ser vista como o correspondente número esperado de falhas sob a hipótese nula (Colosimo, 2001).

2. O teste *logrank*

O teste *logrank* é capaz de comparar duas curvas de sobrevida, através das funções, como por exemplo, do primeiro grupo, $S_1(t)$, e do segundo grupo, $S_2(t)$. A questão a ser respondida pelo teste é a seguinte: Os dois grupos apresentam sobrevidas similares? Ou seja, $S_1(t)$ é igual a $S_2(t)$ para todo t ? Desta forma, surgem duas hipóteses estatísticas: (1) H_0 : $S_1 = S_2$ e (2) H_a : $S_1 \neq S_2$. Para a solução de tal questão, é necessário escolher o nível de significância α (que, geralmente, é igual a 0,05) e calcular o valor exato de P . Se $P \leq \alpha$, rejeita-se H_0 e conclui-se que os dois grupos têm uma distribuição diferente de sobrevidas (Iachine, 2001).

Assim, de maneira mais detalhada, comparar as razões de incidência para um evento entre dois grupos expostos, quando as incidências variam dentro do período de acompanhamento (T), usa-se o seguinte procedimento:

(1) Subdividir T em intervalos k de tempos menores, quando a incidência é homogeneia, dentro destes intervalos de tempos menores.

(2) Construir uma tabela de contingência 2 x 2, correspondente a cada intervalo de tempo, tal como se segue:

Tabela I. Relação entre presença ou ausência do evento e exposição.

Exposição	Evento		Total
	+	-	
+	a_1	b_2	ni_1
-	c_1	d_2	ni_2
Total	$a_1 + c_1$	$b_2 + d_2$	N_i

Tabela II. Relação de óbitos e sobreviventes para os grupos 1 e 2.

Grupo

Estado	1	2	Total
Óbitos	d_1	d_2	$d = d_1 + d_2$
Sobreviventes	S_1	S_2	$S = S_1 + S_2$
Total	$N_1 = d_1 + S_1$	$N_2 = d_2 + S_2$	N

Onde:

d_1 e d_2 : corresponde ao número de óbitos (falha) nos grupos 1 e 2, respectivamente;

S_1 e S_2 : número de sobreviventes para os grupos 1 e 2, respectivamente;

d : Somatório dos óbitos do primeiro e segundo grupos;

S : Somatório de sobreviventes do primeiro e segundo grupos;

N_1 : Número de expostos do primeiro grupo, obtido pela soma entre os números de óbitos e sobreviventes deste grupo;

N_2 : Número de expostos do segundo grupo, obtido pela soma entre os números de óbitos e sobreviventes deste grupo;

N : Número total de indivíduos que participam do estudo.

(3) Assim, o teste *logrank* é aplicado na tabela 2 x 2 definida no item anterior. De maneira que o teste estatístico é realizado como se segue:

$$\chi^2_{LR} = \frac{(|O - E| - 0,5)^2}{V}$$

Onde:

$$O = \sum_{i=1}^k a_i \quad (\text{Número de óbitos})$$

$$E = \sum_{i=1}^k E_i = \sum_{i=1}^k \frac{(a_i + b_i)(a_i + c_i)}{N_i} \quad (\text{Número esperado de óbitos})$$

$$V = \sum_{i=1}^k V_i = \sum_{i=1}^k \frac{(a_i + b_i)(c_i + d_i)(a_i + c_i)(b_i + d_i)}{N_i^2(N_i - 1)} \quad (\text{Variância})$$

Assim, a H_0 segue uma distribuição de Qui-quadrado com um grau de liberdade.

(4) Para um teste com dois grupos, com nível de significância α , se $\chi^2_{LR} > \chi^2_{1,1-\alpha}$, então, H_0 deve ser rejeitada. Se $\chi^2_{LR} \leq \chi^2_{1,1-\alpha}$, então, aceita-se H_0 . Lembrando que H_0 é a hipótese de nulidade ou nula e, quando é aceita, significa que não existe diferença estatística entre as curvas de sobrevida dos dois grupos analisados. Ao contrário, H_a é a hipótese

alternativa, que é aceita quando se rejeita a H_0 , neste caso, há diferença estatística entre os grupos.

(5) O valor exato de p para este teste é dado por: Valor de $p = Pr(\chi^2_1 > \chi^2_{LR})$.

(6) Este teste deve ser usado somente se $V \geq 5$.

As regiões onde se aceita ou rejeita o teste *logrank* e o cálculo do valor exato de p , estão descritas na Figura 1 (Rosner, 1995).

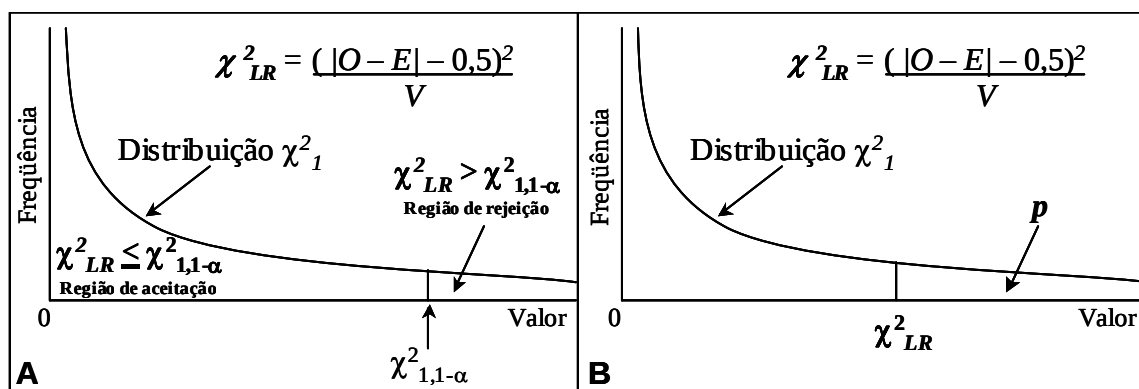


Figura 1. Distribuição de χ^2 associando frequências e valores do χ^2 . (A) Regiões de aceitação e rejeição para o teste *logrank*. (B) Cálculo do valor exato de p para o teste

3. Exemplos de teste *logrank*

Para ilustrar a aplicação do teste *logrank*, faremos uso de dois exemplos reais, retirados do capítulo 3 desta dissertação.

Exemplo I. Comparar as curvas ou funções de sobrevida de dois grupos de pacientes com câncer da laringe discriminados pelo uso do tabagismo como hábito de vida (Tabela III).

Grupos: (1) Não-tabagistas (2) Tabagistas

Hipóteses estatísticas: H_0 : $S_1(t) = S_2(t)$ e H_a : $S_1(t) \neq S_2(t)$ e $\alpha = 0,05$

Tabela III. Dados epidemiológicos de dois grupos, segundo hábito do tabagismo, onde N é o número de sobreviventes e d o número de óbitos.

