



**Serviço Público Federal
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação
Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

**IMPLICAÇÕES DO POLIMORFISMO GENÉTICO DE *CYP1A1*,
GSTM1 E *GSTT1* NA SUSCETIBILIDADE DO
CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LARINGE**



**Serviço Público Federal
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação
Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

**IMPLICAÇÕES DO POLIMORFISMO GENÉTICO DE *CYP1A1*,
GSTM1 E *GSTT1* NA SUSCETIBILIDADE DO
CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LARINGE**

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

Orientando: Raimundo Lima da Silva Júnior, B.Sc.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, Ph.D.

*Aos meus pais,
pelo exemplo de amor e dedicação aos filhos.*

*A todos os pacientes e profissionais do Hospital
Araújo Jorge - ACCG, pelas lutas diárias e
exaustivas contra o câncer.*

As atividades experimentais realizadas para o desenvolvimento do presente estudo contou com a colaboração das seguintes instituições: Universidade Federal de Goiás (UFG) – Programa de Pós-graduação Mestrado em Biologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB); Núcleo de Pesquisas Replicon da Universidade Católica de Goiás (UCG); Registro de Câncer de Base Populacional da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG); Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular LaGene – SULEIDE – SES-GO; Serviço de Patologia do Hospital Araújo Jorge, Conselho de Aperfeiçoamento em Pesquisa e Ensino Superior (CAPES) e da *International Agency for Research on Cancer* (IARC).

*Vem, vamos embora, que esperar não é saber.
Quem sabe faz a hora, não espera acontecer.*

Geraldo Vandré

AGRADECIMENTOS

O final de uma caminhada começa pelo primeiro passo. Somados a esse começo e o fim existiram pessoas que me acompanharam em diferentes fases dessa importante etapa de minha vida.

Agradeço a Deus por ser minha fonte de fé e persistência em todos os momentos, alegres ou difíceis, e por me carregar nos braços em momentos difíceis de minha vida.

Aos meus queridos pais, Raimundo Lima da Silva e Zenilda Araújo de Souza Silva (in memoriam), fontes de vida, os meus fraternos agradecimentos por abdicarem de seus sonhos e bens em virtude da educação e saúde de seus filhos. Ao meu PAI, por todos os sonos “bem” perdidos ao me arrumar a cada manhã me preparando para as aulas. Pelos lanches da manhã. Pelas incansáveis caminhadas ao colégio, natação e futebol. E principalmente, por me ensinar que o caráter e a humildade são as principais heranças que um pai pode deixar ao filho. À minha MÃE, por todo o exemplo de luta e coragem, que literalmente, doou sua vida para educar e amar seus filhos e que fez, com toda a excelência, o seu papel de professora, esposa, amiga e mãe, em sua passagem por esta vida.

Aos meus irmãos, Jorsiney Araújo Lima Silva e Júlia Chely Araújo Lima Silva, por fazerem diferença em minha vida. Agradeço fraternalmente, cada momento de alegria e cumplicidade compartilhadas, e por dar a ela um sabor especial de família. À minha madrinha Francisca Araújo de Souza Macedo e a minha tia Maria Araújo de Souza, por preencherem minha mente e meu coração com ensinamentos de fé e esperança.

A Iracema Brendler Friedrich de Castro Fonseca, minha namorada, por sempre acreditar, tentar, estimular e acima de tudo, compartilhar todos os momentos, tristes e felizes que passamos juntos. De forma contínua e incansável, ela conseguiu estar sempre ao meu lado, me encorajando e vibrando em cada conquista. Ao Cristiano Brendler Friedrich de Castro Fonseca e Maynarro Brendler Friedrich de Castro Fonseca pelo companheirismo e amizade compartilhados. A minha querida “mãe” Lúcia Cristina Friedrich Fonseca e ao Sr. Marconi de Castro Fonseca pelo carinho e valiosos conselhos de “pais” que aprendi. Pais! Não de sangue, mas de escolha; e a toda família Brendler-Fonseca que me incentivou na busca dos meus sonhos.

Aos meus amigos, Profa. Sônia de Bessa, Prof. Luiz de Paula Silveira Júnior, M.Sc. e Profa. Roberta de Bessa Ferreira de Paula, M. Sc., por permitirem e incentivarem o início desta caminhada. O apoio deles foi fundamental para que eu pudesse engajar nesta jornada e acima de tudo, que eu conseguísse diferenciar o valor profissional do valor humano. Em nome da minha família, o meu muito obrigado a vocês.

Ao meu “pai-amigo-professor” e orientador, Professor Dr. Aparecido Dívino da Cruz, Ph.D., Prof. PEIXOTO, pela oportunidade de me mostrar capaz, de alcançar meus objetivos e de acreditar que os sonhos são possíveis. Agradeço intensamente, não só pelas horas de dedicação à minha formação acadêmica e científica, como também, pelas horas de conselhos, conversas e “construção de cercas rurais”. Obrigado por estar “sempre ao meu lado, enfrentando desafios, destruindo paradigmas no alcance da felicidade”. Ao senhor, o meu sincero e profundo reconhecimento por todas as horas de vigia dedicadas à minha formação. Sou eternamente grato por tudo, pai!

À minha “mãe”, Professora Dra. Vera Aparecida Saddi, que com um gesto não pré-meditado, assinou o início dessa caminhada. Meus sinceros agradecimentos por me ensinar que a vida é um desafio ao qual estamos dispostos a enfrentá-los e que sentimentos nobres, como a fé e a persistência fazem de nós, pessoas mais fortes e convíctas de nossa real capacidade. Obrigado, Verinha!

Agradeço ao meu amigo, Prof. Cláudio Carlos da Silva, M.Sc., por todo o aprendizado durante a preparação e execução das aulas de Genética, como seu monitor; pelo exercício da ciência no desenvolvimento do seu doutorado, e por me deixar sempre “alerta” nas tardes do Programa de Pós-Graduação em Biologia da UFG. Ao meu amigo Prof. Antônio Márcio Teodoro Cordeiro Silva, M.Sc., pelos momentos produtivos durante as aulas compartilhadas no Laboratório de Genética da UCG e na descontração e cumplicidade das aulas da Pós-Graduação da UFG.

A minha outra “mãe”, Profa. Angela Adamski da Silva Reis, M.Sc., pelos momentos de incentivo e de carinho em todos os momentos da minha formação científica e pelas horas de molecagem dentro e fora do Núcleo de Pesquisas Replicon. Obrigado Angela!

Aos meus co-orientandos, Camila Gonzaga Espíndola Chaves, Carolíne Dias Monteiro, Julles Cristiane Rodrigues da Silva, Leonardo Barcelos de Paula e Sara Mílhomens Martins, que me permitiram exercer a prazerosa tarefa de co-orientá-los.

Obrigado por todas as horas de dedicação e amizade. A vocês os meus mais sinceros agradecimentos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia, da UCG, em especial ao Prof. Dr. Antônio Henrique, Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva, Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres, Ph.D. e Profa. Dra. Kátia Karina Verolli O. Moura pelo valioso auxílio durante a realização deste estudo.. Aos vigias do Bloco L, Área IV, da Universidade Católica de Goiás: Sr. Jaime, Sr. Jander e Sr. Jesus, pela companhia e principalmente, por guardar minha segurança durante a realização das reações no laboratório aos finais de semana e feriados.

Aos meus amigos do Núcleo de Pesquisas Replicon, em especial ao Eduardo Rocha Pedrosa, Esp., que se mostrou um verdadeiro irmão e amigo dentro e fora do laboratório. À Jalsi Tacon Arruda, Esp., Kelly de Castro Caçula, B.Sc., Marcus Vinícius Paiva de Oliveira, M.Sc., Priscilla Rosa. À equipe do LaGene, em especial a Sandra Maria Torres e Emília Oliveira, Esp., que sempre se mostraram prontos a me ajudar em qualquer tarefa. À Dra. Maria Paula Curado, pelo seu valioso apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, chefiado pelo Professor Dr. Ruy Souza Lino Junior, no qual devo meus sinceros agradecimentos pela prestatividade e auxílio na realização deste trabalho. Aos meus amigos do Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, bem conduzido pela Professora Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda, com o seu valioso auxílio no desenvolvimento da pesquisa de modelo animal. Ao amigo César Augusto Sam Tiago Vilanova Costa e Flávia Castro Pereira, pelo companheirismo e amizade.

Aos professores do Programa de Mestrado da Universidade Federal de Goiás, em especial ao Prof. Dr. Luiz Arthur Mendes Bataus e a Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares pelas horas que me permitiram acrescentar na minha formação. Ao todos os colegas do curso de Pós-Graduação, em especial à Alessandra de Santana ribeiro, Lesli van Ubiratan de Moraes, Regiane Christine, Rodrigo da Silva Santos e Gustavo Nogueira Caixeta, nos quais tive o privilégio da convivência.

Aos professores do Departamento de Biomedicina, da UCG, em especial ao Prof. Cláudio Lobo Mecnas, Esp., Prof. Marcos Vinícius Milki, M.Sc., Profa. Janine de Aquino Lemos, M.Sc., Prof. Wilson de Melo Cruvinel, M.Sc., Profa. Dagmar Junqueira Guimarães

Silva, M.Sc. e Prof. Luiz Murilo Martins de Araújo, Esp., pelo valioso auxílio incondicional na minha descoberta e fascinação pela ciência.

Aos meus amigos da turma de Biomedicina 2005/2, UCG - Alíne Leão, Ana Flávia Batista Penido, Ana Paula Figueiredo, Daniella Ribeiro de Paula, Fábio Hosokawa, Fernanda Hélia, Fernanda Messias, Galba Fucilieri, Janaína Mendonça, Kamila Carla, Lana Cristina, Letícia Jakcely, Lorena Fernandes, Rogério Fraga Troian, Tatyane Campos e Yves Mauro, pela diferença que fizeram em minha vida e principalmente, pelo o exercício da amizade durante todo o tempo em que estivemos juntos.

À equipe do Registro de Câncer de Base Populacional da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Carleane Maciel Bandeira, Elcivone Ciríneu de Souza, Matinair Siqueira Mineiro e Edésio Martins Luciano Pereira Gomes que estruturaram todo o banco de dados disponível para a realização deste estudo.

Aos pacientes do grupo caso e controle, que se dispuseram voluntariamente, doando amostras biológicas e dados sócio-demográficos, para a realização deste trabalho. Aos pacientes com CEC da laringe, o meu mais sincero voto de estima e reconhecimento pela luta diária contra a doença e principalmente, por permitir o uso dos seus dados clínico-patológicos para a geração de conhecimento científico-tecnológico em busca de dias melhores para aqueles acometidos por essa doença.

A todos vocês, que contribuíram direta ou indiretamente para que essa caminhada chegasse ao final. OBRIGADO POR TUDO!

ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	iii
APOIO	v
EPÍGRAFE.....	vi
AGRADECIMENTOS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xviii
LISTA DE ANEXOS	xx
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xxi

CAPÍTULO I. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LARINGE, NO ESTADO DE GOIÁS (1998 A 2008).....24

Resumo	24
<i>Abstract</i>	<i>24</i>
1. Aspectos Gerais da Embriologia, Anatomia e Histologia da Laringe	25
1.1. Fisiologia	27
2. Carcinoma Espinocelular da Laringe	29
2.1. Epidemiologia.....	29
2.2. Fatores de risco	30
2.3. Classificação e estadiamento.....	32
2.4. Diagnóstico e Aspectos Clínicos.....	38
2.5. Tratamento	37
3. Objetivos	38
3.1. Geral	38
3.2. Específicos	38
4. Material e métodos	39
5. Resultados e Discussão	40
6. Conclusão	40

CAPÍTULO II. SUSCETIBILIDADE GENÉTICA AO CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO: REVISÃO DE LITERATURA

Resumo	50
<i>Abstract.....</i>	<i>50</i>
1. Introdução	51

1.1. Biotransformação de agentes xenobióticos.....	52
1.2. Polimorfismos genéticos	53
2. Suscetibilidade genética ao câncer de cabeça e pescoço.....	57
3. Considerações finais	60

CAPÍTULO III. ANÁLISE DO POLIMORFISMO <i>CYP1A1m1</i> ASSOCIADO À SUSCETIBILIDADE GENÉTICA DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LARINGE.....	61
Resumo	61
Abstract	61
1. Introdução	62
1.1. Citocromo P450 (<i>CYP450</i>)	62
1.1.1. O gene <i>CYP1A1</i>	64
1.1.2. A proteína <i>CYP1A1</i>	67
1.1.3. Ação catalítica da <i>CYP1A1</i>	68
2. Objetivos.....	70
2.1. Geral	70
2.2. Específicos	70
3. Materiais e métodos.....	71
3.1. Grupo amostral.....	71
3.2. Obtenção das amostras	71
3.3. Extração de DNA	71
3.4. Genotipagem do Gene <i>CYP1A1m1</i> pela técnica de PCR-RFLP.....	72
3.5. Análise estatística e determinação da sobrevida.....	74
4. Resultados.....	75
5. Discussão.....	80
6. Conclusões	85

CAPÍTULO IV. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS <i>GSTM1</i> (nulo) E <i>GSTT1</i> (nulo) ASSOCIADOS À SUSCETIBILIDADE GENÉTICA DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LARINGE	86
Resumo	86
Abstract	86
1. Introdução	87
1.1. Glutathione-S-transferase (<i>GST</i>).....	87
1.1.1. Os genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	89
2. Objetivos.....	95

2.1. Geral	95
2.2. Específicos	95
3. Materiais e métodos.....	96
3.1. Grupo amostral.....	96
3.2. Obtenção das amostras	96
3.3. Extração de DNA	96
3.4. Genotipagem dos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> pela técnica de PCR <i>Multiplex</i>	97
3.5. Análise estatística e determinação da sobrevida.....	98
4. Resultados.....	100
5. Discussão.....	103
6. Conclusões	108
 CAPÍTULO V. AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ALÉLICA DOS GENES <i>Cyp2a29</i> E <i>Gstp1</i> EM CAMUNDONGOS <i>BALB/c</i> SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA PELA CICLOFOSFAMIDA NO TRATAMENTO DO SARCOMA 180.....	 109
Resumo	109
Abstract	109
1. Introdução	110
1.1. Aspectos gerais da Farmacogenética	110
1.2. O Sarcoma 180 (S180) e sua utilização em camundongos (<i>Mus musculus</i>)	112
1.3. Ciclofosfamida	113
1.4. Polimorfismo genético de <i>Cyp2c29</i>	116
1.5. Polimorfismo genético de <i>Gstp1</i>	119
2. Objetivos.....	122
2.1. Geral	122
2.2. Específicos	122
3. Material e métodos	123
3.1. Grupo amostral.....	123
3.2. Cálculo da DL ₅₀	123
3.2.1. Administração da Ciclofosfamida.....	123
3.3. Ensaio pré-clínico	124
3.3.1. Linhagem tumoral do Sarcoma 180 (S-180).....	125
3.3.2. Tratamento com a Ciclofosfamida (CF)	126
3.3.3. Acompanhamento e análise dos aspectos clínicos.....	126
3.3.4. Eutanásia dos animais, coleta e armazenamento dos órgãos	126

3.3.5. <i>Análise anatomopatológica dos rins, baço, fígado, pulmões e coração</i>	127
3.4. Identificação dos Polimorfismos dos genes <i>Cyp2C29</i> e <i>Gstp1</i>	128
3.5. Análise estatística e determinação da sobrevida	128
4. Resultados e Discussão	129
4.1. Cálculo da DL₅₀	129
4.2. Avaliação da eficácia e toxicidade da ciclofosfamida	132
4.3. Investigação do polimorfismo genético de <i>Cyp2c29</i> e <i>Gstp1</i> no processo de bioativação e detoxificação da ciclofosfamida	137
5. Conclusões	140
ANEXOS.....	141
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LARINGE, NO ESTADO DE GOIÁS (1998 A 2008).

Figura 1. Esquema anatômico da localização da laringe (prega vocal), situado no plano mediano e anterior do pescoço, interligando a faringe à traquéia.....	24
Figura 2. Desenho esquemático ilustrando a vista anterior e posterior da laringe, a epiglote, o osso hióide, a traquéia e as cartilagens tireóide e cricóide.....	26
Figura 3. Frequência percentual dos casos de CEC de laringe por sexo, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.....	40
Figura 4. Frequência percentual dos casos de CEC de laringe por faixa etária, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.....	41
Figura 5. Frequência percentual dos casos de CEC de laringe segundo hábitos tabagista e etilista, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008	42
Figura 6. Frequência percentual dos casos de câncer de laringe por tratamento, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008	44
Figura 7. Sobrevida relativa geral para o CEC de laringe nos casos analisados, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008	45
Figura 8. Sobrevida relativa por sexo para o CEC de laringe nos casos analisados, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008	45
Figura 9. Sobrevida relativa por etnia para o CEC de laringe nos casos analisados, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.	46
Figura 10. Sobrevida relativa por setor de ocupação (setor 1º e 3º) para o CEC de laringe, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008	46
Figura 11. Sobrevida relativa por setor hábitos tabagista e etilista para o CEC de laringe, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.	47
Figura 12. Sobrevida relativa por estadiamento TNM para o CEC de laringe, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.....	47
Figura 13. Sobrevida relativa por tratamento para o CEC de laringe, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008	48

CAPÍTULO II. SUSCETIBILIDADE GENÉTICA AO CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO: REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Desenho esquemático mostrando as fases do biometabolismo de agentes xenobióticos: Fase I (bioativação) e II (detoxificação)	54
Figura 2. Desenho esquemático dos mecanismos moleculares de polimorfismos nas enzimas de biotransformação, modificado de Wormhoudt <i>et al.</i> (1999).....	56

Figura 3. Desenho esquemático demonstrando o processo de bioativação da molécula de benzo(a)pireno pela enzima CYP1A1 e mEH (Epóxido hidroxilase).....57

CAPÍTULO III. ANÁLISE DO POLIMORFISMO *CYP1A1m1* ASSOCIADO À SUSCETIBILIDADE GENÉTICA DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LARINGE.

Figura 1. Nomenclatura atribuída à família dos genes *CYP450* proposta por Nelson *et al.*

63

Figura 2. Desenho esquemático do gene *CYP1A1*, indicando a localização dos elementos responsivos (ER) ao fator de crescimento epidermal (EGF), agentes xenobióticos e ácido retinóico. As variantes alélicas *m5*, *m6* e *m7* estão localizadas na extremidade 5' (região promotora e TATAbox) e as variantes *m2*, *m3* e *m4* no éxon 7. Por fim, a variante *m1* está localizada na região UTR 3'..... 65

Figura 3. Estrutura bioquímica do grupo prostético heme do citocromo P450 (adaptado de Gibson & Skett, 1994)..... 68

Figura 4. Gel de Agarose a 1.5% indicando o resultado da genotipagem do gene *CYP1A1m1*... 73

Figura 5. Gráfico de Sobrevida dos pacientes T/T x T/C..... 78

Figura 6. Gráfico de Sobrevida dos pacientes T/T x C/C..... 78

Figura 7. Gráfico de Sobrevida dos pacientes T/C x C/C..... 79

CAPÍTULO IV. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS *GSTM1* (nulo) E *GSTT1* (nulo) ASSOCIADOS À SUSCETIBILIDADE GENÉTICA DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LARINGE.