Tempo (anos)	N_1	N_2	N	d_1	d_2	d	$E_1 = (N_1 d)/N$	$d_1 - E_1$	V
0,5	25	120	145	2	16	18	3,103	-1,103	2,265
1	23	100	123	0	12	12	2,244	-2,244	1,660
2	22	83	105	4	11	15	3,143	0,857	2,150
3	17	71	88	2	3	5	0,966	1,034	0,743
4	13	67	80	0	2	2	0,325	-0,325	0,269
5	13	64	77	0	0	0	0,000	0,000	0,000
>5	10	51	61	0	4	4	0,656	-0,656	0,521
Total				8	48	56	10,437	-2,437	7,608

Desta forma, com os números de sobreviventes N e o número de óbitos d , para cada grupo, em cada período do seguimento, calcula-se o número esperado de mortos para o primeiro grupo (E_1). Em seguida, calcula-se a diferença entre o número de óbitos observados e esperados para o primeiro grupo ($d_1 - E_1$), e, finalmente, determina-se a variância para cada intervalo de tempo. As fórmulas para os cálculos estão descritas no item 3 do tópico anterior. Com o total resultante do somatório de todos os valores de $(d_1 - E_1)$ e V , encontra-se o valor do *logrank*. Neste caso em particular, tem-se:

$$\chi^2_{LR} = 0,493; \text{ Grau de liberdade} = 1 \text{ e } p = 0,483$$

Antes da interpretação de tal resultado, é importante lembrar que o grau de liberdade (gl) para o teste *logrank*, será sempre igual a um, pois, como o teste se propõe a comparar duas curvas de sobrevida, e sendo n o número de curvas comparadas, logo, $n = 2$. Assim, o grau de liberdade, que é dado por $gl = n - 1$, será, $gl = 2 - 1 = 1$.

Como o valor do $\chi^2_{1,0.95} = 3,841$ ($gl = 1$ e Intervalo de Confiança = 0,95), e o valor de $\chi^2_{LR} = 0,493$, tem-se a seguinte proporção: $\chi^2_{LR} \leq \chi^2_{1,1-\alpha}$ ($0,493 < 3,841$). Desta forma, o valor exato de $p = 0,483$, isso faz com que H_0 seja aceita, ou seja, conclui-se que não há diferença estatística significativa entre as curvas de sobrevida comparadas.

Exemplo II. Comparar as curvas ou funções de sobrevida de dois grupos de pacientes com câncer da laringe discriminados por estadiamento (Tabela IV).

Grupos: (1) Estádio I e II (2) Estádio III e IV

Hipóteses estatísticas: H_0 : $S_1(t) = S_2(t)$ e H_a : $S_1(t) \neq S_2(t)$ e $\alpha = 0,05$

Tabela IV. Dados epidemiológicos de dois grupos, segundo estadiamento, onde N é o número de sobreviventes e d o número de óbitos.

Tempo (anos)	N_1	N_2	N	d_1	d_2	d	$E_1 = (N_1 d)/N$	$d_1 - E_1$	V
0,5	49	75	124	2	10	12	4,742	-2,742	2,612
1	46	61	107	1	10	11	4,729	-3,729	2,442
2	44	48	92	5	10	15	7,174	-2,174	3,167
3	37	38	75	0	2	2	0,987	-0,987	0,493
4	35	35	70	1	1	2	1,000	0,000	0,493
5	34	33	67	0	0	0	0,000	0,000	0,000
>5	28	26	54	0	2	2	1,037	-1,037	0,490
Total				9	35	44	19,669	-10,669	9,696

Realizando o mesmo procedimento do exemplo anterior, têm-se os seguintes resultados para o teste *logrank*:

$$\chi^2_{LR} = 10,664; \text{ Grau de liberdade} = 1 \text{ e } p = 0,001$$

Como o valor do $\chi^2_{1,0.95} = 3,841$ ($gl = 1$ e Intervalo de Confiança = 0,95), e o valor de $\chi^2_{LR} = 10,664$, tem-se a seguinte proporção: $\chi^2_{LR} > \chi^2_{1,1-\alpha}$ ($10,664 > 3,841$). Desta forma, o valor exato de $p = 0,001$, isso faz com que H_0 seja rejeitada, ou seja, conclui-se que as curvas de sobrevida comparadas têm uma diferença estatisticamente significativa.

ANEXO 4. CÁLCULO DAS SOBREVIDAS RELATIVAS PELO MÉTODO DA TÁBUA DE VIDA ATUARIAL

Tabela I. Cálculo da sobrevida relativa geral para o câncer de hipofaringe, em Goiânia no período de 1998 a 2003.

Tempo (meses)	Lx	Dx	Ux	Wx	Lx'	qx'	px'	S(x)
0 a 12	36	8	1	2	34,5	0,23	0,77	0,77
13 a 24	25	3	1	4	22,5	0,13	0,87	0,67
25 a 36	17	3	0	4	15	0,20	0,80	0,53
37 a 48	10	0	0	5	7,5	0,00	1,00	0,53
49 a 60	5	1	0	3	3,5	0,29	0,71	0,38
mais de 60	1	0	0	1	0,5	0,00	1,00	0,38
Total					Sobrevida (%)			38,04

Tabela II. Cálculo da sobrevida relativa dos indivíduos do sexo masculino para o câncer de hipofaringe, em Goiânia no período de 1998 a 2003.

Tempo (meses)	Lx	Dx	Ux	Wx	Lx'	qx'	px'	S(x)
0 a 12	34	8	1	2	32,5	0,25	0,75	0,75
13 a 24	23	3	1	4	20,5	0,15	0,85	0,64
25 a 36	15	3	0	3	13,5	0,22	0,78	0,50
37 a 48	9	0	0	4	7	0,00	1,00	0,50
49 a 60	5	1	0	2	4	0,25	0,75	0,38
mais de 60	2	0	0	1	1,5	0,00	1,00	0,38
Total					Sobrevida (%)			38,04

Tabela III. Cálculo da sobrevida relativa dos indivíduos do sexo feminino para o câncer de hipofaringe, em Goiânia no período de 1998 a 2003.

Tempo (meses)	Lx	Dx	Ux	Wx	Lx'	qx'	px'	S(x)
0 a 12	2	0	0	0	2	0,00	1,00	1,00
13 a 24	2	0	0	0	2	0,00	1,00	1,00
25 a 36	2	0	0	1	1,5	0,00	1,00	1,00
37 a 48	1	0	0	1	0,5	0,00	1,00	1,00
49 a 60								
mais de 60								
Total					Sobrevida (%)			100,00

Tabela IV. Cálculo da sobrevida relativa dos indivíduos que apresentam o tabagismo como hábito de vida, para o câncer de hipofaringe, em Goiânia no período de 1998 a 2003.

Tempo (meses)	Lx	Dx	Ux	Wx	Lx'	qx'	px'	S(x)
0 a 12	35	15	3	5	31	0,48	0,52	0,52
13 a 24	12	2	0	3	10,5	0,19	0,81	0,42
25 a 36	7	2	0	1	6,5	0,31	0,69	0,29
37 a 48	4	0	0	2	3	0,00	1,00	0,29
49 a 60	2	0	0	0	2	0,00	1,00	0,29
mais de 60	2	0	0	2	1	0,00	1,00	0,29
Total					Sobrevida (%)			28,93

Tabela V. Cálculo da sobrevida relativa dos indivíduos que não apresentam o tabagismo como hábito de vida, para o câncer de hipofaringe, em Goiânia no período de 1998 a 2003.

Tempo (meses)	Lx	Dx	Ux	Wx	Lx'	qx'	px'	S(x)
0 a 12	5	1	0	2	4	0,25	0,75	0,75
13 a 24	2	0	0	0	2	0,00	1,00	0,75
25 a 36	2	0	0	1	1,5	0,00	1,00	0,75
37 a 48	1	0	0	1	0,5	0,00	1,00	0,75
49 a 60								
mais de 60								
Total					Sobrevida (%)			75,00

Tabela VI. Cálculo da sobrevida relativa dos indivíduos que apresentam o etilismo como hábito de vida, para o câncer de hipofaringe, em Goiânia no período de 1998 a 2003.

Tempo (meses)	Lx	Dx	Ux	Wx	Lx'	qx'	px'	S(x)
0 a 12	35	15	3	5	31	0,48	0,52	0,52
13 a 24	12	1	0	3	10,5	0,10	0,90	0,47
25 a 36	8	2	0	1	7,5	0,27	0,73	0,34
37 a 48	5	0	0	2	4	0,00	1,00	0,34
49 a 60	3	0	0	1	2,5	0,00	1,00	0,34
mais de 60	2	0	0	2	1	0,00	1,00	0,34
Total					Sobrevida (%)			34,24

Tabela VII. Cálculo da sobrevida relativa dos indivíduos que não apresentam o etilismo como hábito de vida, para o câncer de hipofaringe, em Goiânia no período de 1998 a 2003.

Tempo (meses)	Lx	Dx	Ux	Wx	Lx'	qx'	px'	S(x)
0 a 12	5	1	0	2	4	0,25	0,75	0,75
13 a 24	2	1	0	0	2	0,50	0,50	0,38
25 a 36	1	0	0	1	0,5	0,00	1,00	0,38
37 a 48								
49 a 60								
mais de 60								
Total					Sobrevida (%)			37,50

Tabela VIII. Cálculo da sobrevida relativa dos indivíduos que sofreram cirurgia, para o câncer de hipofaringe, em Goiânia no período de 1998 a 2003.

Tempo (meses)	Lx	Dx	Ux	Wx	Lx'	qx'	px'	S(x)
0 a 12	30	11	1	5	27	0,41	0,59	0,59
13 a 24	13	2	0	2	12	0,17	0,83	0,49
25 a 36	9	1	0	1	8,5	0,12	0,88	0,44
37 a 48	7	1	0	0	7	0,14	0,86	0,37
49 a 60	6	0	0	1	5,5	0,00	1,00	0,37
mais de 60	5	0	0	5	2,5	0,00	1,00	0,37
Total					Sobrevida (%)			37,35

Tabela VIII. Cálculo da sobrevida relativa dos indivíduos que não sofreram cirurgia, para o câncer de hipofaringe, em Goiânia no período de 1998 a 2003.

Tempo (meses)	Lx	Dx	Ux	Wx	Lx'	qx'	px'	S(x)
0 a 12	26	8	2	6	22	0,36	0,64	0,64
13 a 24	10	5	0	0	10	0,50	0,50	0,32
25 a 36	5	1	0	1	4,5	0,22	0,78	0,25
37 a 48	3	0	0	2	2	0,00	1,00	0,25
49 a 60	1	0	0	0	1	0,00	1,00	0,25
mais de 60	1	1	0	0	1	1,00	0,00	0,00
Total					Sobrevida (%)			24,74

Tabela VIII. Cálculo da sobrevida relativa dos indivíduos que sofreram quimioterapia, para o câncer de hipofaringe, em Goiânia no período de 1998 a 2003.

Tempo (meses)	Lx	Dx	Ux	Wx	Lx'	qx'	px'	S(x)
0 a 12	13	2	0	4	11	0,18	0,82	0,82
13 a 24	7	0	0	1	6,5	0,00	1,00	0,82
25 a 36	6	1	0	1	5,5	0,18	0,82	0,67
37 a 48	4	1	0	1	3,5	0,29	0,71	0,48
49 a 60	2	0	0	1	1,5	0,00	1,00	0,48
mais de 60	1	0	0	1	0,5	0,00	1,00	0,48
Total					Sobrevida (%)			47,82

Tabela IX. Cálculo da sobrevida relativa dos indivíduos que não sofreram quimioterapia, para o câncer de hipofaringe, em Goiânia no período de 1998 a 2003.

Tempo (meses)	Lx	Dx	Ux	Wx	Lx'	qx'	px'	S(x)
0 a 12	43	17	3	6	38,5	0,44	0,56	0,56
13 a 24	17	7	0	2	16	0,44	0,56	0,31
25 a 36	8	1	0	1	7,5	0,13	0,87	0,27
37 a 48	6	0	0	1	5,5	0,00	1,00	0,27
49 a 60	5	0	0	0	5	0,00	1,00	0,27
mais de 60	5	1	0	4	3	0,33	0,67	0,18
Total					Sobrevida (%)			18,15

Tabela X. Cálculo da sobrevida relativa dos indivíduos que sofreram radioterapia, para o câncer de hipofaringe, em Goiânia no período de 1998 a 2003.

Tempo (meses)	Lx	Dx	Ux	Wx	Lx'	qx'	px'	S(x)
0 a 12	34	8	1	9	29	0,28	0,72	0,72
13 a 24	16	2	0	2	15	0,13	0,87	0,63
25 a 36	12	1	0	1	11,5	0,09	0,91	0,57
37 a 48	10	1	0	2	9	0,11	0,89	0,51
49 a 60	7	0	0	1	6,5	0,00	1,00	0,51
mais de 60	6	1	0	5	3,5	0,29	0,71	0,36

Total				Sobrevida (%)	36,38
--------------	--	--	--	----------------------	--------------

Tabela X. Cálculo da sobrevida relativa dos indivíduos que não sofreram radioterapia, para o câncer de hipofaringe, em Goiânia no período de 1998 a 2003.

Tempo (meses)	Lx	Dx	Ux	Wx	Lx'	qx'	px'	S(x)
0 a 12	22	11	2	1	20,5	0,54	0,46	0,46
13 a 24	8	5	0	1	7,5	0,67	0,33	0,15
25 a 36	2	1	0	1	1,5	0,67	0,33	0,05
37 a 48								
49 a 60								
mais de 60								
Total					Sobrevida (%)	05,15		

ANEXO 5. APLICAÇÃO DO TESTE *LOGRANK* PARA COMPARAÇÃO DAS SOBREVIDAS

Tabela I. Comparação das sobrevidas entre o grupo (1) sexo masculino e o grupo (2) sexo feminino.

Tempo (meses)	N1	N2	N	d1	d2	d	e1=N1d/N	d1-e1	v
0 a 12	43	13	56	5	18	23	4,600	0,400	3,215
13 a 24	16	7	24	1	13	14	2,897	-1,897	2,090
25 a 36	9	5	14	3	16	19	4,137	-1,137	2,763
37 a 48	9	1	10	1	6	7	1,578	-0,578	1,150
49 a 60	6	1	7	0	2	2	0,457	-0,457	0,348
mais de 60	5	1	6	0	0	0	0,000	0,000	0,000
Total				11	58	69	14,551	-3,551	9,245

$$\chi^2_{LR} = 0,845; gl = 1; p = 0,403$$

Tabela II. Comparação das sobrevidas entre o grupo (1) tabagistas e o grupo (2) de não tabagistas.