Figura 1. Estrutura bioquímica do Glutatião reduzido (GSH) [γ – Glutamilocisteiniloglicina]. 87

Figura 2. Desenho esquemático mostrando as posições dos genes da classe Mu de *GST*, no cromossomo 1, e a representação do alelo selvagem e mutante do gene *GSTM1*90

Figura 3. Desenho esquemático mostrando as posições dos genes da classe Teta de *GST*, no cromossomo 22, e a representação do alelo selvagem e mutante do gene *GSTT1*91

Figura 4. Gel de Agarose a 1.5% indicando o resultado da genotipagem do gene *CYP1A1m1*98

Figura 5. Gráfico de Sobrevida dos pacientes *GSTM1* nulo e presente.....103

Figura 6. Gráfico de Sobrevida dos pacientes *GSTT1* nulo e presente.....103

CAPÍTULO V. AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ALÉLICA DOS GENES *Cyp2a29* E *Gstp1* EM CAMUNDONGOS *BALB/c* SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA PELA CICLOFOSFAMIDA NO TRATAMENTO DO SARCOMA 180.

Figura 1. Estrutura bioquímica da ciclofosfamida indicando o grupo bis-(2-cloroetil) ligado no centro com a molécula de nitrogênio115

Figura 2. Desenho esquemático mostrando a ação da <i>Cyp3a13</i> , <i>Cyp2c29</i> e <i>Cyp2b10</i> no metabolismo da ciclofosfamida, resultando nos metabólitos mostarda de fosforamida (efeito terapêutico) e acroleína (efeito tóxico). Modificado de Watters <i>et al.</i> (2003)	117
Figura 3. Desenho esquemático do gene <i>Cyp2c29</i> , indicando a localização do polimorfismo 318G>T, localizado no éxon 2, assim como as extremidades 5' (região promotora e TATAbox) e 3' (região UTR)	118
Figura 4. Desenho esquemático do gene <i>Gstp1</i> , indicando a localização do polimorfismo genético 313A>G, localizado no éxon 4, assim como as extremidades 5' (região promotora e TATAbox) e 3' (região UTR)	120
Figura 5. Variação da diferença da média dos pesos corporais dos camundongos <i>BALB/c</i> submetidos a doses diferentes de ciclofosfamida, do dia 8 pós-morte e do dia 1 da pré-inoculação	121
Figura 6. Cálculo da Dose letal media (DL ₅₀) da ciclofosfamida em camundongos <i>BALB/c</i> , segundo o modelo Probits	130
Figura 7. Variação da massa corporal (Δm), em gramas, durante a Fase I do crescimento tumoral do S-180, em camundongos <i>BALB/c</i>	132
Figura 8. Variação da area da pata posterior esquerda (ΔA), em mm ² , durante a Fase I do crescimento tumoral do S-180, em camundongos <i>BALB/c</i>	133
Figura 9. Variação da area da pata posterior esquerda (ΔA), em mm ² , durante a Fase III do crescimento tumoral do S-180, em camundongos <i>BALB/c</i>	134
Figura 10. Avaliação da massa corporal (Δm), em gramas, durante todo o experimento, em camundongos <i>BALB/c</i>	135
Figura 11. Avaliação do grau de toxicidade, segundo a massa (em gramas) dos órgãos comumente relacionados à resposta ao tratamento da ciclofosfamida, em camundongos <i>BALB/c</i>	136

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LARINGE, NO ESTADO DE GOIÁS (1998 A 2008).

Tabela I. Classificação Internacional das Doenças para Oncologia (CID-O). Topografia: Laringe – C32 (INCA, 2006).....32

Tabela II. Classificação do tumor primário (T) e nódulos linfáticos regionais (N) para o câncer supraglótico, glótico e subglótico, segundo o INCA (2004)33

Tabela III. Frequência percentual dos casos de câncer de laringe por topografia, na população de Goiânia, no período de 1998 a 200843

Tabela IV. Frequência percentual dos casos de CEC de laringe por estadiamento TNM44

CAPÍTULO III. ANÁLISE DO POLIMORFISMO *CYP1A1m1* ASSOCIADO À SUSCETIBILIDADE GENÉTICA DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LARINGE.

Tabela I. Relação das variantes alélicas do gene *CYP1A1*.....56

Tabela II. Características gerais dos *primers* utilizados para a avaliação genômica em pacientes com Câncer da Laringe72

Tabela III. Protocolo de termociclagem para a genotipagem de *CYP1A1m1*72

Tabela IV. Distribuição dos dados sócios demográficos, quanto à idade e sexo, dos pacientes caso e controle75

Tabela V. Distribuição das frequências alélicas entre as populações caso e controle.....75

Tabela VI. Distribuição das frequências genotípicas entre as populações caso e controle.....76

Tabela VII. Resultado do teste de *Odds Ratio* para a variante *CYP1A1m1*76

Tabela VIII. Resultado do teste de *Odds Ratio* para a variante *CYP1A1m1*, em homens.....76

Tabela IX. Resultado do teste de *Odds Ratio* para a variante *CYP1A1m1*, em mulheres.....77

Tabela X. Resultado do teste de *Odds Ratio* para a variante *CYP1A1m1*, em tabagistas77

Tabela XI. Resultado do teste de *Odds Ratio* para a variante *CYP1A1m1*, em etilistas.....77

Tabela XII. Distribuição das frequências genotípicas em relação à idade em intervalos de tempo77

Tabela XIII. Distribuição das sobrevidas dos pacientes com câncer da laringe de acordo com o genótipo.....78

CAPÍTULO IV. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS *GSTM1* (*nulo*) E *GSTT1* (*nulo*) ASSOCIADOS À SUSCETIBILIDADE GENÉTICA DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LARINGE.

Tabela I. Características gerais dos <i>primers</i> utilizados para a avaliação genômica em pacientes com Câncer da Laringe	97
Tabela II. Protocolo de termociclagem para a genotipagem dos <i>primers</i> <i>RH92600</i> , <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	98
Tabela III. Distribuição dos dados sócios demográficos, quanto à idade e sexo, dos pacientes caso e controle	100
Tabela IV. Distribuição das frequências genotípicas para <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> entre as populações caso e controle	101
Tabela V. Resultado do teste de <i>Odds Ratio</i> para os genótipos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	101
Tabela VI. Resultado do teste de <i>Odds Ratio</i> para os genótipos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> , em homens.	101
Tabela VII. Resultado do teste de <i>Odds Ratio</i> para os genótipos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> , em mulheres	101
Tabela VIII. Resultado do teste de <i>Odds Ratio</i> para os genótipos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> , em tabagistas	102
Tabela IX. Resultado do teste de <i>Odds Ratio</i> para os genótipos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> , em etilistas	102
Tabela X. Distribuição das frequências genotípicas em relação à idade em intervalos de tempo	102
Tabela XI. Distribuição das sobrevidas dos pacientes com câncer da laringe de acordo com os genótipos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	103
 CAPÍTULO V. AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ALÉLICA DOS GENES <i>Cyp2a29</i> E <i>Gstp1</i> EM CAMUNDONGOS <i>BALB/c</i> SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA PELA CICLOFOSFAMIDA NO TRATAMENTO DO SARCOMA 180.	
Tabela I. Distribuição amostral dos grupos caso-controle	125
Tabela II. Distribuição das etapas realizadas durante a experimentação animal no tratamento do S-180 com a ciclofosfamida em camundongos <i>BALB/c</i>	126
Tabela III. Características gerais dos <i>primers</i> utilizados para a identificação genotípica dos genes <i>Cyp2c29</i> e <i>Gstp1</i>	128
Tabela IV. Variação da média da massa corporal (m), em gramas, dos camundongos <i>BALB/c</i> de acordo com as diferentes doses de ciclofosfamida	131
Tabela V. Frequência da presença dos graus de congestão dos órgãos analisados nos camundongos <i>BALB/c</i> submetidos a doses diferentes de ciclofosfamida	131
Tabela VI. Distribuição das frequências genotípicas de <i>Cyp2c29</i> e <i>Gstp1</i> em camundongos <i>BALB/c</i> submetidos à quimioterapia pela ciclofosfamida, no tratamento do Sarcoma 180	138
Tabela VII. Distribuição das frequências alélicas de <i>Cyp2c29</i> e <i>Gstp1</i> em camundongos <i>BALB/c</i> submetidos à quimioterapia pela ciclofosfamida, no tratamento do Sarcoma 180	138

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

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

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	Taq	Enzima <i>Taq Polimerase</i> obtida a partir da bactéria <i>Thermophilus aquaticus</i> .
PGH	Projeto de Genoma Humano	TBE	Tris Borato EDTA
pH	Potencial de Hidrogênio Ionizável	TNM	Sistema de classificação por estadiamento (Tumor, Nódulos linfáticos e Metástases à distância)
q	Braço cromossômico longo	U	Unidade de atividade enzimática
q.s.p.	quantidade suficiente para	UCG	Universidade Católica de Goiás
RCBP	Registro de Câncer de Base Populacional	UFG	Universidade Federal de Goiás
RFLP	Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	UICC	União Internacional Contra o Câncer (<i>International Union Against Cancer</i>)
RNA	Ácido Ribonucléico	UTR	Região não traduzida (<i>untranslated region</i>)
rpm	Rotação por minuto	ng	Nanograma
S180	Sarcoma 180	µg	Micrograma
SNP	Polimorfismo de Único Nucleotídeo (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)	µL	Microlitro
SOE	Sem outras especificações	µmol	Micromol
sv	Selvagem	pmol	Picomol
T	Timina	χ^2	Teste do Qui-quadrado
T.M.	Tamanho Molecular		
TA	Temperatura Ambiente		

Resumo

A laringe é um órgão tubular do trato aerodigestivo cuja principal função é a produção da voz, além de funções relacionadas com a proteção das vias aéreas inferiores e deglutição alimentar. O carcinoma de células escamosas (CEC) de laringe apresenta-se como uma doença multifatorial e epigenética sendo influenciada por fatores ambientais, comportamentais e inerentes ao indivíduo. Vários genes polimórficos que codificam enzimas envolvidas na biotransformação de carcinógenos têm sido associados ao desenvolvimento de câncer, sobretudo no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Os genes *CYP1A1m1*, *GSTM1* e *GSTT1* são fundamentais no processo de detoxificação de Poli - Hidrocarbonetos Aromáticos (PHA) e de diversas moléculas endógenas, facilitando o seu metabolismo e excreção. Os objetivos do presente estudo foram de avaliar os dados epidemiológicos de pacientes diagnosticados com CEC da laringe do Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia (RCBP) da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), analisando os dados de 63 prontuários acompanhados num período de 6 anos; estabelecer os perfis alélicos dos genes *CYP1A1m1*, *GSTM1* e *GSTT1* em grupos caso-controle investigando os graus de suscetibilidade dos pacientes diagnosticados com CEC de laringe, segundo hábitos tabagistas e etilistas. Ao total foram avaliadas 112 amostras, sendo 63 provenientes de pacientes com CEC da laringe e 49 de pacientes do grupo controle. O CEC da laringe se mostrou cerca de 3,5 vezes mais freqüente em homens que em mulheres. A taxa de sobrevida relativa geral foi de aproximadamente 66% para 6 anos. Os hábitos tabagista e etilista concomitantes apresentam uma sobrevida consideravelmente menor. Foram encontradas freqüências alélicas para *CYP1A1m1* de 52,4% (34/62) e 63,3% (31/49) para o alelo selvagem T e 44,4% (28/62) e 34,7% (18/49) para o alelo mutante C. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas das variantes alélicas e genotípicas *CYP1A1m1* para o CEC da laringe. Quanto aos genes *GSTM1* e *GSTT1* foram observadas freqüências genotípicas positivas para os genes

GSTM1 e *GSTT1* de 41,3% (26/63) e 54,0% (34/63) para os pacientes com carcinomas laríngeos, e de 49,0% (24/49) e 51,0% (25/49) para o grupo controle, respectivamente. Para a avaliação do genótipo *GSTM1* (nulo) e *GSTT1* (nulo), os pacientes do grupo caso apresentaram 58,7% (37/63) e 46,0% (29/63) de genótipos nulos para *GSTM1* e *GSTT1*, enquanto que os pacientes do grupo controle apresentaram 51,0% (25/49) e 40,8% (20/49). Não foram encontradas associações estatisticamente significativas das variantes genotípicas *GSTM1* (nulo) e

GSTT1 (nulo) para o CEC da laringe. Neste contexto, foi realizado um estudo experimental no intuito de avaliar o papel dos genes *Cyp* e *Gst* no metabolismo da ciclofosfamida. Tal estudo abordou avaliações toxicológicas da Ciclofosfamida e a análise do polimorfismo dos genes *Cyp2a29* e *Gstp1* em camundongos *BALB/c* e correlacionando-os com a toxicidade da droga através da avaliação dos órgãos comumente afetados. A DL₅₀ da droga observada em 40 camundongos foi de 474mg/Kg. Posteriormente, outros 40 camundongos foram utilizados na avaliação do polimorfismo genético dos genes *Cyp2a29* e *Gstp1*. Quanto à toxicidade, a ciclofosfamida ocasionou redução da massa corporal nos rins, baço, fígado, coração e pulmões. A avaliação da toxicidade demonstrou alterações de diferentes graus de congestão observados no baço, fígado e coração. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as freqüências alélicas e genotípicas de

Cyp2a29 e *Gstp1* nos grupos dos animais estudados. Estudos que preconizam a utilização de testes toxicológicos combinados à avaliação anatomopatológica e investigação da variabilidade genética permitem a padronização de protocolos de tratamento de diversos quimioterápicos.

Palavras-chave: CEC da laringe, suscetibilidade, *CYP1A1m1*, *GSTM1*, *GSTT1* e farmacogenética.

Abstract

The larynx is a tubular organ of the aerodigestive tract whose main function is the production of voice, in addition to tasks related to the protection of the lower airways and swallowing food. The squamous cell carcinoma presents itself as a multifactorial disease and epigenetic being influenced by environmental factors, behavioural and relate to the individual. Several polymorphic genes that encode enzymes involved in the biotransformation of the carcinogens have been associated to the development of cancer, especially in squamous cell carcinoma of head and neck. The CYP1A1m, GSTM1 and GSTT1 genes which catalyzes the oxidation of PAHs in phenolic and epoxides products. The purpose of this study was to evaluate the epidemiological data of patients diagnosed with squamous cell carcinoma of the larynx from the Cancer Registry of Population basis of Goiânia and from Association of Cancer Combat in Goiânia, analyzing data from 63 medical records followed in a period of 6 year; establish the allelic profiles of the gene CYP1A1m, GSTM1 and GSTT1 in case-control groups investigating the degrees of suscetibility of patients diagnosed with squamous cell carcinoma (SCC) of the larynx, according to smoking and alcoholism habits. In total 112 samples were evaluated, 63 from patients with SCC of the larynx and 49 patients in the control group. The CEC of the larynx was about 3,5 times more frequent in men than in women. The rate of survival on general was approximately 66% to 6 years. The smoking and ethilic habits associated have a significantly lower survival. No significant differences were found in the staging analysis and treatment of patients. Were found allelic frequencies of CYP1A1m1 of 52,4% (34/62) and 63,3% (31/49) for the wild allele T and 44,4% (28/62) and 34,7% (18/49) for the mutant allele C. There were no statistically significant associations between allelic variants and genotypic CYP1A1m1 with squamous cell carcinoma of the larynx. Positive genotypic frequencies were observed for the genes GSTM1 and GSTT1 of 41.3% (26/63) and 54.0% (34/63) to the patients with laryngeal cancer, and 49,0% (24/49) and 51,0% (25/49) for the control group, respectively. For the assessment of genotype GSTM1 (null) and GSTT1 (null), the patients if the case group had 58,7% (37/63) and 46,0% (29/63) of genotypes for GSTM1 null and GSTT1, while the patients in the control group showed 51,0% (25/49) and 40,8% (20/49). There was no statistically significance in associations of genotypic variants GSTM1 (null) and GSTT1 (null) with the larynx squamous cell carcinoma. In this context, an experimental study was accomplished in the intention of evaluating the function of the genes Cyp and Gst in the metabolism of the Cyclophosphamide. This study addressed the Cyclophosphamide toxicological evaluation and analysis of the polymorphism of Cyp2a29 and Gstp1 BALB/c genes in mice, correlating them with the toxicity of drugs through the assessment of organs commonly affected. It was determinated the DL₅₀ of the 474mg/kg. Subsequently, another 40 mice were used on the assessment of the genetic polymorphism of genes Cyp2a29 and Gstp1. As for toxicity, cyclophosphamide caused reduction in body weight at different doses and kidneys, spleen, liver, heart and lungs. The animals that received a dose of 500mg/Kg died in 24 hours, three animals with a dose of 250mg/Kg died the end of one week. The evaluation of toxicity showed changes of varying degrees of congestion observed in the spleen, liver and heart. There were not found statistically significant differences between the frequencies of allelic and genotypic to Cyp2a29 and Gstp1 in groups of animals studied. This observation should be probably the characteristic line BALB/c are isogenic. Studies that make the use se of tests of genetic suscetibility, epidemic evaluation, combined to the evaluation anatomopathological they allow the study of the interaction genetic-atmosphere and a possible standardization of various chemotherapy protocols for treatment.

Keywords: CEC of larinx, suscetibility, CYP1A1m1, GSTM1, GSTT1 and Pharmacogenetics.

CAPÍTULO I. ASPECTOS GERAIS DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LARINGE.

Resumo

A laringe é um órgão tubular do trato aerodigestivo cuja principal função é a produção da voz, além de funções relacionadas com a proteção das vias aéreas inferiores e deglutição alimentar. Qualquer patologia que acometa este órgão pode ocasionar diversos fisiológicos, influenciando diretamente na qualidade de vida do indivíduo. Das diversas patologias que afetam a laringe, o câncer apresenta-se como uma das mais graves. O carcinoma de células escamosas apresenta-se como uma doença multifatorial e epigenética sendo influenciada por fatores ambientais, comportamentais e inerentes ao indivíduo. O objetivo deste estudo foi avaliar os dados epidemiológicos de pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular da laringe do Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia (RCBP) da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), analisando os dados de 63 prontuários acompanhados num período de 6 anos. O CEC da laringe se mostrou cerca de 3.5 vezes mais freqüente em homens que em mulheres durante o período estudado. A taxa de sobrevida relativa geral foi de aproximadamente 66% para 6 anos. Os hábitos tabagista e etilista concomitantes apresentam uma sobrevida consideravelmente menor, quando comparados aos pacientes que não apresentam tais hábitos. Não foram observadas diferenças significativas na análise do estadiamento e tratamento dos pacientes.