Tempo (meses)	N1	N2	N	d1	d2	d	e1=N1d/N	d1-e1	v
0 a 12	35	5	40	2	16	18	3,103	-1,103	2,265
13 a 24	12	2	14	0	12	12	2,244	-2,244	1,660
25 a 36	7	2	9	4	11	15	3,143	0,857	2,150
37 a 48	4	1	5	2	3	5	0,966	1,034	0,743
49 a 60	2	0	2	0	2	2	0,325	-0,325	0,269
mais de 60	2	0	2	0	0	0	0,000	0,000	0,000
Total				8	48	56	10,437	-2,437	4,506

$$\chi^2_{LR} = 0,4438; gl = 1; p = 0,4694$$

Tabela III. Comparação das sobrevidas entre o grupo (1) etilistas e o grupo (2) de não etilistas.

Tempo (meses)	N1	N2	N	d1	d2	d	e1=N1d/N	d1-e1	v
0 a 12	35	5	40	2	16	18	5,000	-3,000	3,182
13 a 24	12	2	14	3	9	12	3,738	-0,738	2,340
25 a 36	8	1	9	6	9	15	5,048	0,952	2,894
37 a 48	5	0	5	5	0	5	1,287	-0,287	0,843
49 a 60	3	0	3	3	0	3	0,625	-0,625	0,00
mais de 60	2	0	2	1	0	1	0,006	-0,006	0,000
Total				12	43	55	17,075	-5,075	0,843

$$\chi^2_{LR} = 2,986; gl = 1; p = 0,1348$$

ANEXO 7. QUESTIONÁRIO APLICADO AOS INDIVÍDUOS QUE FIZERAM PARTE DO ESTUDO INTERNACIONAL DO IARC

Introdução

As perguntas, a seguir, fazem parte de um questionário mais amplo, aplicado pelo RCBP/IARC na coleta dos dados juntos aos participantes que fizeram parte deste estudo internacional.

ESTUDO INTERNACIONAL MULTICÊNTRICO SOBRE DOENÇAS DA BOCA, LARINGE E ESÔFAGO

Número de identificação: |__|__| - |__| - |__|__|__|
País C N° Pessoa

País: |__|__|

País	Centro (C)
(08) Brasil	(5) Goiânia

Número da pessoa = número consecutivo, para cada centro.

A1 Estado: (1) Caso (2) Controle |__|

Número do registro médico ou prontuário: _____

A2 Iniciais (sobrenome-nome) |__|__|

A3 Hospital (CL) |__|__|

A4 Departamento |__|__|

(1) Clínica médica (2) Cirurgia (3) Gin./Obst. (4) Ortopedia

(5) Otorrinol. (6) Dermatologia (7) Oftalmologia (8) Odontologia

(9) Radioterapia (10) Oncologia (11) Ambulatório

(12) Outro: _____

A5 Diagnóstico principal da baixa hospitalar |__|__|__| - |__|
(em caso de pacientes ambulatoriais apenas com suspeita de câncer = 8888) **CID-10**

A6 Data da admissão hospitalar (ou consulta) |__|__| - |__|__| -
|__|__|__|

dia mês ano

A7 Entrevistador (CL) |__|

dia mês ano

- B6** Qual a cidade onde o(a) Sr(a). mora (CL)? |_|_|_|_|_|_|
- B7** Há quanto tempo o(a) Sr(a). mora nesta cidade? |_|_|_|
(se menos de um ano, codifique como 00)
- B8** Se o(a) Sr(a). está vivendo há menos de 1 ano nessa cidade,
onde o Sr(a) morava antes? (CL) |_|_|_|_|_|_|
- B9** Em que cidade o(a) Sr(a). nasceu? (CL) |_|_|_|_|_|_|
- B10** O(a) Sr(a). freqüentou escola? (1) Sim (2) Não |_|_|
(SE “NÃO”, VÁ PARA C1)
- B11** Qual o último ano (série) completo que o(a) Sr(a). terminou na escola? |_|_|_|
- B12** Até que grau o(a) Sr(a) estudou? (CL) __ grau |_|_|

HÁBITOS DO FUMO

- C1** O(a) Sr(a). fuma ou já fumou em média 1 cigarro ou charuto ou cachimbo,
diariamente pelo menos por 1 ano? |_|_|
SE PAROU NOS ÚLTIMOS 12 MESES, A RESPOSTA É (1) SIM, AINDA FUMA.
(1) sim, ainda fuma (2) nunca fumou (3) somente no passado
(SE “NUNCA”, VÁ PARA C5)

Por favor, descreva os períodos de sua vida em que o(a) Sr(a). fumou cigarro, charuto ou cachimbo, as quantidades que fumou e outros detalhes sobre o fumo. Por favor, tente lembrar as mudanças mais importantes quanto à quantidade e tipo de cada cigarro. Ignore mudanças que ocorreram por períodos curtos (menos de 1 ano).

- C2** O(a) Sr(a). fuma ou já fumou cigarro? (SE “NÃO”, VÁ PARA C3)
(a) Cigarro |_| (1) Sim (2) Não - Idade de início |_|_|_| Idade que parou |_|_|_|
- C3** O(a) Sr(a). fuma ou já fumou charuto? (SE “NÃO”, VÁ PARA C4)
(a) Charuto |_| (1) Sim (2) Não - Idade de início |_|_|_| Idade que parou |_|_|_|
- C4** O(a) Sr(a). fuma ou já fumou cachimbo? (SE “NÃO”, VÁ PARA C5)
(a) Cachimbo |_| (1) Sim (2) Não - Idade de início |_|_|_| Idade que parou |_|_|_|
- C5** O(a) Sr(a). fuma ou já fumou maconha (marijuana), pelo menos uma vez por semana e pelo menos por 6 meses? (SE “NÃO”, VÁ PARA C6)

(a) Maconha |__| (1) Sim (2) Não - Idade de início |__| Idade que parou |__|

AS QUESTÕES C6-C9 SÃO PARA NÃO FUMANTES

C6 O(a) Sr(a). esteve casado(a), ou vivendo junto, com uma(um) fumante? |__|

(1) sim (2) Não **(SE “NÃO”, VÁ PARA C8)**

C7 Descreva o hábito do fumo de sua(seu) esposa(o):

Sua idade quando a esposa(o) iniciou	Sua idade quando a esposa(o) parou	Nº de horas/dia que estava exposto	Nº de horas que fumava em sua presença	Semana	Final
__	__	__	__	__	__
__	__	__	__	__	__
__	__	__	__	__	__

C8 O(a) Sr(a). trabalhou em um lugar fechado onde as pessoas fumassem?

(1) sim (2) Não **(SE “NÃO”, VÁ PARA D1)**

C9 Descreva os períodos durante os quais o(a) Sr(a). trabalhou com fumantes:

Sua idade de início	Sua idade de término	Nº de horas/dia que estava exposto	Nível de fumaça*
__	__	__	__
__	__	__	__
__	__	__	__

*(1) muita

(2) pouca

(3) não lembra

HÁBITOS DE BEBIDA

E1 O(a) Sr(a). já bebeu bebidas de álcool pelo menos 1 vez por mês? |__|

SE PAROU NOS ÚLTIMOS 12 MESES, A RESPOSTA É (1) SIM, AINDA BEBE.

(1) sim, ainda bebe (2) nunca bebeu (3) somente no passado

(SE “NUNCA”, VÁ PARA E7)

E2 Quando é que o(a) Sr(a). bebe (bebia)? |__|

(1) nas refeições (2) entre as refeições (3) ambos

Descreva os períodos de sua vida durante os quais o(a) Sr(a). tomou bebidas alcoólicas. Por favor, tente resumir as mudanças mais importantes em sua vida em relação à

quantidade e tipo de bebida. Ignore quaisquer mudanças ocorridas durante outros períodos de tempo (menos de 1 ano), ou bebidas consumidas ocasionalmente.