Palavras-chave: câncer, epidemiologia, CEC da laringe e sobrevida.

Abstract

The larynx is a tubular organ of the aerodigestive tract whose main function is the production of voice, in addition to tasks related to the protection of the lower airways and swallowing food. Any pathology that occur on this organ can cause various physiological, directly affecting the life quality of the individual. From the variety of the diseases that affect the larynx, the cancer presents itself as one of the most serious. The squamous cell carcinoma presents itself as a multifactorial disease and epigenetic being influenced by environmental factors, behavioural and relate to the individual. The purpose of this study was to evaluate the epidemiological data of patients diagnosed with squamous cell carcinoma of the larynx from the Cancer Registry of Population basis of Goiânia and from Association of Cancer Combat in Goiânia, analyzing data from 63 medical records followed in a period of 6 years. The CEC of the larynx was about 3.5 times more frequent in men than in women during the study period. The rate of survival on general was approximately 66% to 6 years. The smoking and ethilic habits associated have a significantly lower survival when compared to patients who do not have such habits. No significant differences were found in the staging analysis and treatment of patients.

Key words: cancer, epidemiology, CEC of larynx and survival.

1. Aspectos Gerais da Embriologia, Anatomia e Histologia da Laringe.

A laringe é um órgão da fonação e está localizada na via aérea inferior, na parte antero-inferior à faringe e região superior da traquéia (Tortora, 2002; Dângelo & Fatini 2001). Anatomicamente, a laringe contém três regiões: supraglótica, glótica e subglótica. Embriologicamente, a região supraglótica tem origem nos 3º e 4º arcos faríngeos que correspondem ao segmento buco-facial do embrião. As regiões glótica e subglótica, por outro lado, se originam no 5º e 8º arcos faríngeos, correspondentes ao segmento pulmonar do embrião) [Haast, 1975]. Um desenho esquemático da anatomia da laringe pode ser observado na Figura 1.

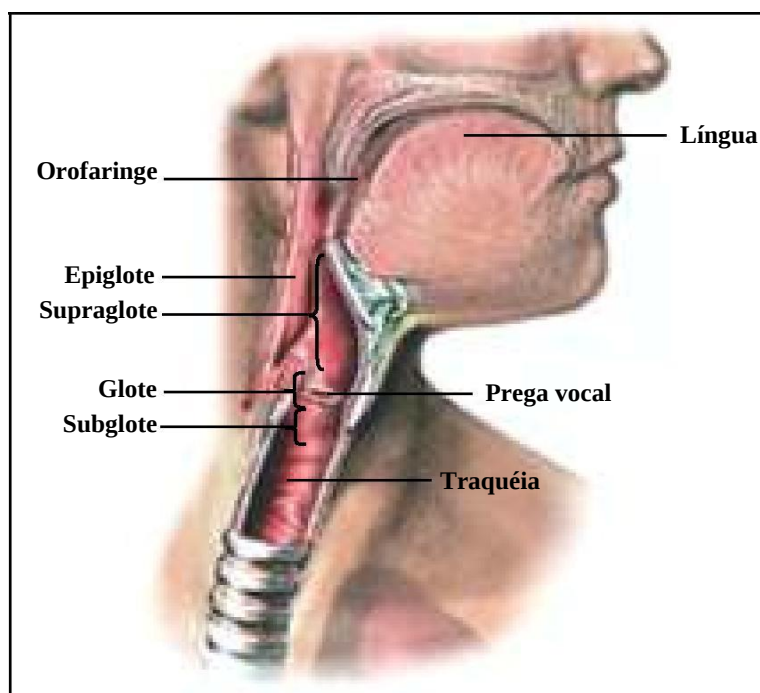


Figura 1. Esquema anatômico da localização da laringe (prega vocal), situado no plano mediano e anterior do pescoço, interligando a faringe à traquéia (Modificado de Dângelo & Fatini, 2001).

Além das distinções anatômica e embriológica, a laringe pode ser dividida quanto às irrigações sanguínea e linfática. A região supraglótica é irrigada pela artéria laringéia superior, ramo da carótida, e as regiões glótica e subglótica são irrigadas pela artéria tireoidiana inferior, ramo da subclávia. Os linfonodos, abundantes na região supraglótica, drenam pela membrana tiro-hióidea para os linfonodos médios e superiores da cadeia jugular.

Os linfonodos da prega vocal, bem mais escassos, drenam pela membrana crico-tiróidea para os linfonodos médios e profundos da cadeia jugular. A região glótica anterior possui rede linfática que drena pela parte superior da membrana crico-tireóidea, para o linfonodo pré-laríngeo ou de Delphian (Tucker, 1976).

O linfonodo pré-laríngeo se localiza na parte anterior da membrana crico-tiróidea, acima do istmo da glândula tireóide, recebendo linfonodos da parte anterior das pregas vocais e das partes superior e anterior da glândula tireóide. A disseminação de células neoplásicas via linfonodo pré-laríngeo é conhecida como metástase linfonodal contra-lateral (Tortora, 2002).

A região supraglótica compreende a parte superior do órgão e é composta pela epilaringe. Na região pode ser observadas a epiglote suprahióica, prega ariteno-epiglótica e aritenóide, epiglote infra-hióidea, falsas cordas vocais, ventrículos de Morgangi entre outras estruturas. A região glótica inclui a porção intermediária onde se localiza o ventrículo, fazem parte desta região as cordas vocais verdadeiras e as comissuras anterior e posterior. O plano horizontal que passa pelo soalho do ventrículo, constitui o limite superior da região glótica, enquanto que o plano horizontal, que passa 1 cm abaixo de seu limite superior, corresponde ao limite inferior da região (INCA/MS; Dângelo & Fatini 2001; Curado 2000).

A região subglótica é a porção mais distal da laringe, começa imediatamente abaixo da borda livre da corda vocal verdadeira e se estende até a borda superior do primeiro anel traqueal. Situa-se na linha mediana do pescoço, à frente da quarta até a sexta vértebras cervicais, sendo compostas por nove estruturas de cartilagem (Tortora, 2002).

A parede da laringe é formada pela cartilagem hialina cricóide e tireóide e pela cartilagem fribroelástica no centro da epiglote que se estende para o lúmen. Os músculos extrínsecos fixam a laringe ao osso hióide para elevar a laringe durante a deglutição. Os músculos intrínsecos unem as cartilagens tireóide e cricóide. Quando os músculos intrínsecos

se contraem, a tensão nas cordas vocais muda, modulando a fonação (Kierszenbaum, 2004). A Figura 2 contém a ilustração esquemática dos principais músculos e cartilagens que circundam a laringe

A mucosa da laringe é contínua com a da faringe e da traquéia. O órgão apresenta dois tipos de epitélios: o escamoso não-queratinizado, acima das pregas vocais, e o pseudoestratificado com células caliciformes, recobrendo o restante da laringe (Tortora, 2002). As glândulas seromucosas da laringe são encontradas por toda a lâmina própria, exceto a nível das cordas verdadeiras. (Kierszenbaum, 2004).

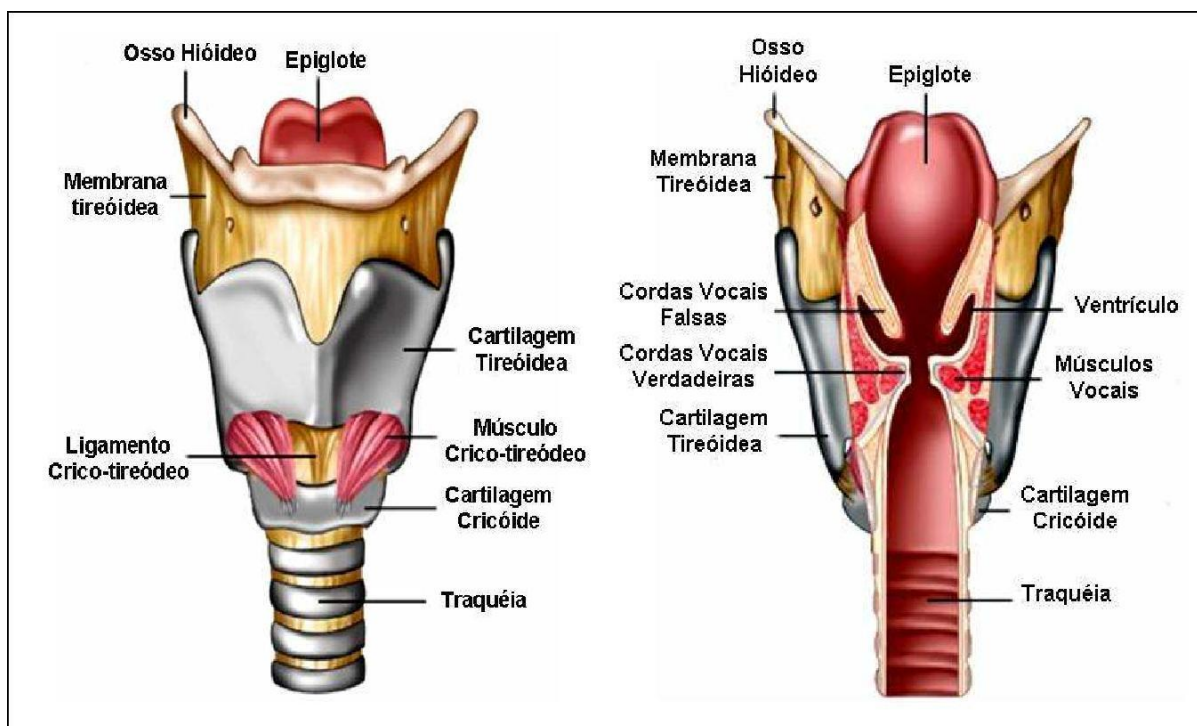


Figura 2. Desenho esquemático ilustrando a vista anterior e posterior da laringe, a epiglote, o osso hióide, a traquéia e as cartilagens tireóide e cricóide (Modificado de Dângelo & Fatini, 2001).

1.1. Fisiologia

A laringe desempenha funções primordiais para a manutenção da vida do indivíduo. Suas principais funções em ordem de importância são: proteção das vias aéreas, respiração e fonação. A laringe protege as vias aéreas durante a deglutição, coordena e otimiza as vias aéreas superiores durante a respiração e promove o controle da fonação por meio de

mecanismos intrínsecos em conjunto com a faringe e as cavidades oral e nasal (Sasaki & Weaver, 1997).

A função esfintéfrica da laringe é de proteger a via aérea inferior contra a penetração de corpos estranhos, alimentos e líquidos através da elevação da laringe, abaixamento da epiglote e o fechamento da glote. Caso o fechamento não aconteça, há mecanismos de tosse ou outros movimentos respiratórios para a retropulsão, que são acionados com o intuito de eliminar os corpos estranhos. O fechamento da entrada da laringe ocorre pelo deslocamento das cartilagens aritenóides de encontro com a epiglote. Este movimento é produzido pela contração dos músculos tiroaritenóideos, aritenóideos, ariepiglóticos e tiroepiglóticos. A contração dos músculos palatofaríngeos e estilofaríngeos promove a elevação e inclinação da laringe para frente. O fechamento das vias aéreas inferiores ocorre apenas durante o período que o alimento está passando pela faringe, quando ele chega ao esôfago a laringe se abre novamente (Casper & Colton, 1996).

Na função respiratória ocorre a abdução das pregas vocais permitindo a passagem do ar para os pulmões ou sua saída. Os músculos cricoaritenóideos posteriores são responsáveis pela abertura da glote durante a respiração, porque sua contração gira os processos vocais das cartilagens para fora. O fechamento da região glótica garante a produção da tosse para a eliminação das secreções tráqueo-pulmonares (Conti & Fernández, 1992).

Durante a fonação, a laringe é responsável pela geração de sons através dos movimentos de adução e abdução das pregas vocais e da vibração da mucosa que as recobre. A abertura da glote (abdução) ocorre pela contração dos músculos cricotireóideos posteriores, pela fixação da cartilagem tireóide, determinada pelos músculos extrínsecos e também pela ação moderadora dos músculos antagonistas, os adutores. A tensão e o alongamento das pregas vocais ocorrem pela contração dos músculos cricotireóideos, principal alvo de trabalho

dos fonoaudiólogos na terapia fonética em pacientes laringectomizados parcialmente (Lofiego, 1994).

2. Carcinoma Espinocelular da Laringe

O carcinoma espinocelular (CEC) da laringe resulta do desenvolvimento neoplásico maligno envolvendo as células do epitélio escamoso estratificado, presente na porção superior do vestíbulo laríngeo, e no epitélio ciliar colunar pseudoestratificado, que recobre o restante da laringe (ACS, 2002; INCA/MS, 2001). A maioria dos carcinomas da laringe é do tipo de células escamosas, que quase sempre se iniciam na corda vocal, como carcinoma *in situ*. Comumente, o câncer de laringe é uma lesão isolada, mas em alguns casos pode apresentar potencial multifocal de invasão. Por outro lado, o carcinoma verrucoso da laringe apresenta-se bem diferenciado, geralmente com agressividade local e crescimento lento e, geralmente, não é metastatizante (Kashima & Mounts, 1987).

Tumores podem acometer outros tecidos além do tecido epitelial, como por exemplo o tecido cartilaginoso intensamente presente na laringe. Os condrossarcomas e os condromas são as denominações dos tumores malignos e benignos de cartilagem, respectivamente. Na laringe eles são mais raros, sendo a cartilagem cricóide mais acometida (Thomé *et al.*, 2001).

2.1. Epidemiologia

O câncer de laringe é um dos mais comuns a atingir a região de cabeça e pescoço, representando cerca de 25% dos tumores malignos que acometem esta área e 5% de todas as doenças malignas. Aproximadamente 2/3 desses tumores surgem na corda vocal verdadeira e 1/3 acomete a laringe supraglótica (INCA 2006; Meleca *et al.*, 2003).

Aproximadamente 6.600 novos casos de câncer da laringe são registrados por ano no Brasil, representando algo em torno de 5% de todos os novos casos de câncer, com exceção

do câncer de pele. Cerca de 3.500 mortes decorrentes dessa doença são registradas anualmente. O câncer da laringe está intimamente relacionado ao tabagismo e ao consumo de álcool, afetando, em sua maioria, indivíduos do sexo masculino, na quinta e sexta décadas de vida (Wünsch Filho, 2004; Shiboski *et al* 2000). Silva (2003) observou que o câncer de laringe é 4,7 vezes mais freqüente em homens quando comparados com mulheres, na Cidade de Goiânia, no período de 1988 a 1998. O uso crônico de tabaco e álcool parece ser a causa subjacente de 63% dos casos.

2.2. Fatores de risco

O hábito de fumar é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer da laringe. Vários estudos e análises epidemiológicas demonstram que o tabagismo está diretamente relacionado à carcinogênese laríngea, expondo este órgão às diversas substâncias químicas e físicas contidas na fumaça do cigarro, derivadas da queima do tabaco (Kim *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2002; Achutti & Menezes, 2001). A fumaça do cigarro, quando processada, possui em média 4000 produtos químicos, nos quais se incluem mais de 60 agentes carcinogênicos, entre eles encontram-se os produtos das classes de nitrosaminas, aminas aromáticas e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), como o benzopireno (Canevari & Rogatto, 2004).

A ingestão crônica de álcool é um outro fator de grande relevância para a carcinogênese laríngea. O uso abusivo do álcool está amplamente relacionado à supressão imunológica e a desnutrição, aumentando consideravelmente, a suscetibilidade aos carcinógenos ambientais como o tabaco. O tabagismo e o etilismo, quando combinados, possuem uma forte relação sinérgica de dose-resposta aumentando o risco relativo de câncer laríngeo, especialmente no desenvolvimento de tumores supraglóticos (Talamini *et al.*, 2002; Noronha & Dias, 1997).

A exposição ao vapor de ácidos inorgânicos fortes é o único carcinógeno ocupacional conhecido para o câncer de laringe (IARC, 1992). A evidência associando a exposição a asbestos e cânceres de laringe são controversos (Marczynski *et al.*, 2000; Austin & Reynolds, 1996). Inúmeros agentes adicionais, incluindo níquel, cromo, HPAs e pó de madeira têm sido implicados na iniciação e promoção de câncer da laringe (Calvert *et al.*, 1998; Maier *et al.*, 1997).

A infecção por HPV tem sido amplamente associada ao desenvolvimento de tumores cervicais, como colo uterino, e ao desenvolvimento de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (Nair & Pillai, 2005; Ferreras *et al.*, 2001; Niv *et al.*, 2000). Os oncogenes virais E6 e E7 encontrados integrados ao genoma de células cervicais cancerosas, resultam na estabilidade da expressão das oncoproteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco conhecidas pelo seu envolvimento na iniciação e manutenção de várias neoplasias cervicais. Basicamente, a ligação de E6 a p53 estimula a degradação de p53 celular, enquanto que a proteína E7 altera o controle do crescimento celular ligando-se a proteína RB, inibindo a sua função (Cerovac *et al.*, 1996; Karlsen *et al.*, 1996). A perda da função de supressão tumoral dos produtos dos genes *P53* e *RB* podem contribuir significativamente para a carcinogênese (Noda *et al.*, 1998).

A agregação familiar dos cânceres da laringe tem sido descrita por vários autores (Ankathil *et al.*, 1996; Foulkes *et al.*, 1995; Goldestein *et al.*, 1994), que sugerem um polimorfismo genético das enzimas metabolizadoras de agentes carcinógenos. Adicionalmente, a expressão local dessas enzimas pode ser também relevante, particularmente para os tumores de cabeça e pescoço, onde a dieta, o fumo, o álcool, a infecção por HPV ou a inflamação são capazes de induzir a atividade de enzimática específica no órgão alvo (Dalton *et al.*, 2000; Uno *et al.*, 2001). As enzimas que metabolizam agentes carcinogênicos encontrados no fumo, no álcool e nos produtos alimentícios estão comumente relacionadas ao processo de carcinogênese da laringe (Santiago, 2002).

A exposição a outros fatores ambientais e ocupacionais também pode estar envolvida na ocorrência desses tumores. A exposição prolongada ao alcatrão, aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e ao percloroetileno está relacionada a um maior risco para o desenvolvimento de câncer da laringe. O asbesto é reconhecidamente um agente cancerígeno e sua inalação tem sido apontada como prejudicial à saúde, com aumento do risco de desenvolvimento de câncer da laringe. A exposição à radiação e agentes poluentes ocupacionais, como níquel, cromo, gás mostarda, produtos de madeira e pesticidas também têm sido apontados como fator etiológico. O refluxo gastroesofágico também é considerado um fator de risco no desenvolvimento do câncer da laringe (Ward & Hanson, 1988).