Entrevistadores: evitem sobrepor os anos de consumo de uma mesma bebida. Por exemplo, escreva 30-40 e 41-45, e não 30-40 e 40-45. Perguntar separadamente sobre cada bebida.

Unidade (a)

- (1) Copo pequeno – 50 mL
- (2) Copo médio – 100 mL
- (3) Copo grande – 250 mL
- (4) ½ ou pequena garrafa – 330 mL
- (5) Garrafa – 700-750 mL
- (6) Garrafa – 1 l

Por (b)

- (1) Dia
- (2) Semana
- (3) Mês

E3	Cerveja	Idade de início	Idade que parou	Unidade (a)	Quantas consome	Por (b)
		□□□	□□□	□	□□□	□
		□□□	□□□	□	□□□	□
		□□□	□□□	□	□□□	□

E4	Vinho	Idade de início	Idade que parou	Unidade (a)	Quantas consome	Por (b)
		□□□	□□□	□	□□□	□
		□□□	□□□	□	□□□	□
		□□□	□□□	□	□□□	□

E5	Aperitivo (Cachaça)	Idade de início	Idade que parou	Unidade (a)	Quantas consome	Por (b)
		□□□	□□□	□	□□□	□
		□□□	□□□	□	□□□	□
		□□□	□□□	□	□□□	□

E6	Licores	Idade de início	Idade que parou	Unidade (a)	Quantas consome	Por (b)
		□□□	□□□	□	□□□	□
		□□□	□□□	□	□□□	□
		□□□	□□□	□	□□□	□

E7 O(a) Sr(a). tomava ou toma chimarrão habitualmente? |□|

SE PAROU NOS ÚLTIMOS 12 MESES, A RESPOSTA É (1) SIM, AINDA TOMA.

(1) sim, ainda toma (2) nunca tomou (3) somente no passado

(SE “NUNCA”, VÁ PARA F1)

Descreva os períodos de sua vida durante os quais o(a) Sr(a). consumia mate. Por favor, tente resumir as mudanças mais importantes em sua vida em relação à quantidade. Ignore quaisquer mudanças ocorridas durante curtos períodos de tempo (menos de 1 ano). Entrevistadores: evitem sobrepor os anos. Por exemplo, escreva 30-40 e 41-45, e não 30-40 e 40-45.

- E8** Idade de início Idade que parou Quantidade de água por dia (litros, mililitros)
- | | | |
|-----|-----|-----------|
| _ _ | _ _ | _ _ , _ _ |
| _ _ | _ _ | _ _ , _ _ |
| _ _ | _ _ | _ _ , _ _ |
- E9** A que temperatura o(a) Sr(a). costuma ou costumava tomar o mate? |_|
- (1) frio (2) morno (3) quente (4) muito quente

HÁBITOS DE SEXUAIS

- F1** O(a) Sr(a). já esteve casado(a) ou vivendo junto com alguém? |_|
- (1) Sim (2) Não **(SE “NÃO”, VÁ PARA F7)**
- F2** O(a) Sr(a). ainda é casado(a) ou vive como se fosse casado(a)? |_|
- (1) Sim (2) Separado(a) ou divorciado(a) (3) Viúvo(a)
- F3** Quantas vezes o(a) Sr(a). já esteve casado(a) ou vivendo como casado(a)? ... |_|_|
- F4** Quantos anos o(a) Sr(a). tinha pela primeira vez que casou ou viveu como casado(a)? |_|_|
- F5** Até que ano sua(eu) última(o) esposa(o) freqüentou a escola? |_|_|_|
- F6** Qual foi o trabalho mais longo da(o) sua(eu) esposa(o)? |_|_|
- Especificar: _____
- F7** No total, quantos filhos o(a) Sr(a). teve? |_|_|
- F8** No total, quantas(os) parceiros(as) sexuais o(a) Sr(a). já teve? (regulares e casuais) |_|_|_|
- F9** Se difícil responder |_|
- (1) 2-5 (2) 6-10 (3) 11-20 (4) 21-50 (5) 51-100 (6) + de 100

PERGUNTAR F10 E F11 SÓ PARA OS HOMENS

- F10** Destas parceiras, quantas eram mulheres de programa? |_|_|_|
- F11** Se difícil responder |_|

(1) 2-5 (2) 6-10 (3) 11-20 (4) 21-50 (5) 51-100 (6) + de 100

PERGUNTAR PARA TODOS

F12 O(a) Sr(a). já fez sexo colocando sua boca nos genitais da(o) parceira(o)? |__|

(1) Sim (2) Não

F13 Com que frequência? |__|

(1) ocasionalmente (2) frequentemente (3) quase sempre

HISTÓRIA DE DOENÇAS

G1 O(a) Sr(a). já teve verrugas na pele? |__|

(1) Sim (2) Não (3) Não sei

(SE “NÃO”, VÁ PARA G6)

SE A RESPOSTA FOR “SIM”, ONDE? (1) Sim (2) Não

G2 Mãos |__|

G3 Pés |__|

G4 Cabeça e Pescoço |__|

G5 Outros lugares? Especifique: |__|

G6 O(a) Sr(a). já teve sapinho (*Monília*, *Candida albicans*)? |__|

(1) Sim (2) Não (3) Não sei

(SE “NÃO”, VÁ PARA G10)

SE A RESPOSTA FOR “SIM”, ONDE? (1) Sim (2) Não

G7 Genital (nas partes) |__|

G8 Boca |__|

G9 Outros lugares? Especifique: |__|

G10 O(a) Sr(a). já teve lesões de cobreiro (herpes)? |__|

(1) Sim (2) Não (3) Não sei

(SE “NÃO”, VÁ PARA G14)

SE A RESPOSTA FOR “SIM”, ONDE? (1) Sim (2) Não

G11 Lábio |__|

G12 Genital (nas partes) |__|

G13 Outros lugares? Especifique: |__|

G14 O(a) Sr(a). já teve alguma doença venérea (sexualmente transmissível)? |_|

(1) Sim (2) Não (3) Não sei

(SE “NÃO”, VÁ PARA G19)

SE A RESPOSTA FOR “SIM”, ONDE? (1) Sim (2) Não (9) não sei

G15 Sífilis-cancro |_|

G16 Gonorréia-corrimento |_|

G17 Condiloma-verrugas |_|

G18 HIV-AIDS |_|

O(a) Sr(a). já teve alguma problema com a voz (rouquidão, por exemplo) que tenha feito o(a)

Sr(a) procurar o médico? |_|

(1) Sim (2) Não

SE A RESPOSTA FOR “SIM”, QUAIS?

(SE “NÃO”, VÁ PARA H1)

G19 Laringe aguda obstrutiva (crupe) |_|

G20 Laringe crônica |_|

G21 Pólipo de corda vocal ou de laringe |_|

G22 Nódulo de corda vocal |_|

G23 Edema ou estenose de laringe |_|

G24 Abscesso ou granuloma de cordas vocais |_|

G25 Abscesso ou retrofaringe ou parafaringe |_|

G26 Outras? Especifique: |_|

HISTÓRIA DE CÂNCER NA FAMÍLIA

Eu agora vou perguntar sobre seus familiares de 1º grau e esposa(o) ou companheira(o).

H1 Quantos irmãos o(a) Sr(a). teve? |_|_|

H2 Quantas irmãs o(a) Sr(a). teve? |_|_|

H3 Quantas filhas o(a) Sr(a). teve? |_|_|

H4 Quantos filhos o(a) Sr(a). teve? |_|_|

H5 Quantas(os) companheiras(os) o(a) Sr(a). teve? |_|_|

Vamos falar sobre sua mãe/pai/irmã/irmão/filha/filho/esposa(o) ou companheira(o).

H6 Ela(e) ainda vive?

Se sim, quantos anos ela(e) tem? Se não, quantos anos ela(e) tinha quando faleceu?

H7 Ela(e) teve algum tumor maligno?

Se sim, qual?

Com que idade ela(e) estava?

Esta informação é coletada em uma tabela que associa tipo de familiar e doença.

ANEXO 8. PROTOCOLO DE COLETA E COLORAÇÃO PARA ENSAIO DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA BUCAL

1. Grupo amostral

1.1. Grupo de casos: pacientes diagnosticados com carcinoma da laringe sem tratamento prévio.

1.2. Grupo controle: indivíduos livres de qualquer tipo de doença neoplásica.

2. Amostra: células esfoliadas da mucoso oral.

3. Preparo dos Materiais e Soluções

3.1. Lâminas para esfregaço

Foram utilizadas lâminas de vidro para microscopia (26 x 76 mm com precisão dimensional de $\pm 0,95$ a 1,15 mm, da *BioGlass*[®]), previamente limpas e desengorduradas com gaze embebida em éter ou álcool líquido comercial.

3.2. Preparo da Solução de Ácido Clorídrico (HCl) a 10%

A solução de HCl deve ser preparada para uso imediato, evitando armazenamento.

Para o preparo de HCl a 10% ou título 1:10 (volume suficiente para 10 lâminas), proceder da seguinte maneira:

1. Depositar cerca de 100mL H₂O_d em recipiente com capacidade para 200mL de solução;
2. Adicionar lentamente 20mL HCl à água para diminuir a evaporação;
3. Acrescentar novamente H₂O_d q.s.p. 200mL de solução;
4. Dividir os 200mL da solução em dois recipientes nos quais as lâminas serão mergulhadas.

3.3. Preparo da Fucsina Básica

Para o preparo da fucsina básica deve-se proceder da seguinte maneira:

1. Aquecer um recipiente contendo 200mL de H₂O_d até a fervura;
2. Retirar o recipiente do aquecimento e acrescentar lentamente 1,0g de fucsina;
3. Aquecer novamente a solução até atingir a ebulição;
4. Cessar o aquecimento e homogeneizar a solução com bastão de vidro;
5. Filtrar a solução em papel de filtro;

6. E, finalmente, armazenar a solução em frasco âmbar ou ao abrigo da luz, uma vez que a fucsina básica é fotossensível.

A fucsina recém preparada deve ser mantida em repouso pelo menos *overnight* (12 a 16h) antes do uso.

3.4. Preparo do Reagente *fast green*

1. Pesar 0,25g de *fast green* em balança apropriada;
2. Depositar o *fast green* em recipiente com capacidade para 500mL de solução;
3. Adicionando etanol a 95% q.s.p. 500mL de solução;
4. Homogeneizar bem e armazenar a solução.

A solução pode ser armazenada por tempo indeterminado. O *fast green* deve ser usado, no mínimo, uma semana após seu preparo, pois, antes disso, a eficiência da coloração é reduzida.

4. Procedimento Técnico

4.1. Coleta do material: escovado

O indivíduo, doador da amostra, deve ser instruído a enxaguar a boca com água, com o intuito de eliminar o excesso de bactérias e restos de alimentos, que podem dificultar a coloração e posterior realização da técnica de micronúcleo. Caso tenha dentadura, é necessário removê-la. Após higienização, o técnico devidamente paramentado, com o auxílio de um abaixador de língua, deve coletar as células da mucosa bucal, utilizando uma escova de cerdas macias.

Deve-se realizar cerca de 5 a 10 escovadas leves em cada um dos seguintes locais: (1) mucosa do lado direito da boca, de cima para baixo; (2) mucosa do lado esquerdo da boca, de cima para baixo; (3) lado direito da língua; (4) lado dorsal da língua; (5) lado esquerdo da língua; e, finalmente, (6) lado interno dos lábios superior e inferior.

4.2. Confecção da lâmina

Preparar o esfregaço imediatamente após o escovado. As células coletadas, presas nas cerdas da escova, devem ser espalhadas, com movimentos circulares, na superfície de uma lâmina para microscopia previamente preparada (Item 3.1) e identificada com o nome do paciente e o número de estudo. Em seguida, deixar a lâmina secar à temperatura ambiente

(TA) e, finalmente, fixar o material, mergulhando-se a lâmina em álcool a 90%, por 15 minutos.

4.3. Hidrólise ácida do material

Manter um dos recipientes com solução de HCl a 10% (Item 3.2) à TA e manter o segundo recipiente em banho-maria a 60°C. Proceder da seguinte forma:

1. Mergulhar as lâminas fixadas no primeiro recipiente com solução de HCl a 10%, à TA, por 2 minutos;
2. Mergulhar as lâminas no segundo recipiente com solução de HCl a 10%, em banho-maria a 60°C, por 6 minutos;
3. E, finalmente, mergulhar novamente no primeiro recipiente, à TA, por 2 minutos.
4. Neste momento deve-se mergulhar as lâminas, cerca de 10 vezes, em água destilada gelada, para paralisar a hidrólise.

4.4. Coloração com Fucsina Básica

Mergulhar as lâminas em solução de fucsina básica (Item 3.3), por 15 minutos, ao abrigo da luz. E, posteriormente, enxaguar levemente em água corrente para retirar o excesso de corante.

4.5. Coloração com Reagente *Fast Green*

Mergulhar as lâminas em solução de *fast green* (Item 3.4) por 10 segundos. Enxaguá-las em álcool à 70%, também com o intuito de retirar o excesso de corante.

Para lâminas com depósitos: depois de coloradas, passar as lâminas por uma bateria de etanol a 95%, por 1 minuto; butanol, por 1 minuto; butanol/xileno (1:1), por 1 minuto; e, finalmente, deixar no xileno até a montagem com o bálsamo do Canadá.

4.6. Montagem da lâmina

Cobrir o esfregaço com lamínula para microscopia (24 x 60 mm da *Galvani*[®]), fixando-a com bálsamo do Canadá. Assim, as lâminas estarão prontas para serem observadas em microscopia óptica.

ANEXO 9. PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE TECIDO FRESCO

1. Amostras: biópsias de pacientes com carcinoma da laringe, armazenadas a -20°C .

2. Fundamentação teórica:

Apesar do DNA de dupla fita ser bastante estável e resistente a condições adversas, essa biomolécula é fisicamente frágil e vulnerável, mesmo a forças leves, como por exemplo as originadas durante a pipetagem, devido ao seu tamanho. Neste contexto, existe uma dificuldade em se obter moléculas de DNA maiores do que 150kb. Porém, é mais prático e fácil obter fragmentos de DNA com cerca de 50 a 100 kb.