2.3. Classificação e estadiamento

A Classificação Internacional de Doença (CID) vem sendo usada mundialmente, há vários anos, pelos países membros da Organização Mundial de Saúde, inclusive o Brasil. O aumento de estudos epidemiológicos e sua aplicação na pesquisa oncológica tem sido atribuído ao arquivamento organizado de prontuários e o uso do CID na orientação e organização dos dados de pacientes acometidos pelo câncer (Percy *et al.*, 1996).

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

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

[Tabela II]. Atualmente, o estadiamento TNM é a base para a orientação terapêutica e prognóstico do câncer de cabeça e pescoço (Noronha & Dias, 1997).

Tabela I. Classificação Internacional das Doenças para Oncologia (CID-O). Topografia: Laringe – C32 (INCA, 2006).

Topografia	Regiões	CID-O
Glote	(i) Cordas vocais (verdadeiras) (ii) Comissura anterior (iii) Comissura posterior	C32.0
Supraglote	(i) Epiglote supra-hióidea [incluindo extremidade, superfícies lingual (anterior) (C10.1) e laríngea] (ii) Prega ariepiglótica, face laríngea (iii) Aritenóide (iv) Epiglote infra-hióidea (v) Bandas ventriculares (falsas cordas)	C32.1
Subglote		C32.2
Laringe, SOE*		C32.9

*SOE: sem outras especificações.

Tumores supraglóticos

As lesões supraglóticas são mais freqüentes nas pacientes do sexo feminino. Os tumores da região supraglótica dificilmente se propagam para a região glótica, apesar de não ter sido demonstrada nenhuma barreira anatômica que justifique esse comportamento. Possivelmente, a origem embriológica diferenciada dessa região, e a separação das irrigações sangüínea e linfática sejam as razões pelas quais esses tumores raramente atravessam o ventrículo de Morgangi (Alonso, 1947).

Aprigliano & Mello (2006) realizaram um estudo em 75 pacientes diagnosticados com carcinoma laríngeo da região supraglótica. Desses, 33 pacientes apresentaram T1aN0M0, (26 homens e 7 mulheres), 28 pacientes apresentavam lesões T1bN0M0, (20 homens e 8 mulheres). Em 7 pacientes a lesão era mais extensa, T4N0M0 (6 homens e 1 mulher). Sete pacientes apresentaram metástases em linfonodos cervicais: T1aN1M0, T1bN1M0, T4N1M0 (cinco homens e 2 mulheres).

Tabela II. Classificação do tumor primário (T) e nódulos linfáticos regionais (N) para o câncer supraglótico, glótico e subglótico, segundo o INCA (2004).

Classificação	Descrição
	Supraglote
T1	Uma sub-localização anatômica, mobilidade normal.
T2	Mucosa de mais de uma sub-localização adjacente da supraglote ou da glote, ou de região adjacente fora da supraglote; sem fixação.
T3	Fixação da corda, ou invasão da área pós-cricóide, tecidos pré-epiglóticos, espaço paraglótico, erosão da cartilagem tireóide.
T4a	Toda a cartilagem tireóide; traquéia, partes moles do pescoço: músculos profundos/extrínsecos da língua, alça muscular tireóide e esôfago.
T4b	Espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais, artéria carótida.
	Glote
T1	Limitado à (s) corda (s) vocal (is), mobilidade normal. (a) uma corda. (b) ambas as cordas.
T2	Supraglote, subglote, mobilidade de corda vocal diminuída.
T3	Fixação da corda, espaço paraglótico, erosão de cartilagem tireóide.
T4a	Toda a cartilagem tireóide; traquéia; partes moles do pescoço: músculos profundos/extrínsecos da língua, alça muscular; tireóide e esôfago.
T4b	Espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais, artéria carótida.
	Subglote
T1	Limitado à subglote.
T2	Extensão à (s) corda (s) vocal (is) com mobilidade normal ou diminuída.
T3	Fixação da corda vocal.
T4a	Toda a cartilagem tireóide ou cricóide; traquéia, músculos profundo-extrínsecos da língua, alça muscular, tireóide e esôfago.
T4b	Espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais, artéria carótida.
	Todas as localidades
N1	Homolateral, único ≤ 3 cm.
N2	(a) Homolateral, único > 3 cm até 6 cm. (b) Homolateral, múltiplo ≤ 6 cm. (c) Bilateral, contralateral, ≤ 6 cm.
N3	> 6 cm.

Os autores observaram uma taxa de sobrevida foi de 58,8% para a população estudada. Onze pacientes tiveram recidivas locais, 4 foram laringectomizados e dois permanecem vivos. Para os tumores supraglóticos o TNM foi decisivo quanto à orientação da terapêutica e a conduta cirúrgica. Os pacientes com estadiamento de menor grau apresentaram boa resposta ao tratamento.

Tumores glóticos

Os tumores da região glótica, segundo Auerbach *et al.* (1970) são os mais freqüentes entre as lesões malignas da laringe, tendo origem no epitélio escamoso da mucosa da prega vocal. Sua evolução é lenta, as metástases são tardias e seu principal sintoma é a disfonia, que surge precocemente. Geralmente são precedidos por lesões histológicas do epitélio, denominadas pré-malignas, como a hiperplasia epitelial, que pode mostrar queratose em sua camada superficial, como também nas camadas mais profundas (disqueratose). Essas alterações são quase sempre respostas a inalantes externos, dentre os quais o fumo é o principal fator de risco.

Num estágio mais avançado aparecem as displasias, que podem ser leves, moderadas ou intensas. As displasias se caracterizam por alterações não só na disposição das células, mas também por modificações nucleares (atipias), com núcleos hipercorados, aumentados em relação ao citoplasma, e o aparecimento de mitoses. O passo seguinte é o carcinoma intraepitelial, onde há uma desorganização em toda a camada epitelial, com grande número de mitoses, já caracterizando uma lesão maligna (Aprigliano & Mello, 2006).

Auerbach *et al.* (1970) avaliaram, em autópsia, indivíduos que tinham falecido de várias causas, incluindo três grupos: fumantes, não fumantes, e os que haviam deixado de fumar há mais de cinco anos. O exame da laringe no grupo dos fumantes mostrou atipias celulares em 99% dos casos, sendo que, em 16%, diagnosticou-se o carcinoma *in situ*. No grupo dos não fumantes e dos que haviam deixado de fumar há mais de 5 anos não foi encontrado nenhum caso de carcinoma intraepitelial, e somente em 25% dos casos havia atipias celulares. Dessa forma, a suspensão do fumo foi um fator importante na regeneração do tecido epitelial da laringe.

2.4. Diagnóstico e Aspectos clínicos

As informações obtidas durante a anamnese de um paciente com carcinoma laringe, somada à avaliação clínica vão direcionar o otorrinolaringologista e/ou oncologista de cabeça e pescoço a uma conduta terapêutica mais consciente, privilegiando a saúde do paciente. A prática clínica mais as percepções visuais e auditivas são essenciais para a validação de um diagnóstico diferencial entre a variabilidade de uma laringe normal ou de uma relativamente alterada (Gadelha *et al.*, 1998).

O otorrinolaringologista geralmente, dispõe de três recursos para examinar a laringe de um paciente. O exame físico externo: inspeção e palpação; a laringoscopia: indireta, direta e microlaringoscopia e os exames de imagens: radiografias simples, planigrafias, laringografia, xerorradiografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética (Albernaz *et al.*, 1997).

Inicialmente, o médico faz a inspeção no paciente durante a anamnese, observando a qualidade vocal, os movimentos verticais da laringe, a presença de abaulamentos e o tipo de respiração do paciente. Posteriormente, é realizada a palpação externa da laringe e de suas regiões vizinhas possibilitando, se possível, a detecção de tumor, pericondrite, hematoma ou abscesso laríngeo. A mobilização lateral da laringe provoca crepitação, devido ao contato dos grandes cornos tireóideos com o corpo vertebral. Esta sensação de crepitação desaparece, nos casos de infiltração cancerosa e edemas inflamatórios nas cartilagens tireóideas (Albernaz *et al.*, 1997).

A laringoscopia indireta é o método mais simples e mais usado. A laringe é vista em posição estática e em funcionamento através de um espelho plano, fixo a uma haste metálica. O paciente deve estar sentado em frente ao médico, e a luz focalizada na orofaringe. Pede-se ao mesmo para colocar a língua para fora, e esta deve ser apreendida com uma gaze e

tracionada gentilmente pelo examinador. Todas as estruturas internas da laringe devem ser observadas atentamente (Bastian *et al.*, 1985).

A laringoscopia direta sob anestesia tópica não é recomendada por Albernaz *et al.* (1997), pois trata-se de um procedimento agressivo ao paciente e sem resultados confiáveis. Para Kuhl (1991), este exame tem as suas indicações pela rapidez com que é praticada e pela simplicidade da realização até sob anestesia local. A videoestrobolaringoscopia é um método que utiliza uma luz estroboscópica para observar os movimentos vibratórios das pregas vocais.

A rouquidão e a disfagia são os principais sinais clínicos para o diagnóstico de carcinoma laríngeo. Quando persistente por mais de duas semanas, são fortes sinais clínicos a serem observados pelo paciente, pois ao ser diagnosticado precocemente, o paciente apresenta um prognóstico favorável em sobrevida relativa de 5 anos variando de 67% a 90% (Pontes, 2002).

Os sintomas do câncer da laringe variam de acordo com o tamanho e a localização do tumor. Tumores localizados na altura das pregas vocais são denominados glóticos e se manifestam freqüentemente por meio da rouquidão. As neoplasias localizadas acima da glote são chamadas supraglóticas, apresentando comportamento mais agressivo, manifestando-se por meio de odinofagia e disfagia, nódulo cervical ou otalgia nos casos mais avançados. Os tumores localizados abaixo das cordas vocais, definidos como subglóticos, são neoplasias mais raras e cursam com dispnéia e estridor. Consideram-se transglóticos os tumores que cruzam verticalmente o ventrículo, envolvendo glote e supraglote (Kowalski *et al.*, 2000).

O diagnóstico de tumores laríngeos é feito por meio de uma história clínica criteriosa, abordando-se principalmente o tempo de início dos sintomas e a presença de nódulo cervical (Kowalski *et al.*, 2000). O exame geral da cabeça e pescoço tem como objetivo avaliar a extensão loco-regional do tumor além de procurar identificar a presença de

outros tumores primários na região e de metástases para linfonodos regionais. O exame loco-regional compreende a laringoscopia indireta, a rinoscopia anterior e posterior, a oroscopia e a palpação do pescoço. Para confirmação diagnóstica, a laringoscopia direta com biópsia deve ser realizada em casos onde o exame indireto não permitiu uma visualização satisfatória (Dias *et al.*, 2001; Kowalski *et al.*, 2000). Para a detecção da extensão do crescimento tumoral, utiliza-se alguns testes diagnósticos, incluindo estudos radiológicos dos tecidos moles, tomografias, estudos de contrastes e imagem por ressonância magnética (Silva, 2003).

2.5. Tratamento

Uma vez constatada a presença do carcinoma laríngeo, o foco principal passa a ser a elaboração de uma terapia adequada. O tratamento oncológico baseia-se em três modalidades terapêuticas: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Cirurgia e radioterapia são formas de tratamento para a enfermidade localizada ou regionalizada. A quimioterapia é empregada para a enfermidade sistêmica, tanto no paciente com doença metastática presente quanto no paciente de risco para o desenvolvimento. Em dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 2/3 dos pacientes com câncer utilizam a radioterapia em alguma fase do tratamento da doença que de maneira isolada, quer associada a outras formas de terapia oncológica (Santos, 2004).

A cirurgia, indicada para os casos mais avançados, pode ser dividida em duas categorias: a laringectomia parcial, que remove parte da laringe e a laringectomia total, que consiste na remoção total da laringe. A cirurgia é considerada um tratamento agressivo, podendo o paciente, inclusive, perder a voz completamente. Segundo dados do INCA, cerca de apenas 30% dos pacientes laringectomizados são capazes de desenvolver uma voz esofágica inteligível e 50% deles se retiram do convívio social, chegando a perder o emprego (INCA/MS, 2001).

3. Objetivos

3.1. Geral

Avaliar os pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular da laringe do Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia (RCBP) da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), correlacionando as variáveis: idade, sexo, fatores de risco, estadiamento, tratamento e óbitos.

3.2. Específicos

Analisar os pacientes com CEC da laringe quanto as variáveis epidemiológicas relacionadas à idade, sexo, fatores de risco entre outras;

Calcular as taxas de incidência e sobrevida relacionadas ao hábito tabagista, etilista e tipo de tratamento;

Correlacionar os resultados obtidos com os fatores clínicos e anatômicos, sobrevida individual e dados do estadiamento do tumor do prognóstico tradicionalmente utilizado para o CEC da laringe.

4. Material e métodos

A presente análise epidemiológica corresponde a um estudo retrospectivo de pacientes diagnosticados com carcinoma da laringe do Registro de Câncer de Base Populacional da ACCG. Foram analisados 63 prontuários, referentes às variáveis: sexo, idade, etnia, profissão, data do diagnóstico, casos de neoplasia na família, hábitos tabagista e etilista, estágio da doença, CID-O, tratamento (radioterapia, quimioterapia e cirurgia) e número de óbitos.

Os dados obtidos foram armazenados em uma planilha do *software* Excel® (2005). A sobrevida relativa foi calculada de acordo com as variáveis clínico-epidemiológicas analisadas no presente estudo, para isso foi utilizado o teste de *logrank* foi utilizado para comparar as diferenças estatísticas entre as curvas de sobrevida relativa, realizado com o auxílio do *software* GraphPad - Prism® 4.0.

5. Resultados e Discussão

Foram analisados 63 prontuários, dos quais 77,8% (49/63) são pacientes do sexo masculino e 22,8% (14/63) do sexo feminino (Figura 3). O presente estudo sugere que em Goiânia, de acordo com os pacientes analisados, o CEC de laringe é 3,5 vezes mais freqüente em homens, menor do que encontrado por Silva (2003), na mesma cidade. Os dados sugerem que esta relação tende a diminuir devido, provavelmente ao aumento do número de mulheres que apresentam os hábitos tabagista e etilista, visto que estes são os fatores de risco mais fortemente associados aos tumores de laringe (Silva, 2003; Kim *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2002).

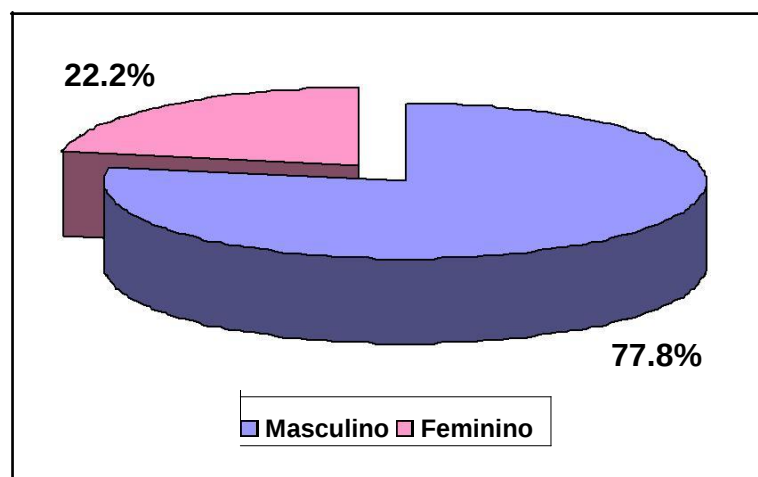


Figura 3. Frequência percentual dos casos de CEC de laringe por sexo, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.

A média de idade observada foi de 58,1 (DP ± 10.3). A Figura 4 apresenta as frequências percentuais dos pacientes com CEC da laringe, distribuídos por faixa etária. A faixa etária de 41 a 60 anos apresentou o maior número de pacientes. De acordo com os dados encontrados, 52,4% (33/63) pacientes encontram-se na 4ª e 5ª década de vida, sendo que 44,4% (33/63) possuem mais de 60 anos de idade. Silva (2003) em sua análise epidemiológica observou que 45.1% dos pacientes também se encontravam na faixa etária entre 41 e 60 anos.

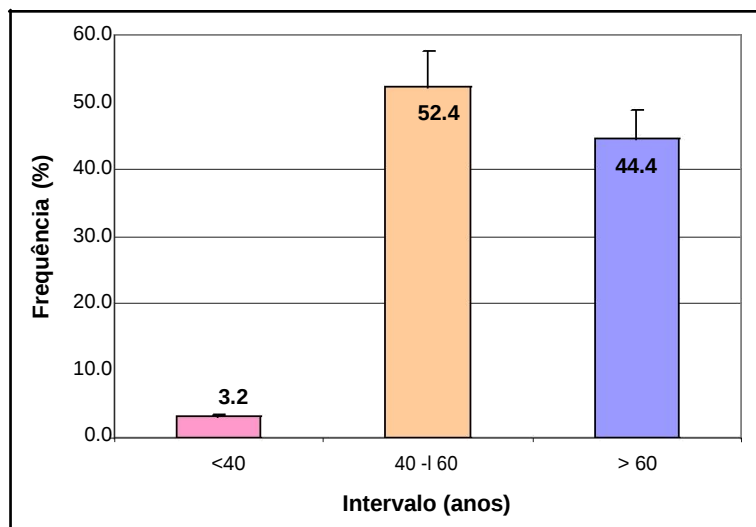


Figura 4. Frequência percentual dos casos de CEC de laringe por faixa etária, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a população brasileira pode ser dividida, para fins de estudos demográficos em branco, negro, pardo, amarelo e indígena (Fátima, 2004). A população estudada apresentou 62,3% (38/63) pacientes pertencentes ao grupo pardo, 31,1% (19/63) brancos e 6,6% (4/63) negros. A atividade ocupacional foi dividida em três grupos: atividade 1ª (agricultura), atividade 2ª (indústria) e atividade 3ª (prestação de serviços). Os dados demonstram que 65,0% (41/63) dos pacientes trabalham no setor 3º, 30,2% (19/63) no setor 1º, sendo 89,5% (17/19) destes lavradores e apenas 4,8% (3/63) dos pacientes relataram trabalhar na indústria. O elevado número de pacientes que atuam na prestação de serviços (setor 3º) pode estar relacionado aos hábitos tabagista e etilista e ainda, exposição rotineira à poluição urbana. Outro fator de risco deve-se ao hábito alimentar, pois consumo de carne vermelha e de alimentos gordurosos tem sido associado a um aumento no risco de câncer neste órgão (Tavani *et al.*, 2000).

Em relação aos hábitos tabagista e etilista, 93,7% (59/63) são fumantes e 58,7% (37/63) são etilistas, sendo todos estes também tabagistas. A Figura 5 apresenta os dados referentes ao tempo de exposição ao tabaco e ao álcool dos pacientes estudados. Predominantemente, o tempo superior a 20 anos de exposição a esses dois fatores foi o mais observado entre os pacientes.

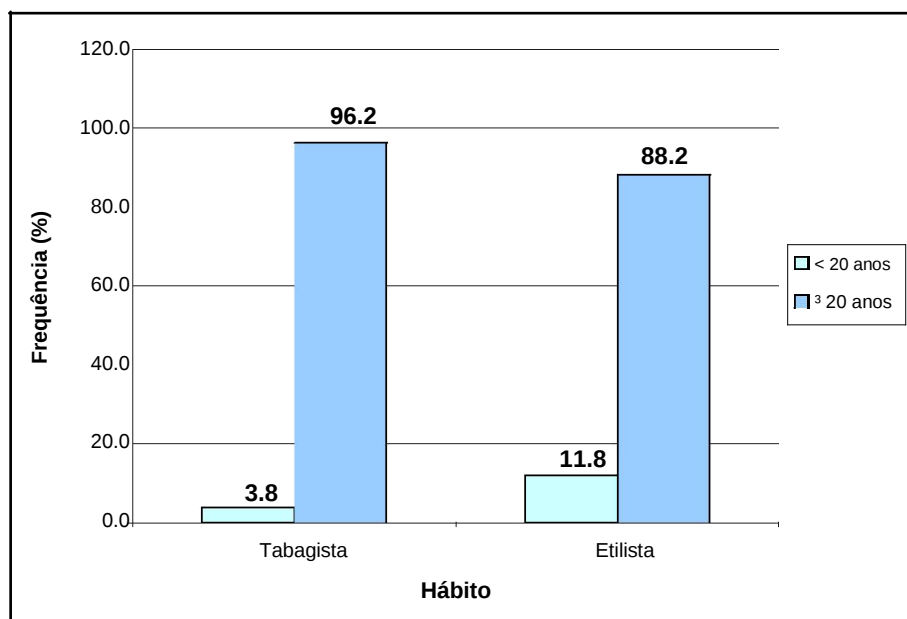


Figura 5. Frequência percentual dos casos de CEC de laringe segundo hábitos tabagista e etilista, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.

Apenas 28,6 (18/63) pacientes relataram ter algum caso de neoplasia na família. O tempo médio entre a data do diagnóstico e a data do tratamento foi de 7,6 meses, sendo que 51,1% (24/47) dos pacientes apresentaram este intervalo de tempo menor que 6 meses e 48,9% (23/63) demais tiveram a data do tratamento 6 meses após a data do diagnóstico. Tal dado é preocupante levando-se em consideração que alguns casos apresentaram estadiamento elevado e tempo de diagnóstico superior a 6 meses.

Em relação às frequências percentuais dos casos de laringe por topografia (CID-O), 42,8% (27/63) dos pacientes apresentaram a glote acometida, a supraglote estava envolvida

em 25,4% (16/63) dos casos e apenas 3,2% (2/63) dos pacientes tinham a subglote como região acometida (Tabela III). Silva (2003), em um trabalho realizado em pacientes diagnosticados com câncer de laringe, no período de 1988 a 1998, relatou a presença da glote como topografia mais acometida para o câncer de laringe com 31% dos casos, sendo que 49% dos seus pacientes apresentaram a classificação C32.9 (Laringe SOE). O presente estudo encontrou apenas 18 (28,6%) pacientes com esta classificação inferindo que o diagnóstico clínico e anatomopatológico tornaram-se mais precisos e específicos, quando comparado ao trabalho de Silva (2003), para o mesmo serviço de patologia.

Tabela III. Frequência percentual dos casos de câncer de laringe por topografia, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.

Topografia	n pacientes	f(%)
Glote - C32.0	27	42,9
Supraglote - C32.1	16	25,4
Subglote - C32.2	2	3,2
Laringe SOE* - C32.9	18	28,6
Total	63	100,0

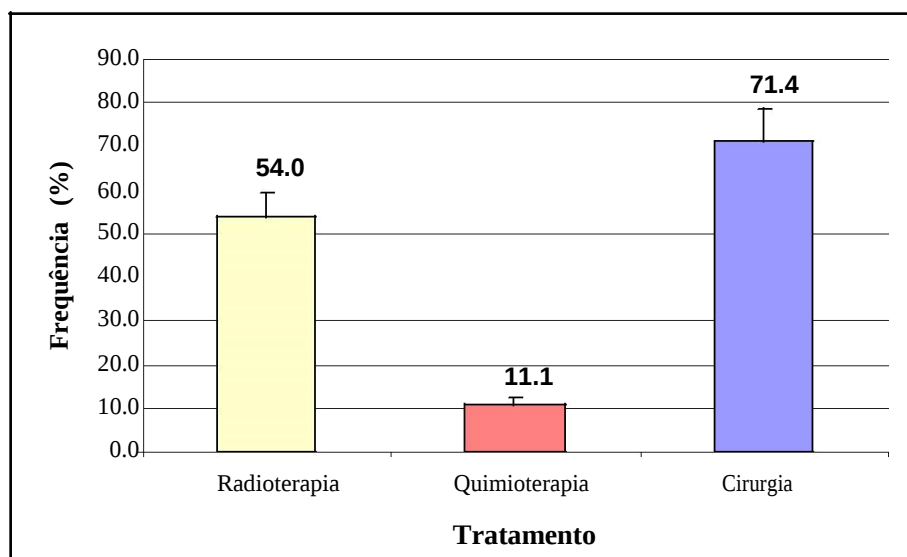
SOE*: sem outras especificações.

O sistema TNM também foi investigado no grupo de pacientes do presente estudo. A divisão dos casos de câncer em grupos, de acordo com os chamados estádios, surgiu a partir do momento em que as taxas de sobrevida eram maiores para os casos no qual a doença era localizada quando comparada com casos que sofreram metástase (MS, 2004). O estágio I e IV apresentou as maiores frequências percentuais, 32,3% (20/62) e 30,6% (19/62), respectivamente (Tabela IV). De 1988 a 1998, os estádios III e IV, com frequências de 25% e 18%, respectivamente, foram os mais acometidos entre os casos de câncer de laringe (Silva, 2003), tais dados sugerem que o diagnóstico para o câncer da laringe atualmente, são realizados em sua maioria, na fase inicial da doença, no Estádio I.

Tabela IV. Frequência percentual dos casos de CEC de laringe por estadiamento TNM.

Estadiamento TNM	<i>n</i> pacientes	<i>f</i> (%)
Estádio I	20	32,3
Estádio II	11	17,7
Estádio III	12	19,4
Estádio IV	19	30,6
Total	62	100,0

Quanto ao tratamento realizado nos pacientes com câncer da laringe, a laringectomia foi o principal tratamento realizado em 71,4% (45/63) dos casos, sendo 60% (27/45) a laringectomia total a cirurgia de escolha e 28,9% (13/45) a laringectomia parcial (Figura 6). Todos os pacientes que sofreram a laringectomia total também foram submetidos ao esvaziamento cervical.

**Figura 6.** Frequência percentual dos casos de câncer de laringe por tratamento, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.

A sobrevida relativa geral dos 63 pacientes pode ser observada na Figura 7 e foi estimada em aproximadamente 65,9% num período de 6 anos, com censura de 4,7%. A Figura 8 ilustra a sobrevida relativa por sexo. Embora a taxa de sobrevida de 78,9% para o sexo feminino apresenta-se moderadamente elevada em relação ao sexo masculino (61,4%), a diferença observada não foi estatisticamente significativa ($p=0,85$).

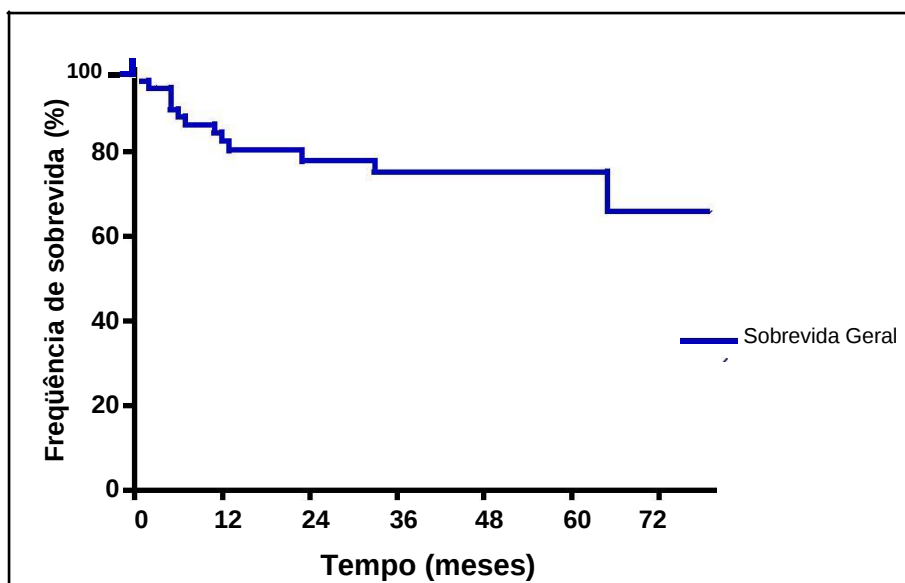


Figura 7. Sobrevida relativa geral para o CEC de laringe nos casos analisados, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.

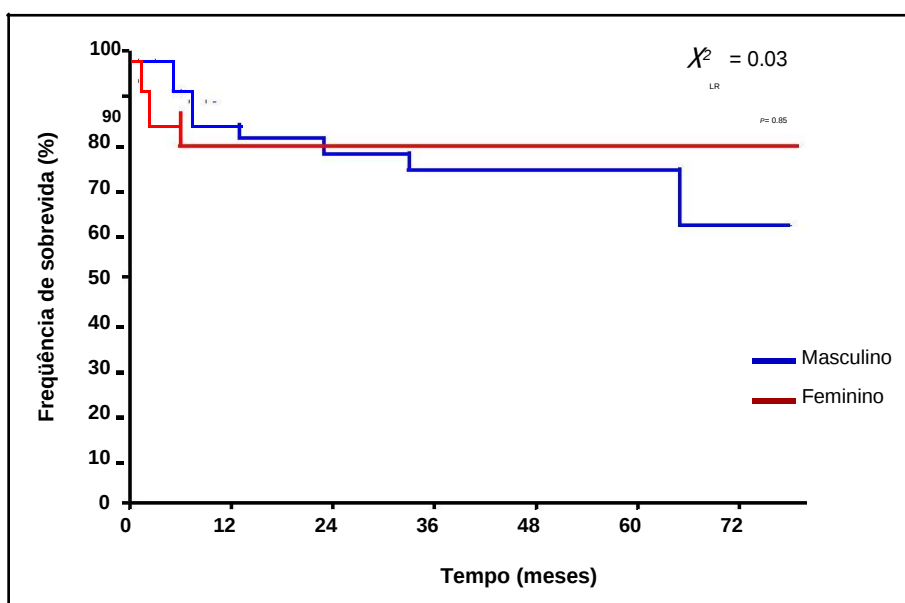


Figura 8. Sobrevida relativa por sexo para o CEC de laringe nos casos analisados, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.

A sobrevivida relativa estimada para os pacientes de etnia branca foi de 67,9%, sendo maior (81,9%) encontrada no grupo pardo. Ao final de 34 meses a taxa de sobrevivida relativa para os negros foi nula. Tal dado deve-se provavelmente, a baixa frequência de negros no grupo estudado (6,3%) [Figura 9].

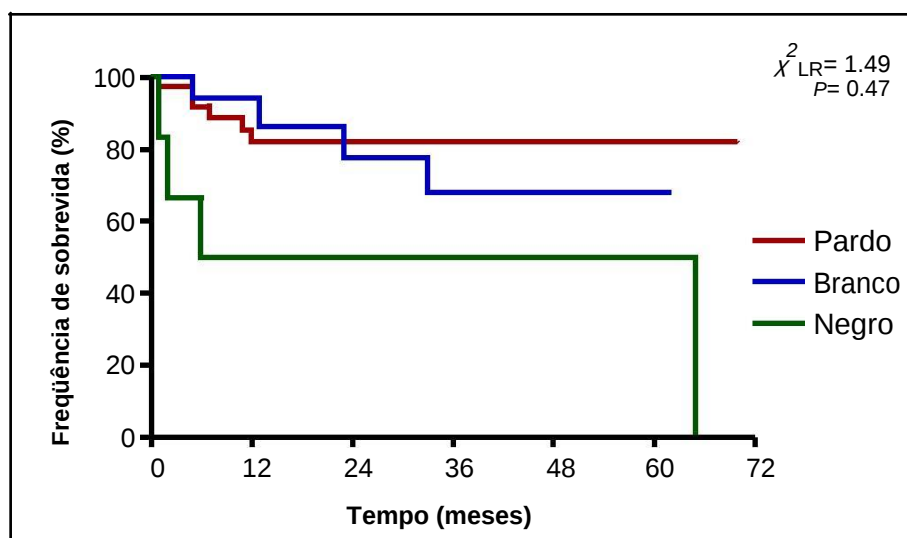


Figura 9. Sobrevida relativa por etnia para o CEC de laringe nos casos analisados, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.

A Figura 10 ilustra a sobrevida estimada por ocupação (setor 1º e setor 3º). A sobrevida relativa para o setor 1º apresentou-se maior (73,8%) do que os pacientes que atuam no setor 3º (62,5%). Os hábitos tabagista e etilista, assim como a alimentação são provavelmente, os principais fatores de risco relacionados ao câncer de laringe em trabalhadores do setor terciário, como motorista e auxiliar de serviços gerais. As diferenças observadas nas taxas de sobrevida não foram estatisticamente significativas ($p = 0,83$).

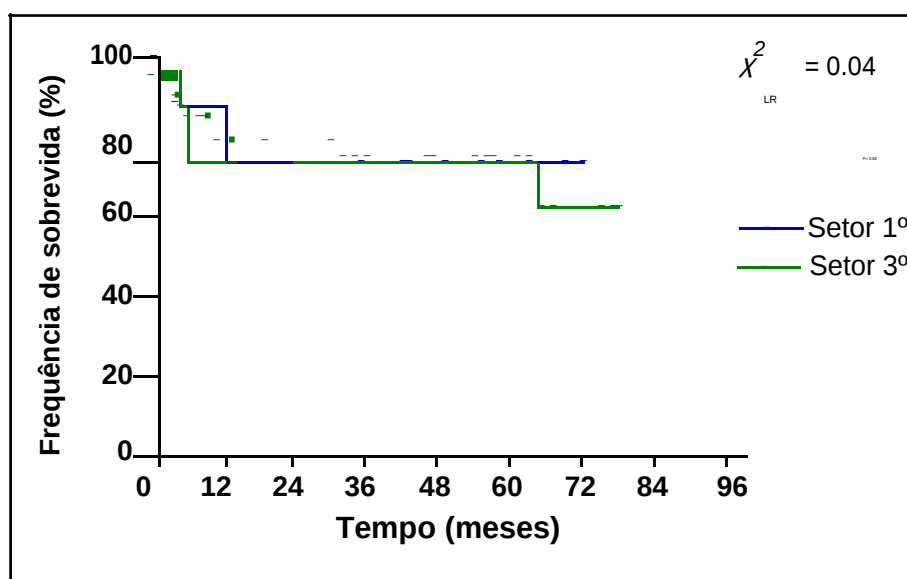


Figura 10. Sobrevida relativa por setor de ocupação (setor 1º e 3º) para o CEC de laringe, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.

A sobrevida relativa estimada para os pacientes que apresentavam os hábitos tabagista e etilista simultâneos (63,5%) foi moderadamente menor, comparado à sobrevida relativa dos pacientes que não apresentavam tais hábitos (71,3%). As diferenças observadas nas taxas de sobrevida foram estatisticamente significativas ($p= 0,02$) [Figura 11].

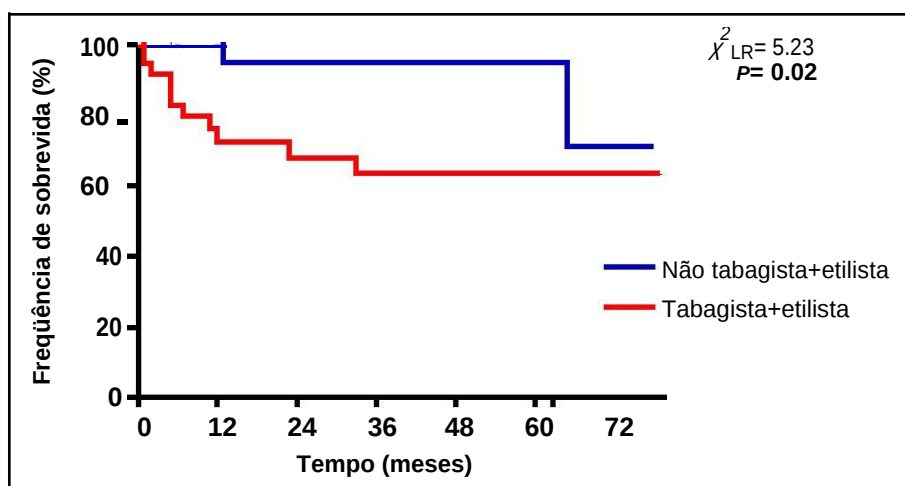


Figura 11. Sobrevida relativa por setor hábitos tabagista e etilista para o CEC de laringe, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.

A Figura 12 ilustra a sobrevida estimada por estadiamento TNM. A sobrevida relativa encontrada para os Estádios I e II foi de 71,6% e a dos Estádios III e IV foi de 60,2%. Mesmo com uma diferença moderada entre as sobrevidas, não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os Estádios ($p= 0,09$).