A extração de DNA inclui basicamente os seguintes procedimentos: (1) lise das células (citólise) e (2) purificação do DNA, separando-o de macromoléculas contaminantes, tais como proteínas e RNAs, por digestão enzimática e/ou processos físico-químicos (Farah, 2000).

O local do laboratório e o material utilizado para a extração do DNA devem ser separados daqueles dedicados ao manuseio de DNA clonado em plasmídeos ou outros tipos de vetores. Isso porque a contaminação do DNA genômico durante o processo de extração, por esse tipo de DNA, poderá causar sérios problemas em experimentos futuros. E uma possível fonte de contaminação é o uso comum de centrífugas (Passaglia & Zaha, 2001).

3. Kit utilizado: Kit de purificação de DNA genômico *Wizard[®]* (*Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit - Promega Corporation, EUA*).

4. Armazenamento

As amostras foram encaminhadas ao laboratório (NPR) pela equipe do RCBP, em tubos *ependorff*, com a biópsia fresca. Imediatamente, as amostras foram identificadas e armazenadas a -20°C em freezer.

5. Maceração

As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, antes de serem submetidas a extração e purificação do DNA pelo kit *Wizard[®]*.

6. Protocolo do fabricante

6.1. Preparo do tecido

Adicionar 10-20 mg de tecido fresco em 600µl de solução de lise nuclear (*Nuclei lysis solution*) gelada. Incubou a 65°C por 30 minutos.

6.2. Lise e precipitação protéica

1. Adicionar 3µl de solução de RNase (*RNase solution*) na solução lisada e misturar. Incubar a 37°C por 30 minutos. Resfriar a temperatura ambiente.
2. Adicionar 200µl de solução de precipitação protéica (*Protein precipitation solution*). Levantar ao vortex e resfriar em gelo por 5 minutos.
3. Centrifugar a 14.000 rpm por 4 minutos.

6.3. Precipitação e reidratação do DNA

4. Transferir o sobrenadante para um tubo *ependorff* fresco contendo 600µl de isopropanol à temperatura ambiente.
5. Misturar gentilmente por inversão.
6. Centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto.
7. Remover o sobrenadante e adicionar 600µl de etanol a 70% à temperatura ambiente e misturar.
8. Centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto.
9. Aspirar o etanol e secar o pellet ao ar por 15 minutos.
10. Reidratar o DNA em 100µl de solução de reidratação de DNA (*DNA rehydration solution*) por 1h a 65°C ou *overnight* a 4°C.

7. Conclusão

O kit *Wizard*[®] se mostrou eficaz para a extração e purificação de DNA de material proveniente de biópsias congeladas.

ANEXO 10. AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR

1. Introdução

A reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) foi descrita por Kary Mullis no final dos anos 80 (fato que lhe rendeu o Premio Nobel de Química dez anos mais tarde), como um poderoso método de amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, objetivando a produção de milhões de cópias desta sequência *in vitro* (Farah, 2000).

A PCR é basicamente um método que possibilita a amplificação *in vitro* de sequências de DNA, usando-se para isso dois *primers* (*Forward* e *Reverse*) que hibridizam com as fitas opostas, flanqueando o seguimento alvo. Em suma, na prática, o que se faz é adicionar em um tubo de ensaio uma pequena quantidade de DNA genômico, quatro nucleotídeos que compõem a cadeia de DNA (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), íons Mg^{2+} , a enzima DNA-polimerase, os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) necessários para a ação da polimerase e a solução tampão, que fornecerá as condições de pH e salinidade para o processamento de fragmentos de DNA. O tubo de ensaio é submetido a uma temperatura inicial, geralmente, de 94°C por 5 minutos, para provocar a desnaturação física das moléculas de DNA, através da ruptura das pontes de hidrogênio que mantêm as fitas complementares unidas. Em seguida, a temperatura é rebaixada para cerca de 30 a 60°C por 30 segundos, quando ocorre o anelamento dos *primers*, flanqueando a região do DNA de interesse, que será amplificada. Finalmente, a temperatura é aumentada para 72°C por 1 minuto, que corresponde a temperatura na qual a atividade da Taq-polimerase é máxima, que, então, sintetiza uma nova fita de DNA. A repetição dos passos de desnaturação, anelamento e síntese, por 30 ciclos é suficiente para a obtenção de milhares de fragmentos do DNA alvo (Farah, 2000).

Porém, dois eventos fundamentais foram necessários para a realização da replicação *in vitro* com sucesso e eficiência. O primeiro, foi a descoberta da Taq-DNA-polimerase, ou apenas Taq-polimerase, uma enzima capaz de se manter estável em altas temperaturas (94°C), proveniente de uma bactéria que vive em fontes naturais de águas quentes, chamada *Thermophilus aquaticus*. O segundo, foi a construção do termociclador, ou seja, um equipamento capaz de variar ciclicamente a temperatura por tempos determinados.

Desta forma, a PCR veio revolucionar a genética molecular, pois possibilitou uma nova estratégia de análise de genes por um método simples e rápido de amplificação de

seqüências, abrindo enormes perspectivas para várias áreas, como por exemplo, o diagnóstico de doenças genéticas e a detecção de agentes infecciosos (Farah, 2000).

Assim, a técnica de PCR gerou um grande avanço no desenvolvimento do diagnóstico de doenças infecciosas, provocadas por vírus, bactérias, fungos e protozoários. Com a introdução da PCR nesta área, houve uma melhora significativa tanto em termos de rapidez e sensibilidade, quanto na especificidade dos exames. O papiloma vírus humano (HPV) é um dos vírus, dentre vários outros, que tem sido detectado com o auxílio da PCR (Passaglia & Zaha, 2001).

2. Reagentes utilizados na reação de PCR

1. Tampão com dNTP
2. Taq-DNA-Polimerase
3. Água Mili-Q
4. Íons Mg^{2+}

3. Protocolo de PCR

As quantidades dos reagentes, utilizadas para a realização da PCR, podem ser vistas na Tabela I.

Tabela I. Protocolo da quantidade de reagentes utilizados para realização da PCR.

Reagentes	Concentração Inicial	Concentração Final	Volume por reação (µL)	Volume Final (µL)
Tampão com dNTP	10x	1x	2,7	Multiplica-se cada volume por reação pelo número de reações + 1
Primers	15 pmoles	15 pmoles	1,0	
Taq-polimerase	5,0 U/mL	2,5 U/mL	0,3	
DNA	N/A*	50-100 ng	5,0	
H ₂ O	N/A	N/A	16	
Total			25	N/A*

*N/A: Não aplicável

O protocolo de termociclagem utilizado na otimização da PCR consiste de uma estratégia de *touchdown*. É um procedimento utilizado com o intuito de aumentar a estríngência da reação, ou seja, a competitividade pela região alvo, diminuindo, assim, as amplificações inespecíficas. O protocolo de *touchdown* consiste na utilização de uma

temperatura inicial de anelamento do *primer*, maior que a recomendada pelo fabricante (cerca de 10°C acima), com gradual diminuição de 1°C por ciclo. Todo o protocolo de termociclagem pode ser visto na Tabela II.

Tabela II. Protocolo otimizado de termociclagem, incluindo a abordagem de *touchdown*, para amplificação de genomas de HPV pela metodologia de PCR.