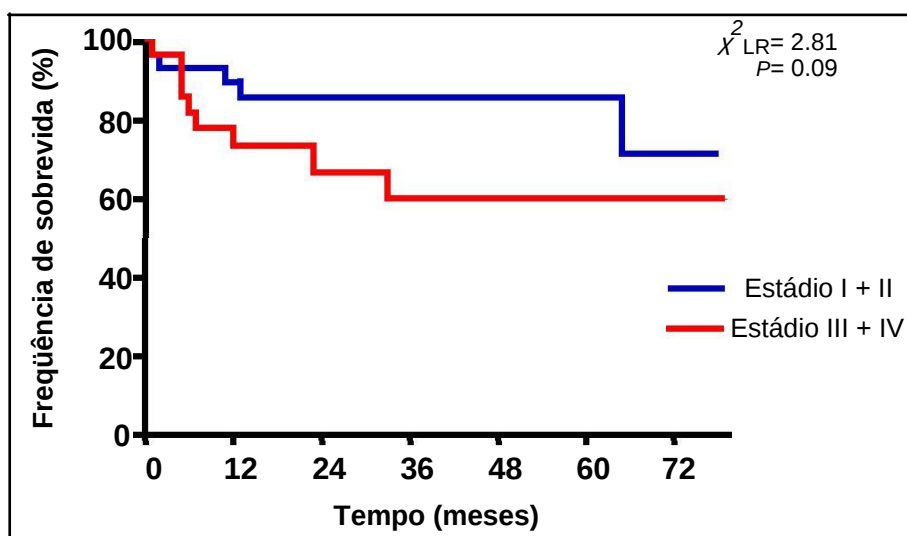


Figura 12. Sobrevida relativa por estadiamento TNM para o CEC de laringe, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.

A sobrevida relativa estimada para os pacientes que foram tratados apenas por cirurgia foi de 68,2%, contra 75,1% dos pacientes que foram submetidos além da cirurgia, à quimioterapia e radioterapia. As diferenças observadas nas taxas de sobrevida não foram estatisticamente significativas ($p= 0,91$) [Figura 13].

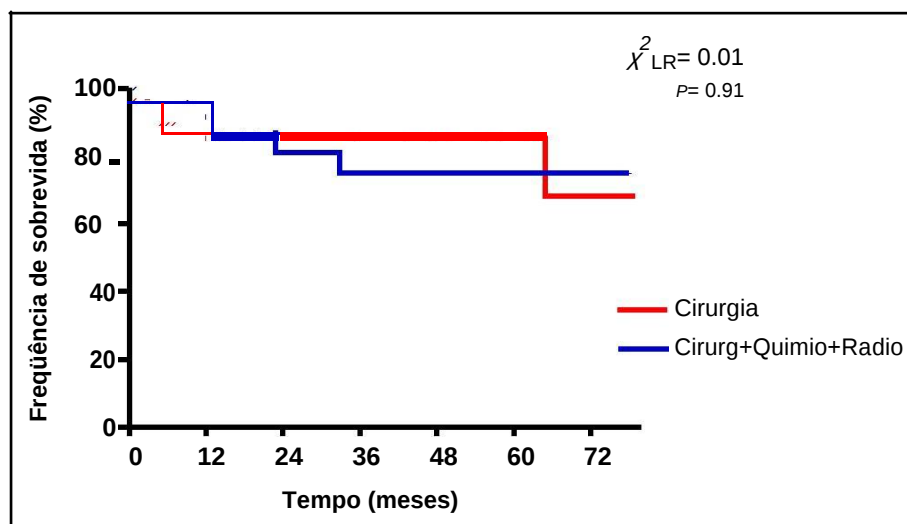


Figura 13. Sobrevida relativa por tratamento para o CEC de laringe, na população de Goiânia, no período de 1998 a 2008.

6. Conclusão

A laringe possui funções importantes para o organismo, como fonação e respiração. Uma determinada patologia que acomete esse sítio anatômico trará sérios problemas fisiológicos, tendo um impacto expressivo na qualidade de vida do paciente. De acordo com os dados analisados:

- O CEC da laringe acomete 3,5 vezes mais os homens, do que as mulheres. Essa relação tende a diminuir, com o passar dos anos devido provavelmente, ao aumento do número de mulheres que apresentam os hábitos tabagista e etilista.

- Os pacientes com hábitos tabagista e etilista crônicos e concomitantes apresentam uma sobrevida consideravelmente menor, quando comparados aos pacientes que não apresentam tais hábitos em um intervalo de 6 anos.

- A sobrevida geral da laringe foi de aproximadamente 66% em seis anos. Tal observação está diretamente relacionada aos hábitos tabagistas e etilistas concomitantes, reforçando a participação desses fatores na iniciação e progressão do CEC de laringe.

- Pacientes brancos apresentaram uma sobrevida menor em relação aos pacientes pardos. O mesmo foi observado em pacientes que exercem atividades no setor 3º (prestação de serviços) em comparação com aqueles que atuam no setor 1º (agricultura).

- Não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de sobrevida quanto ao estadiamento e tratamento dos pacientes com CEC da laringe.

CAPÍTULO II. SUSCETIBILIDADE GENÉTICA AO CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO: REVISÃO DE LITERATURA.

Resumo

As neoplasias epiteliais de cabeça e pescoço são responsáveis por uma grande mortalidade em todo o mundo, constituindo a sexta causa de morte por câncer. Os sítios anatômicos do trato aéreo digestivo superior acometido compreendem: cavidade bucal, faringe, nasofaringe, hipofaringe, fossa nasal, laringe e glândulas. Vários genes polimórficos que codificam enzimas envolvidas na biotransformação de carcinógenos têm sido associados ao desenvolvimento de câncer, sobretudo no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. A distribuição e disposição dos carcinógenos da fumaça do cigarro no trato aéreo-respiratório ainda não foram bem estudadas e as vias específicas de ativação e detoxificação dos carcinógenos nos tecidos da cabeça e do pescoço também ainda não foram bem caracterizadas. A análise genotípica pode trazer informações sobre o papel das vias metabólicas de carcinógenos específicos. Entretanto, devido às divergências encontradas entre os diferentes estudos envolvendo estes genes do biometabolismo, as pesquisas futuras devem ser intensificadas objetivando obter informações mais consistentes e que possibilitem um melhor entendimento sobre as interações genético-ambientais.

Palavras-chave: câncer de cabeça e pescoço, biometabolismo, bioativação e detoxificação.

Abstract

The head and neck epithelial neoplasms are responsible for a large mortality throughout the world, being the sixth cause of death by cancer. The anatomical sites of the upper digestive air treatment affected include: the oral cavity, pharynx, nasopharynx, hypopharynx, pit nose, larynx and glands. Several polymorphic genes that encode enzymes involved in the biotransformation of the carcinogens have been associated to the development of cancer, especially in squamous cell carcinoma of head and neck. The distribution and arrangement of the carcinogens of cigarette smoke in the respiratory tract still have not been well studied and the specific ways of activation and detoxification of carcinogens in the tissues of head and neck also have not been well characterized. The genetic analysis can provide information on the role of metabolic pathways of specific carcinogens. However, due to differences found between different studies involving these genes of the biometabolism, future research should be intensified to obtain more consistent information and that make it able for a better understanding about genetic-environmental interactions.

Keywords: head and neck epithelial cancer, biometabolism, bioactivation and detoxification.

1. Introdução

Pesquisas no campo da epidemiologia molecular têm fornecido evidências da contribuição do ambiente no surgimento do câncer humano e também sobre as situações de risco fortemente influenciadas pela susceptibilidade genética (Weinberg, 1992). Aliando-se a metodologia molecular, principalmente a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), os modelos laboratoriais *in vitro* e *in vivo* e os diversos métodos bioquímicos, aos dados obtidos pela epidemiologia clássica, possibilita-se não apenas o levantamento rápido dos riscos populacionais, mas também individuais, no surgimento de neoplasias (Kato *et al.*, 2004; Feigelson *et al.*, 1996).

O biomarcador pode ser definido como método, estrutura ou processo que se encontra na via causal, ou intimamente ligado a esta, entre o momento da exposição e o câncer, em qualquer etapa do processo carcinogênico (Bartsh, 2000). A presença, a quantidade e o padrão de expressão de determinado marcador estão correlacionados com a probabilidade de transformação maligna de uma célula (Wogan, 1992). A Tabela I ilustra a classificação dos marcadores biológicos para os estudos de pesquisa epidemiológica, segundo o Conselho Norte-Americano de Pesquisa (1987).

Tabela I. Tipo de marcadores biológicos para estudos epidemiológicos, segundo o Conselho Norte-Americano de Pesquisa.

Tipos de marcadores	Características
Marcadores de exposição	Fornecem informações sobre a quantidade de compostos normalmente ausentes em sistemas vivos (xenobióticos) aos quais os indivíduos estão expostos, principalmente pela presença na urina, plasma ou saliva.
Marcadores de efeito	Indicam a presença da doença ou de sinais pré-clínicos da mesma, representando momentos isolados do processo que podem ser qualitativa ou quantitativamente avaliados, como trocas entre cromátides irmãs, aberrações cromossômicas, estados hormonais alterados, antígenos tumorais, mutações em genes supressores de tumor e oncogenes.
Marcadores de susceptibilidade	São indivíduos ou populações com diferenças biológicas capazes de influenciar a resposta do organismo a agentes ambientais, como absorção diferencial de micronutrientes e os polimorfismos dos genes de reparo e do biometabolismo.

O princípio básico dos marcadores de susceptibilidade consiste na diferença interindividual que confere graus de sensibilidade às doenças induzidas pelo ambiente. Esses marcadores podem incluir características genéticas, diferenças no metabolismo ou a capacidade diferencial de um órgão para se recuperar de agressões ambientais (Taningher *et al.*, 1999).

Entre os mais significativos marcadores de susceptibilidade estão os polimorfismos genéticos que resultam em diferenças na capacidade das células de repararem lesões no DNA causadas por agentes ambientais (Spitz & Bondy, 1993; Kaderlick & Kadlubar, 1995). Um outro tipo importante de biomarcador baseia-se em enzimas que, se modificadas, podem aumentar ou diminuir a interação destas com as biomoléculas informacionais, aumentando o potencial carcinogênico de muitos compostos que normalmente não seriam prejudiciais (Guengerich, 2000).

1.1. Biotransformação de agentes xenobióticos

Alguns indivíduos ou subgrupos de pacientes com câncer podem apresentar um risco aumentado para o desenvolvimento da doença devido a diferenças individuais no biometabolismo. Vários estudos identificaram a relação de inúmeros polimorfismos genéticos com as variações na capacidade de metabolização de xenobióticos, sendo a maioria desses de relevância clínica (Amorim, 2003; González, 1998).

A biotransformação de certos xenobióticos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), é responsável pela ativação bioquímica dessas moléculas, originalmente pouco reativas, em produtos mais eletrofílicos, tornando-as mais vulneráveis à ligação com centros nucleofílicos das células, como proteínas e o DNA. Consequentemente pode ocorrer à formação de adutos, potencializando os efeitos mutagênicos dos agentes xenobióticos (Parkinson, 2001). Os adutos tendem a ser eliminados por enzimas de reparo, mediadas pela

proteína p53. Caso a célula se divida antes que o reparo seja devidamente efetuado, esses adutos provavelmente, levarão ao surgimento de mutações, podendo ser do tipo pontual ou mesmo causar perdas cromossômicas como *cross link* (Ribeiro *et al.*, 2003).

Estudos relatam que genes que expressam enzimas de biotransformação de xenobióticos apresentam variantes polimórficas que resultam em diferentes atividades catalíticas para o mesmo grupo de enzimas (Wunsch Filho, 2004). Agentes endógenos, como processos inflamatórios e hormônios esteroidais, assim como diversos carcinógenos ambientais são considerados promotores da carcinogênese, por provocar estímulos reversíveis para a proliferação celular, diminuindo as chances do reparo à mutação ocasionado pela formação dos adutos (Guenguerich, 2000).

O processo de biotransformação de agentes xenobióticos abrange principalmente duas fases: Fase I, que compreende as reações de oxidação, hidrólise ou redução, onde grupos funcionais são adicionados à molécula do xenobiótico, ou onde os grupos funcionais já presentes na molécula original são expostos; e reações de Fase II, que englobam as reações de conjugação a substratos endógenos ou síntese, envolvendo os grupos funcionais. A biotransformação converte substâncias originalmente lipofílicas em metabólitos mais hidrofílicos, além de poder levar à perda do potencial tóxico ou farmacológico, e ainda, facilitar sua detoxificação (Parkinson, 2001) [Figura 1].

1.2. Polimorfismos genéticos

A melhoria dos métodos de diagnóstico de doenças genéticas, a otimização de protocolos terapêuticos mais eficazes e, sobretudo a prevenção de certas doenças genéticas e epigenéticas, com o advento do aconselhamento genético, são importantes passos alcançados com a codificação do genoma humano (Kimura & Baía, 2002; Ellsworth *et al.*, 1997). Mais de 1.4 milhões de SNPs (do inglês, *single nucleotide polymorphism*) foram identificados com

o fim do Projeto do Genoma Humano (PGH), sendo 60.000 desses polimorfismos localizados em éxons de genes de interesse clínico (Sachidanandam, 2001). O polimorfismo de nucleotídeo único acomete genes que exibem variações alélicas com frequência superior a 1%, resultando em pelo menos, dois fenótipos distintos (Ferreira & Rocha, 2004).

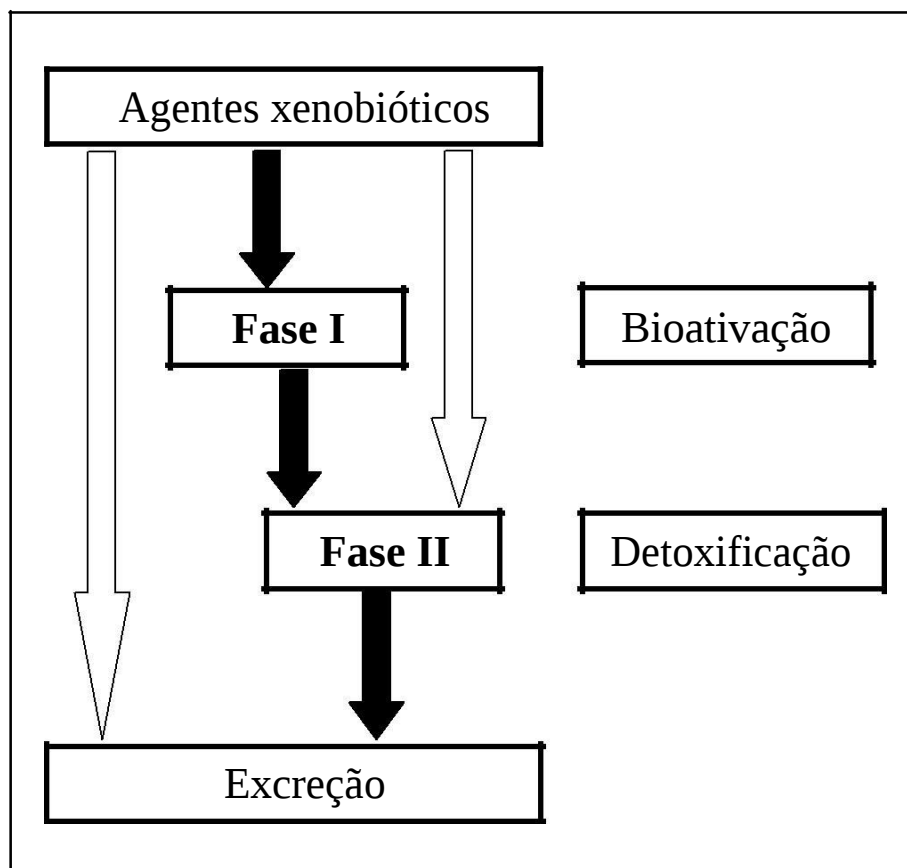


Figura 1. Desenho esquemático mostrando as fases do biometabolismo de agentes xenobióticos: Fase I (bioativação) e II (detoxificação).

Estima-se 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. A fração restante pode ser atribuída a fatores ambientais que atuam em conjunto com a suscetibilidade genética (Yuspa, 2000). A modulação dos processos de biotransformação baseia-se na codificação e expressão de diversos genes, sendo esse fator a provável causa das maiores fontes de variabilidade interindividual na suscetibilidade aos agentes carcinógenos (Masson *et al.*, 2005; Santiago, 2002; Autrup, 2000).

Diversos estudos sobre as variações interindividuais na capacidade de metabolização de xenobióticos relacionam inúmeros polimorfismos genéticos, que afetam os níveis de expressão ou a atividade catalítica das enzimas envolvidas nos processos de bioativação e detoxificação destes agentes, através de diferentes mecanismos moleculares (Macleod *et al.*, 1997; Meyer e Zanger, 1997).

Muitos xenobióticos que desempenham um papel importante na etiologia de doenças podem ser ativados ou inativados por enzimas polimórficas e, dependendo do tipo de reação mediada por esta enzima, sua deficiência pode conferir vantagem ou desvantagem na suscetibilidade a certa patologia (Daly *et al.*, 1993).

Uma vez que a maioria dos agentes mutagênicos/carcinogênicos requer ativação metabólica antes de se ligar ao DNA, ao RNA e às proteínas (Rogers, 1994), as variações nos processos de ativação e detoxificação de compostos químicos e drogas desempenham papel crucial na tumorigênese (Bartsch & Hietanen, 1996).

Assim, distúrbios no equilíbrio destes processos podem explicar a variabilidade na resposta individual à exposição a tais compostos (Hirvonen, 1995). A quantidade final efetiva de carcinógenos produzida depende da ação competitiva entre os mecanismos de ativação e detoxificação, envolvendo as enzimas que tomam parte nessas vias bioquímicas da célula (Hayes & Pulford, 2005).

Desse modo, a variação interindividual na resposta aos agentes xenobióticos, aos quais os indivíduos podem ter sido expostos através da dieta, da terapia medicamentosa e/ou exposição ocupacional e os efeitos carcinogênicos potenciais advindos, são mediados pela predisposição herdada (Wormhoudt *et al.*, 1999). Alguns indivíduos ou subgrupos populacionais, como as diferentes etnias, podem apresentar risco significativamente maior de apresentar câncer quimicamente induzido do que a média populacional, devido às diferenças expressivas nos processos de ativação e detoxificação (Caporaso, 1999).

O equilíbrio entre as enzimas que aumentam a toxicidade e as que inativam os produtos químicos pode conferir sensibilidade individual diferenciada (Albertini, 1999). Como consequência dessa variabilidade individual, os modelos de investigação de risco devem considerar a suscetibilidade genética, que torna os indivíduos mais resistentes ou mais sensíveis à exposição ambiental, sobretudo ao tabaco e ao álcool no caso do câncer de cabeça e pescoço (Vineis, 1995).

Uma série de mecanismos moleculares responsáveis pelos polimorfismos genéticos das enzimas de biotransformação pode ser observada na Figura 2. A deleção gênica que resulta na ausência completa de codificação do gene para a enzima é uma das principais manifestações moleculares observadas em genes de detoxificação como as *GSTM1* e *GSTT1*. Mutações em regiões regulatórias de proto-oncogenes são responsáveis pelo aumento da expressão gênica de diversos genes com a família *Myc*, encontrado hiperexpresso em várias neoplasias (Wunsch & Zago, 2005).

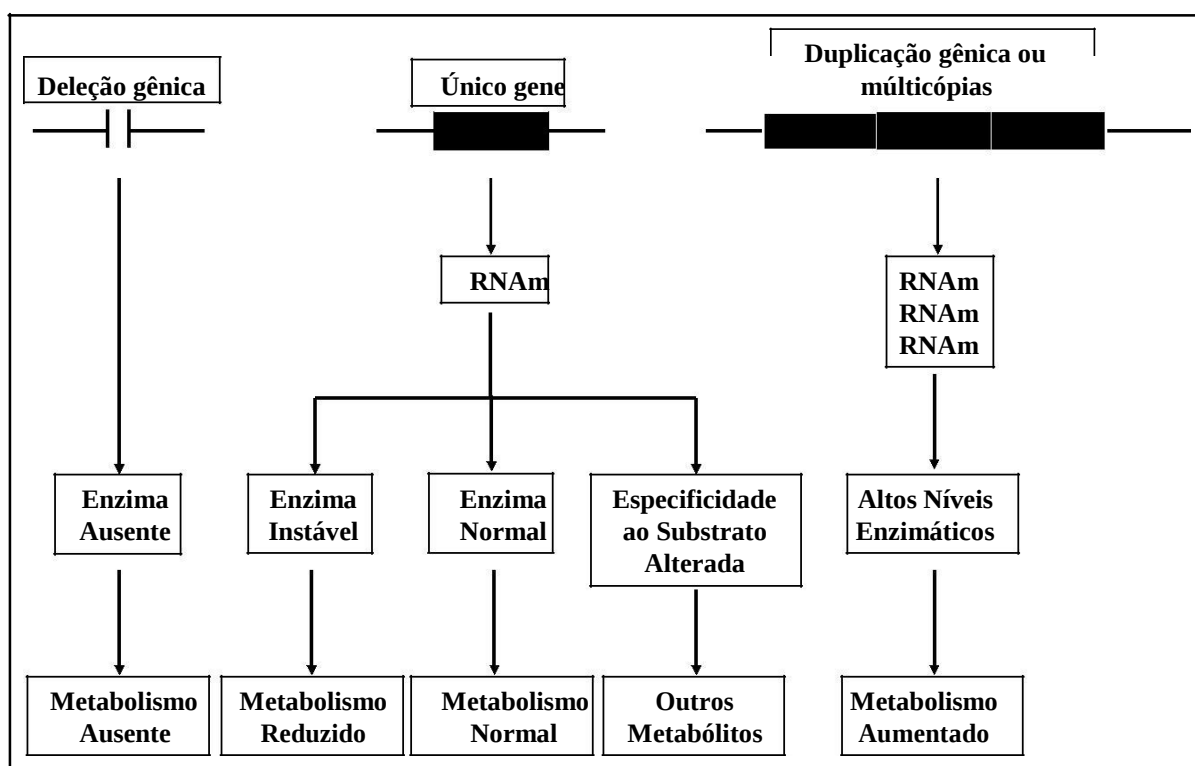


Figura 2. Desenho esquemático dos mecanismos moleculares de polimorfismos nas enzimas de biotransformação, modificado de Wormhoudt *et al.* (1999).

2. Suscetibilidade genética ao câncer de cabeça e pescoço

As neoplasias epiteliais de cabeça e pescoço são responsáveis por uma grande mortalidade em todo o mundo, constituindo a sexta causa de morte por câncer (Walker *et al.*, 2003). Os sítios anatômicos do trato aéreo digestivo superior acometido compreendem: cavidade bucal, faringe, nasofaringe, hipofaringe, fossa nasal, laringe e glândulas, incluindo-se, como cânceres da laringe, aqueles que acometem: região glótica, subglótica e supraglótica (Canevari & Rogato, 2004).

O tipo histológico mais freqüente, o carcinoma espinocelular, presente em mais de 90% dos casos, é associado com o consumo de álcool e tabaco. Elementos lipofílicos como o benzopireno, presente na fumaça do cigarro, são bioativados pelas citocromo-oxidades tornando-se altamente eletrofílicos na corrente sanguínea. Tal processo é fundamental para sua detoxificação mediada pelas enzimas de fase do biometabolismo como as GST-tranferases (Casiglia & Woo, 2001). O processo de biometabolismo do benzopireno está ilustrado na Figura 3.

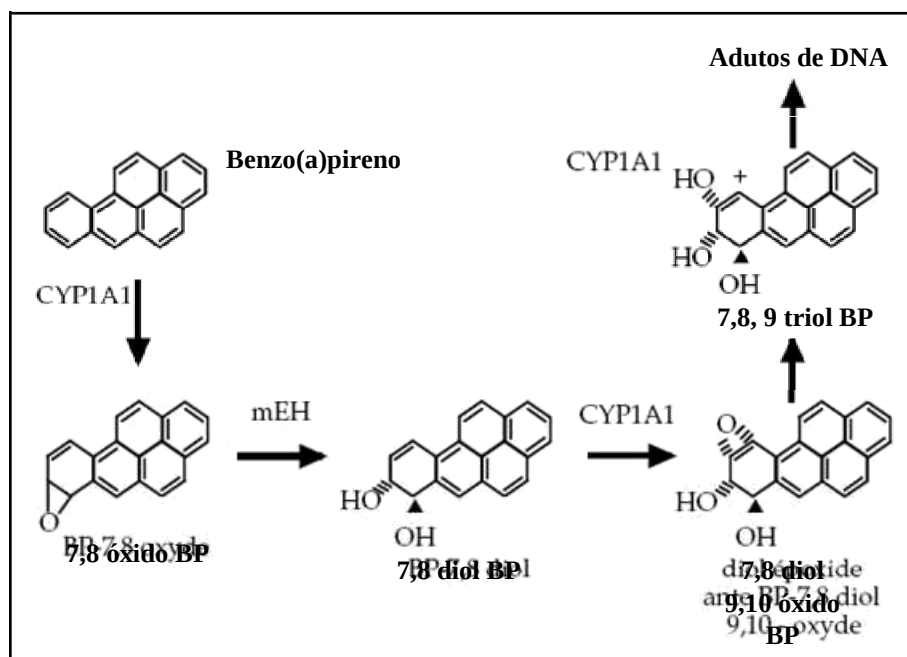


Figura 3. Desenho esquemático demonstrando o processo de bioativação da molécula de benzo(a)pireno pela enzima CYP1A1 e mEH (Epóxido hidroxilase)..

Os polimorfismos metabólicos que têm sido associados de forma mais consistente com o aumento do risco de câncer incluem as enzimas da superfamília CYP, as GSTs e as NATs (Gattás, 2001). Além disso, a combinação de genótipos de alto risco para ativação e detoxificação de xenobióticos, como por exemplo, *CYP1A1 MspI/GSTM1* nulo, está fortemente associada ao aumento de risco de desenvolver câncer, especialmente aqueles ligados ao cigarro (Autrup, 2000), já que o impacto de um único polimorfismo genético pode ser fraco, mas é amplificado quando interações entre mais de um gene polimórfico são analisadas (Kaderlik & Kadlubar, 1994).

Segundo Geisler e Olshan (2001), indivíduos deficientes em múltiplos passos enzimáticos possuem risco aumentado para o desenvolvimento de tumores, sendo sugerida uma maior susceptibilidade para aqueles indivíduos que possuem alterações na Fase I da metabolização, como aquelas conferidas por alterações no gene *CYP1A1*, concomitantes com deleção do gene *GSTM1*. Segundo estes autores, a identificação de grupos de pessoas que possuam uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço (tabagistas), como aqueles de cavidade laríngea, baseada na capacidade de metabolizar os carcinógenos presentes no cigarro, é de grande importância. Devido à complexidade dos componentes do tabaco, e da presença de múltiplos passos em sua metabolização, a análise da susceptibilidade genética do indivíduo em ambas as fases da metabolização, I e II, deve ser considerada.

A correlação entre os polimorfismos nos genes *CYPs* e o risco para o desenvolvimento de câncer não está completamente estabelecida. Assim, novos estudos nesta área necessitam ser realizados (Ingelman-Sundberg, 2001). Entretanto, estudos recentes mostraram que os genótipos nulos para os genes *GSTM1* e *GSTT1*, individualmente e em combinação, são um forte fator de risco para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço em indivíduos com hábito tabagista, o que, conseqüentemente, aumenta as chances

de se desenvolver câncer nesta região. Apesar de estes dados necessitarem de confirmação, indivíduos de alto risco podem ser identificados e submetidos a tratamento quimioterápico preventivo antes mesmo de apresentarem os sintomas da malignidade (Bartsch, 2000).

Como a interação entre a constituição genética do indivíduo e os fatores ambientais é de grande importância na determinação do fenótipo, o fenômeno do polimorfismo genético poderia explicar o fato de apenas 15% dos fumantes desenvolverem câncer de pulmão. Sendo o metabolismo um processo bastante complexo, um grande número de enzimas deve estar envolvido, de modo que se torna necessário elucidar o papel destes genes (como *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1*) no surgimento de determinadas doenças na população humana (Au *et al.*, 2001).

Tanto a identificação de polimorfismos de genes cujos produtos estejam envolvidos na metabolização de xenobióticos, como a possível contribuição destes para o desenvolvimento de câncer de boca e de laringe, vem sendo, portanto, avaliadas. A identificação precoce de alterações no material genético e de indivíduos mais propensos a acumular mutações no decorrer de suas vidas pode conduzir a novas perspectivas para a prevenção e o diagnóstico precoce de certos tumores (Gattás, 2001).

3. Considerações finais

A distribuição e disposição dos carcinógenos da fumaça do cigarro no trato aéreo digestivo superior ainda não foram bem estudadas e as vias específicas de ativação e detoxificação dos carcinógenos nos tecidos da cabeça e do pescoço também ainda não foram bem caracterizadas. Vários genes polimórficos que codificam enzimas envolvidas na biotransformação de carcinógenos têm sido associados ao desenvolvimento de câncer, sobretudo no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.

Variantes alélicas polimórficas dos genes *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* que codificam estas enzimas podem alterar a expressão ou a função enzimática, levando a um aumento ou a uma diminuição na ativação e detoxificação de diversos carcinógenos. Tais enzimas fazem parte de superfamílias que possuem um importante papel na metabolização de um grande número de compostos, como os encontrados na dieta e na fumaça do cigarro, atuando, conseqüentemente, na manutenção da integridade genômica.

A análise genotípica desses genes pode trazer informações sobre o papel das vias metabólicas de carcinógenos específicos. Entretanto, devido às divergências encontradas entre os diferentes estudos envolvendo estes genes do biometabolismo, pesquisas futuras devem ser intensificadas objetivando obter informações mais consistentes e que possibilitem um melhor entendimento sobre as interações genético-ambientais.

CAPÍTULO III. ANÁLISE DO POLIMORFISMO CYP1A1m1 ASSOCIADO À SUSCETIBILIDADE GENÉTICA DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LARINGE.

Resumo

Estudos das variações individuais na capacidade de metabolização de agentes xenobióticos identificaram inúmeros polimorfismos genéticos, a maioria de relevância clínica, envolvendo enzimas que metabolizam tais agentes. O gene *CYP1A1m1*, codifica uma enzima de mesmo nome, que catalisa a oxidação de HAPs em produtos fenólicos e epóxidos. Há sete variantes principais descritas para esse gene: *CYP1A1m1*, *m2*, *m3*, *m4*, *m5*, *m6* e *m7*. O objetivo principal do presente estudo foi estabelecer os perfis alélicos do gene *CYP1A1m1* em grupos caso-controle investigando os graus de suscetibilidade dos pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular (CEC) da laringe pelo Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge, ACCG, segundo hábitos tabagistas e etilistas. Ao total foram avaliadas 111 amostras, sendo 62 provenientes de pacientes com CEC da laringe e 49 de pacientes do grupo controle. No presente estudo, foram encontradas frequências alélicas de 52,4% (34/62) e 63,3% (31/49) para o alelo selvagem C e 44,4% (28/62) e 34,7% (18/49) para o alelo mutante T, que se encontraram homogeneamente distribuídas entre pacientes e controles, bem como entre os sexos masculino e feminino. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas das variantes alélicas e genotípicas *CYP1A1m1* com o carcinoma espinocelular da laringe. A ausência desta verificação, no entanto, não exclui completamente a possibilidade deste gene de exercer alguma influência no desenvolvimento do câncer laríngeo, tendo em vista que haplótipos envolvendo os diversos genes do biometabolismo podem contribuir de forma diferenciada para a carcinogênese.

Palavras-chave: *CYP1A1m1*, *GSTM1*, *GSTT1*, suscetibilidade e câncer.

Abstract

Studies of individual variations in the ability of xenobiotics agents metabolism identified several genetic polymorphisms, the majority with clinical relevance, involving enzymes that metabolise these agents. The CYP1A1m1 gene, encodes an enzyme with the same name, which catalyzes the oxidation of PAHs in phenolic and epoxides products. There are seven main variants described for this gene: CYP1A1m1, m2 and m3, m4, m5, m6 and m7. The main objective of this study was to establish the allelic profiles of the gene CYP1A1m1 in case-control groups investigating the degrees of susceptibility of patients diagnosed with squamous cell carcinoma (SCC) of the larynx by the Serviço de Cabeça e Pescoço of the Hospital Jorge Araujo, ACCG, according to smoking and alcoholism habits. In total 112 samples were evaluated, 63 from patients with SCC of the larynx and 49 patients in the control group. In this study, were found allelic frequencies of 52.4% (34/62) and 63.3% (31/49) for the wild allele C and 44.4% (28/62) and 34.7% (18/49) for the mutant allele T, which were homogeneously distributed between patients and controls, as well as between male and female. There were no statistically significant associations between allelic variants and genotypic CYP1A1m1 with squamous cell carcinoma of the larynx. The absence of this verification, however, does not completely exclude the possibility of this gene exert some influence on the development of laryngeal cancer, in order that haplotypes involved in several genes of biometabolism can contribute in different ways to carcinogenesis.

Keywords: *CYP1A1m1*, *GSTM1*, *GSTT1*, susceptibility and cancer.

1. Introdução

A melhoria dos métodos de diagnóstico de doenças genéticas, otimização de protocolos terapêuticos mais eficazes e, sobretudo a prevenção de certas doenças genéticas e epigenéticas, com o advento do aconselhamento genético, são importantes passos alcançados com a codificação do genoma humano (Kimura & Baía, 2002; Ellsworth *et al.*, 1997). Mais de 1.4 milhões de SNPs (do inglês, *single-nucleotide polymorphism*) foram identificados com o fim do PGH (Projeto do Genoma Humano), sendo 60.000 desses polimorfismos localizados em éxons de genes de interesse clínico (Sachidanandam, 2001). O polimorfismo de nucleotídeo único acomete genes que exibem variações alélicas com frequência superior a 1%, resultando em pelo menos, dois fenótipos distintos (Ferreira *et al.*, 2004).

Estima-se 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. A fração restante pode ser atribuída a fatores ambientais que atuam em conjunto com a suscetibilidade genética (Yuspa, 2000). A modulação dos processos de biotransformação baseia-se na codificação e expressão de diversos genes, sendo esse fator a provável causa das maiores fontes de variabilidade interindividual na suscetibilidade aos agentes carcinógenos (Masson *et al.*, 2005; Santiago, 2002; Autrup, 2000).

1.1. Citocromo P450 (CYP450)

O citocromo P-450 foi identificado primeiramente em 1958 nomeado por apresentar um pigmento (P) com o espectro de, no máximo, 450nm, quando reduzido e ligado ao monóxido de carbono (Garfinkle, Klingenberg, 1958). Este pigmento foi posteriormente caracterizado como uma hemoproteína P450, em 1961. Até o presente momento, existem mais de 270 famílias de CYP diferentes, com 18 famílias registradas em mamíferos (Werck-Reichhar & Feyereisen, 2000).

Atualmente, ainda não existe uma regra para a distribuição tecidual das enzimas P450. Como suas funções são extremamente diversas, elas podem ser encontradas em todos os tipos de tecidos, em todos os tipos de organismos (Werck-Reichhar & Feyereisen, 2000). Estima-se que mais de 100 genes distintos de *CYP450* são expressos em mamíferos (Whitlock, 1990). Primeiramente, sua expressão foi descrita nos hepatócitos, onde há uma grande variedade e quantidade dessas enzimas relacionadas ao metabolismo de diversas drogas (Omura & Sato, 1964).

Até o final da década de 80 havia mais de 14 diferentes nomes em uso para o que atualmente é conhecido como citocromo P450, e mais de 20 nomes para proteínas homólogas de diferentes espécies. Com o advento do sequenciamento dos genes e proteínas do CYP450 a heterogeneidade quanto à nomenclatura aumentou, exigindo-se uma classificação universal, baseada na sequência de aminoácidos do gene *CYP450* (Nelson *et al.*, 1993). A classificação inclui a designação de *CYP*, seguido pelos símbolos que denotam o gene da família (número arábico), subfamília (letra em maiúscula), e o gene específico (número arábico). As subfamílias do citocromo P450 são classificadas considerando: o peso molecular monomérico, a composição de aminoácidos, a sequência terminal de aminoácidos, a especificidade ao substrato, a distinção por anticorpos específicos e o tipo de reação em que estão envolvidas [Figura 1].

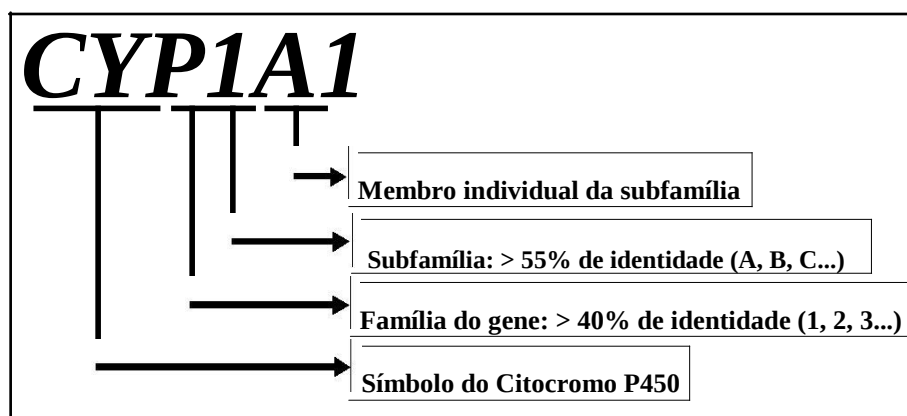


Figura 1. Nomenclatura atribuída à família dos genes *CYP450* proposta por Nelson *et al.* (1993).