Estágios	Temperatura	Tempo	No. de Ciclos
Desnaturação Inicial	94°C	5 min	1
Desnaturação Cíclica	94°C	1 min	(1 ciclo/temp) 20
Anelamento (<i>Touchdown</i>)	(58-49)-48°C	50 s	
Extensão Cíclica	72°C	50 s	
Extensão Final	72°C	5 min	1
Repouso	4°C	∞	N/A

4. Produtos de PCR

Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese. O DNA foi submetido a um campo elétrico constante de 8V/cm em gel de poliacrilamida 6% em TBE1x. Para a visualização das bandas amplificadas, o gel foi corado em banho de solução de brometo de etídio (5µg/mL). As imagens foram capturadas por um sistema de vídeo documentação.

ANEXO 11. GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ELETROFORESE

1. Introdução

Com a influência de uma diferença de potencial elétrico, átomos, moléculas e partículas providas de cargas, em solução aquosa, são capazes de migrar na direção do eletrodo de carga oposta. Essa migração, em meio de viscosidade definida, acontecerá em diferentes velocidades, uma vez que as moléculas apresentam cargas e massas variáveis.

A mobilidade eletroforética, definida pela velocidade de migração por unidade de campo elétrico, é um parâmetro característico da molécula em um determinado meio de eletroforese. Este parâmetro é influenciado pela quantidade de cargas e o tamanho da molécula.

Assim, a eletroforese é um método conhecido há muitos anos, mas era utilizada, principalmente, para separar RNA e proteína. Após a década de 70, a eletroforese passou a ser utilizada para a separação de DNA, pois tais moléculas apresentam cargas negativas, devido à presença do grupamento fosfato em sua estrutura. Desta forma, quando submetido a um campo elétrico, em pH neutro, as moléculas de DNA migram do pólo negativo (cátodo) para o pólo positivo (ânodo). Sob ação de um campo elétrico, se o DNA está inserido em uma matriz que apresenta determinada resistência à migração, as moléculas pequenas alcançarão maiores distâncias que as grandes, gerando uma migração diferencial dos fragmentos (Farah, 2000).

A matriz de resistência pode ser constituída de agarose, que possuem poros que permitem a separação de fragmentos que variam de 200pb a 50kb, e de poliacrilamida, que permitem a separação de fragmentos muito pequenos até de 1000pb.

A força iônica, concentração total de íons, do tampão deve ser baixa, o mínimo para garantir um pH constante, reduzindo-se, desta forma, as correntes iônicas que fluem pelo gel e a dissipação térmica excessiva.

2. Protocolo de eletroforese

No caso particular desta dissertação, todos os géis usados para separar os fragmentos de DNA, amplificados por PCR, foram de poliacrilamida a 6%. Para a realização da eletroforese, submeteram-se os géis a uma voltagem constante de 8V/cm, por um tempo médio de 1:30h. Em cada canaleta foram aplicados cerca de 15 µL de amostra com 3 µL de corante de corrida. Após a corrida, o gel foi corado em banho de brometo de etídio (5µg/mL)

por um período de 15 a 20 minutos. E, finalmente, os fragmentos eram revelados com o sistema de vídeo documentação (VDS[®] da Amersham Pharmacia Biotech, EUA).

3. Protocolo do gel de poliacrilamida

A acrilamida é um monômero neurotóxico potente com ação cumulativa. Por isso, para trabalhar com acrilamida é necessário utilizar todos procedimentos de segurança. O protocolo utilizado na prática desta dissertação está na tabela a seguir:

Tabela I. Protocolo de preparação do gel de poliacrilamida a 6%.

Reagentes	Volume (mL)	
	1 gel (10mL)	2 géis (25mL)
Acrilamida 40%*	1,5	3,75
H ₂ O	5,9	14,75
TBE 10x (pH 8,0)	2,0	5,0
APS 10%	0,1	0,25
TEMED	0,01	0,025

*Para a confecção da acrilamida a 40% acrescenta-se acrilamida e bis-acrilamida em uma proporção de 19:1, ou 38g de acrilamida para 2g de bis-acrilamida q.s.p. 100 mL.

4. Soluções utilizadas

4.1. Tris-Borato de EDTA (TBE 10x)

- Tris base 108 g
- Ácido bórico 55 g
- EDTA 0,5 M (pH 8.0) 40 mL
- H₂Odd q.s.p 1 litro

4.2. Persulfato de Amônia (APS 10%)

- APS 10 g
- H₂Odd q.s.p 100 mL

4.3. EDTA 0,5M pH 8,0

- EDTA (pm 372,24) 186.12 g
- H₂Odd q.s.p 1000 mL
- Controle o pH com NaOH (20 g de NaOH)

4.4. Corante de Corrida 6x

- Azul de Bromofenol 0.25%
- Xileno Cianol FF 0.25%
- Ficol tipo 4000 15%
- EDTA 120 mM

ANEXO 12 PROTOCOLO PARA A PREPARAÇÃO DE LÂMINAS PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO POR FUCSINA E FAST GREEN

1.1 Preparo das lâminas e esfregaços

Previamente à coleta de células da mucosa oral, foi solicitado que enxaguassem a boca com água corrente a fim de se eliminar a presença de possíveis restos de alimentos e reduzir a concentração bacteriana dos esfregaços nas lâminas.

Usando-se as lâminas devidamente limpas com álcool 99,5°GL e um abaixador de língua umedecido em água, as células da mucosa oral foram raspadas e espalhadas sobre as lâminas. O esfregaço foi à temperatura ambiente sendo posteriormente fixados em álcool 99,5°GL por 15 minutos.

1.2 Reação de PAS (Ácido Periódico de Schiff)

Hidrólise ácida do DNA:

Realizou-se a hidrólise a um título de 1:10 (10%), usando-se 20mL de ácido clorídrico (HCl) e 200mL de água destilada (H₂O_d). O volume indicado foi suficiente para 10 lâminas. Ao se preparar a solução, acrescentou-se o ácido lentamente a fim de diminuir a evaporação. As lâminas foram deixadas em solução HCl 10% por 2 minutos a temperatura ambiente e em seguida, por 6 minutos em banho-maria à 60°C, onde se esperou atingir a temperatura especificada para se colocar as lâminas. Finalmente, as lâminas foram levadas de volta à temperatura ambiente.

Preparo da fucsina básica:

Dissolveu-se 1g de fucsina básica em 200mL de água destilada a 100° C. Filtrou-se a solução em papel-de-filtro e manteve-se ao abrigo da luz.

Coloração das lâminas:

Mergulharam-se as lâminas em solução de fucsina básica por 15 minutos ao abrigo da luz e logo após, enxaguou-se levemente com água para retirar o excesso de corante.

1.3 Contra-coloração com *Fast Green*

Preparo do reagente *Fast Green*:

Colocou-se 0,25g de *Fast Green* em um frasco, onde se adicionou etanol 95% em uma quantidade suficiente para 500mL.

Coloração pelo reagente *Fast Green*:

Levou-se as lâminas à solução de *Fast Green* por 10 segundos. Passado o tempo, as lâminas foram enxaguadas em álcool a 70%.

1.4 Lavagem e retirada de depósitos:

As lâminas com depósitos de corantes, resíduos de luvas e outros materiais sofreram, após a coloração, uma bateria de etanol a 95% por 1minuto, butanol por 1minuto, butanol/xileno (mistura 50:50) por 1 minuto e xileno, deixando-se no xileno até a montagem com o bálsamo do Canadá.