Os genes do citocromo P450 codificam numerosas enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo de compostos endógenos como os hormônios esteróides, ácidos graxos e algumas vitaminas lipossolúveis (A e D), assim como no metabolismo de xenobióticos, entre eles várias drogas, agentes carcinógenos, pesticidas, alcalóides entre outros (Conforti-Froes *et al.*, 2004; Santiago *et al.*, 2002;). Esse complexo está altamente distribuído em animais, vegetais, bactérias e protistas, antes mesmo da divisão evolutiva entre organismos eucariontes e procariontes (Oinonen & Lindros, 1998).

A expressão da família de gene *CYP1* é induzida pelo receptor hidrocarbono aril, um fator transcricional que é ativado pela ligação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, onde as isoformas 1A1 e 1B1 parecem agir de forma mais eficaz. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são encontrados nos produtos de incineração industrial, fumaça do cigarro, e comidas grelhadas no carvão. Tanto a *CYP1A1*, quanto a *CYP1A2* são enzimas expressas em quantidades variadas, em diferentes tecidos (Nebert & Russel, 2002). A isoforma 1A1 apresenta grande correlação com a carcinogênese no pulmão (Oinonen & Lindros, 1998).

1.1.1. O gene *CYP1A1*

O gene *CYP1A1* localiza-se no cromossomo 15, *locus* 15q22-24 (Hildebrand *et al.*, 1985), e codifica para a isoenzima CYP4501A1, que catalisa a oxidação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em produtos fenólicos e epóxidos (González, 1989). A indução de *CYP1A1* ocorre via ligação do composto indutor ao receptor de Aril-hidrocarbono (Ah), que ativa então a transcrição de vários genes que codificam proteínas envolvidas na metabolização de xenobióticos [Figura 2] (Kawajiri *et al.*, 1993).

O polimorfismo fenotípico que afeta a atividade da proteína *CYP1A1* em humanos foi descrito primeiramente, por Kellermann *et al.* em 1973. Atualmente existem mais de 16

alelos já descritos, mas somente sete variantes estão relacionadas a diferenças no metabolismo de agentes xenobióticos (Ingelman-Sundberg, 2001) [Tabela I]. A bioativação de vários HPAs é iniciada com a estimulação do receptor de Ah e este, por sua vez, ativa a transcrição do *CYP1A1* e outras enzimas envolvidas no processo de bioativação de xenobióticos (Hirvonen, 1997).

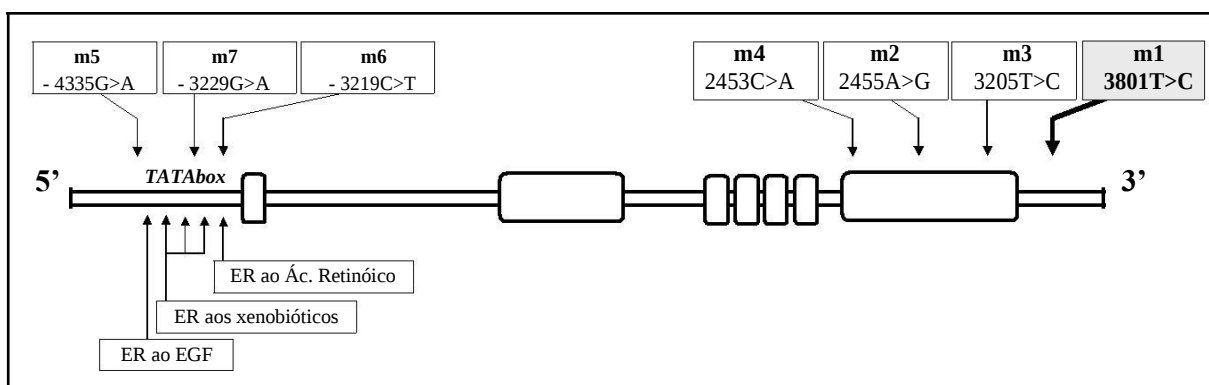


Figura 2. Desenho esquemático do gene *CYP1A1*, indicando a localização dos elementos responsivos (ER) ao fator de crescimento epidermal (EGF), agentes xenobióticos e ácido retinóico. As variantes alélicas *m5*, *m6* e *m7* estão localizadas na extremidade 5' (região promotora e TATAbox) e as variantes *m2*, *m3* e *m4* no éxon 7. Por fim, a variante *m1* está localizada na região UTR 3'.

Spurr *et al.* (1987) descreveram a primeira variante (*m1*), através do uso da enzima de restrição *MspI*, que cliva um polimorfismo originado pela mutação T3801→C, resultando no alelo polimórfico *CYP1A1**2A (Walker, 1996). As frequências destes polimorfismos mostram extensa variação étnica, tendo sido observados valores para o genótipo mutante de 31% entre japoneses e 12% em populações caucasóides (Nebert *et al.*, 2002).

Uma segunda mutação de ponto (A2455→G) é responsável por outro polimorfismo no éxon 7 do gene *CYP1A1*, originando o alelo polimórfico *CYP1A1**2B, que se encontra em desequilíbrio de ligação com o alelo *CYP1A1**2A (Hayashi *et al.*, 1991). Tal mutação leva à substituição do aminoácido isoleucina (*Ile*) por uma valina (*Val*) no resíduo 462. Este polimorfismo resulta em dois genótipos homozigotos (*Ile/Ile* e *Val/Val*) e um heterozigoto (*Ile/Val*) e, no caso de os alelos serem mutantes, leva à diminuição da atividade catalítica da enzima (Nakachi *et al.*, 1991).

Tabela I. Relação das variantes alélicas do gene *CYP1A1*.

m1 3801T>C	m2 2455A>C	m3 3205T>C	m4 2453C>A	m5 -4335G>A	m6 -3219C>T	m7 -3229G>A	Alelo	Referências
T	A	T	C	G	C	G	*1A (sv*)	Jaiswal <i>et al.</i> (1985).
T	A	T	C	G	T	G	*1B	Smart & Daly (2000).
T	A	T	C	G	C	A	*1C	Smart & Daly (2000).
T	A	T	C	A	C	G	*1D	Gaikovitch <i>et al.</i> (2003).
T	A	T	C	A	C	A	*1E	Gaikovitch <i>et al.</i> (2003).
C	A	T	C	G	C	G	*2A	Spurr <i>et al.</i> (1987).
C	G	T	C	G	C	G	*2B	Hayashi <i>et al.</i> (1991).
T	G	T	C	G	C	G	*2C	Persson <i>et al.</i> (1997).
T	A	C	C	G	C	G	*3	Crofts <i>et al.</i> (1996)
T	A	T	A	G	C	G	*4	Cascorbi <i>et al.</i> (1996)

*sv: selvagem.

Fonte: modificado de Gaikovitch *et al.* (2003).

Acredita-se que, em decorrência, possa haver a formação de adutos no DNA, levando ao acúmulo de danos com potencial carcinogênico (Kiyohara *et al.*, 1996). Entretanto, as consequências exatas deste polimorfismo ainda são discutidas. Hayashi *et al.* (1991) afirmam que a substituição do aminoácido isoleucina por valina realmente afeta a atividade catalítica da enzima, uma vez que esta substituição ocorre na região heme da molécula que se liga ao substrato. Por outro lado, segundo Persson *et al.* (1997), a presença do polimorfismo *Ile/Val* não afeta a ligação da enzima com o substrato, pois a troca de aminoácidos não muda a conformação da molécula.

Outros alelos polimórficos inicialmente descritos foram: *CYP1A1**3, com o polimorfismo presente em uma região não codificadora do gene e que parece ocorrer exclusivamente em afro-americanos (Crofts *et al.*, 1996) e o alelo *CYP1A1**4, também localizado no éxon 7 do gene (Cascorbi *et al.*, 1996). Novas variantes vêm sendo descritas a cada ano (Smart & Daly, 2000; Chevalier *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2003) e, recentemente,

Amorim *et al.* (2004) descreveram uma nova variante em um estudo envolvendo a população do Rio de Janeiro, atingindo um total de 16 alelos já descritos.

Os alelos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2B* foram correlacionados a um aumento na susceptibilidade ao câncer de pulmão em populações japonesas (Nakachi *et al.*, 1995; Hayashi *et al.*, 1991; Kawajiri *et al.*, 1990), porém tal associação não foi verificada em populações caucasóides ou afro-americanas (Shields *et al.*, 1993; Hirvonen *et al.*, 1997; Tefré *et al.*, 1992). Contudo, em um estudo posterior, foi demonstrada associação do polimorfismo *MspI* e câncer de pulmão em uma população norte-americana, concluindo que tal polimorfismo influencia na susceptibilidade à doença em caucasóides e japoneses da mesma forma (Xu *et al.*, 1996). A existência de diversas variantes já detectadas em *CYP1A1* ressalta a necessidade de verificação dos vários haplótipos decorrentes das várias combinações e do possível impacto de cada um deles como moduladores da susceptibilidade ao câncer (Garte *et al.*, 1996).

1.1.2. A proteína *CYP1A1*

As enzimas do citocromo P450 são hemoproteínas que contêm um citocromo do tipo b e apresentam um grupo prostético, o heme ou ferro-protoporfirina IX. No heme, o ferro é capaz de fazer 6 ligações, sendo quatro destas ligações feitas com os átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos (Figura 3). A quinta ligação do átomo de ferro é realizada com o tiolato (S-) proveniente do resíduo de cisteína, situado próximo à região C-terminal da cadeia polipeptídica única da apoproteína, composta de 400 a 500 aminoácidos. Devido a sua característica eletrofílica, o enxofre da cisteína faz com que o átomo de ferro mantenha-se, normalmente, no estado férrico (Fe^{+3}). O sexto ligante pode ser a água (CYP no estado férrico), o monóxido de carbono ou o oxigênio molecular (CYP no estado ferroso) [Hodgson & Levi, 1994].

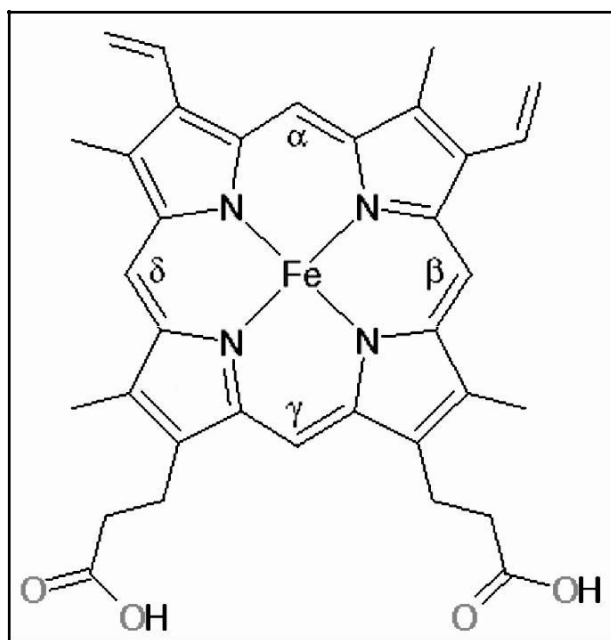


Figura 3. Estrutura bioquímica do grupo prostético heme do citocromo P450 (adaptado de Gibson & Skett, 1994).

A enzima CYP1A1 é considerada primariamente, uma enzima extrahepática em humanos, sendo induzida no pulmão, linfócitos e na placenta após exposição aos HPAs, incluindo aqueles presentes na fumaça do cigarro (Anttilla *et al.*, 1991). O ferro da protoporfirina está ligado à cadeia polipeptídica das isoenzimas do citocromo P450 por forças hidrofóbicas e ligações eletrostáticas covalentes. Quatro valências do átomo de ferro ligante estão ligadas ao anel da porfirina, planarmente, a quinta está ligada ao grupo tiolato (S-) da cisteína da cadeia polipeptídica, por uma ligação coordenada e, a sexta, está orientada em direção ao sítio de ligação do oxigênio, durante a fase I da biotransformação (Guengerich, 2000).

1.1.3. Ação catalítica da CYP1A1

No estado em que o grupo prostético ferro heme está no estado férrico (Fe^{3+}), a molécula está no seu estado livre ou inicial. A primeira etapa é a ligação do substrato, a qual usualmente resulta na conversão para ferro no estado de alto spin, formando um potencial de redução, favorecendo a redução do ferro. Seguido da ligação ao substrato, o ferro é reduzido

pela transferência de elétrons da flavoproteína NADPH-citocromo P450 redutase, em alguns casos com o envolvimento de proteínas ferro-enxofre (redoxinas). Subseqüentemente, o O₂ é ligado, um ponto crítico o qual a catálise pode proceder ou ser interrompida, resultando na liberação de oxigênio ativo (superóxido). A próxima etapa envolve a adição do segundo elétron, em alguns casos via citocromo b5, e a formação de peróxido, seguido pela clivagem da ligação O-O, da formação do radical substrato, e da hidroxilação do radical e liberação do produto. Esta etapa ainda não é bem conhecida. Entretanto, adição de hidroperóxidos orgânicos como hidroperóxido de cumeno para o P450 *in vitro* pode ser necessário para o acoplamento da hidroxila ao substrato (Guengerich, 2000).

O padrão de atividade e capacidade indutora dessa enzima em humanos, relacionada à formação de metabólitos de HPAs capazes de reagir com a molécula de DNA é, portanto, de grande importância para a estimativa do risco de desenvolvimento de câncer. Tais estudos sugerem quais fatores podem aumentar ou diminuir o risco individual no desenvolvimento da resposta do organismo decorrente da exposição aos agentes químicos ambientais. O trabalho justifica-se pela necessidade de correlacionar as variantes alélicas dos genes *CYP1A1m1* em pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular da laringe do Hospital Araújo Jorge (ACCG), segundo hábitos tabagista e etilista.

2. Objetivos

2.1. Geral

Estabelecer os perfis alélicos do gene *CYP1A1m1* em grupos caso-controle investigando os graus de suscetibilidade dos pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular (CEC) da laringe pelo Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge, ACCG, segundo hábitos tabagistas e etilistas.

2.2. Específicos

Analisar as frequências gênicas e genótípicas dos grupos estudados;

Determinar a provável susceptibilidade do CEC da laringe relacionada ao polimorfismo de *CYP1A1m1*;

Determinar a sobrevida dos pacientes portadores dos genótipos homozigotos e heterozigotos;

Confrontar e identificar possíveis associações entre os genótipos de *CYP1A1m1* e os fatores de risco (sexo, idade, tabagismo e etilismo) no grupo dos casos;

Elaborar e sugerir um possível critério de prognóstico baseado nos perfis alélicos estudados.

3. Materiais e métodos

3.1. Grupo amostral

O grupo amostral foi constituído de 62 pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular da laringe e 49 indivíduos controles, que não possuem nenhuma suspeita de câncer nas vias aerodigestivas superiores, selecionados aleatoriamente no banco de amostras do Núcleo de Pesquisas Replicon. Os casos foram obtidos do Serviço de Cabeça e Pescoço do Registro de Câncer de Base Populacional da Associação de Combate ao Câncer em Goiás. Todos os pacientes considerados foram diagnosticados com carcinomas da laringe (CID-O: C32). A participação individual teve caráter voluntário para ambos, casos e controles. O presente estudo teve o parecer favorável do Comitê de Ética da ACCG (Anexo I).

3.2. Obtenção das amostras

Foram coletados 10mL de sangue periférico heparinizado, colhidos em tubos *falcon* de 12mL, sendo posteriormente processados a 5000.g r.p.m. durante 15 minutos. A partir dessa etapa, o anel leucocitário foi aspirado e armazenado em microtubos, preservados a -20°C, para posterior análise.

3.3. Extração de DNA

A extração e purificação de DNA das amostras obtidas foram executadas com uso do kit de extração *Wizard® Genomic DNA Purifications Kit* (Promega®), de acordo com o protocolo de extração sugerido pelo fabricante. As amostras extraídas foram rotuladas e armazenadas a -20°C para serem utilizadas posteriormente, nas reações de PCR-RFLP.

3.4. Genotipagem do Gene CYP1A1m1 pela técnica de PCR-RFLP.

Todas as 111 amostras foram submetidas à PCR em 25`L de reação, contendo água Mili-Q, 0.3nmol de *primer* alelo-específico (Prodimol®) [Tabela II], 1U de *Taq DNA polimerase* (Promega®), 1X de STR® *buffer* (Promega®) (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 0,2mM dNTPs e 0,5mM de MgCl₂) e ~100ng de DNA genômico total.

Tabela II. Características gerais dos *primers* utilizados para a avaliação genômica em pacientes com Câncer da Laringe.

Marcador	Seqüência	Polimorfismo	T.M.	Referência
CYP1A1 m1	M1F: CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT	3801 T>C	340pb	Hauashi <i>et al.</i> (1991)
	M1R: TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT	(MspI)	140pb – 200pb	

T.M.: tamanho molecular.

Para a amplificação do fragmento de 340pb, da região 3'UTR do gene CYP1A1 foi utilizado o protocolo de termociclagem sugerido por Hauashi *et al.* (1991) [Tabela III]. Após a amplificação, 10`L do produto de PCR com adição de 3`L de tampão 1X de corrida (0,05% de azul de bromofenol e xileno cianol, 95% de formamida) foram resolvidos em gel de Agarose a 1,5% em TBE (Tris-Borato EDTA) 1X, mediante aplicação de um campo elétrico constante de 10V/cm por 1 hora. Posteriormente, o gel foi submerso em TBE 1X contendo 5µL/mL de Brometo de etídeo (EtBr) por aproximadamente 15 minutos e em seguida as imagens foram capturadas em sistema de vídeo-documentação ImageMasterVDS® (Amersham Pharmacia Biotech, EUA), para análise da amplificação.

Tabela III. Protocolo de termociclagem para a genotipagem de CYP1A1m1.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Ciclos
Desnaturação inicial	94	5	1
Desnaturação	94	30s	30
Amplificação	56	45s	
Extensão	72	1	
Extensão final	72	7	1
Armazenamento	4	∞	∞

Os *amplicons* que apresentaram o fragmento de 340pb foram submetidos à técnica de PCR/RFLP. Para a digestão enzimática foram utilizados 25µL de solução, que continham água Mili-Q, 1X de tampão da enzima (Promega®), 1U de *MspI* e 10µL de *amplicon*. Posteriormente, as amostras foram submetidas à digestão enzimática por 12h à 37°C. Para a visualização dos fragmentos digeridos, foram utilizadas as mesmas condições de eletroforese anteriormente descritas.

Os *primers* utilizados amplificam um fragmento de 340pb referente ao genótipo homozigoto T/T do gene *CYP1A1*, o qual não sofre ação da enzima de restrição *MspI*, originando uma única banda de 340pb. O genótipo homozigoto C/C possui sítios para a enzima de restrição em ambos os alelos, gerando dois fragmentos de 200pb e 140pb. O genótipo heterozigoto T/C corresponde às três bandas de 340, 200 e 140pb, onde apenas um dos alelos é clivado (Figura 4).

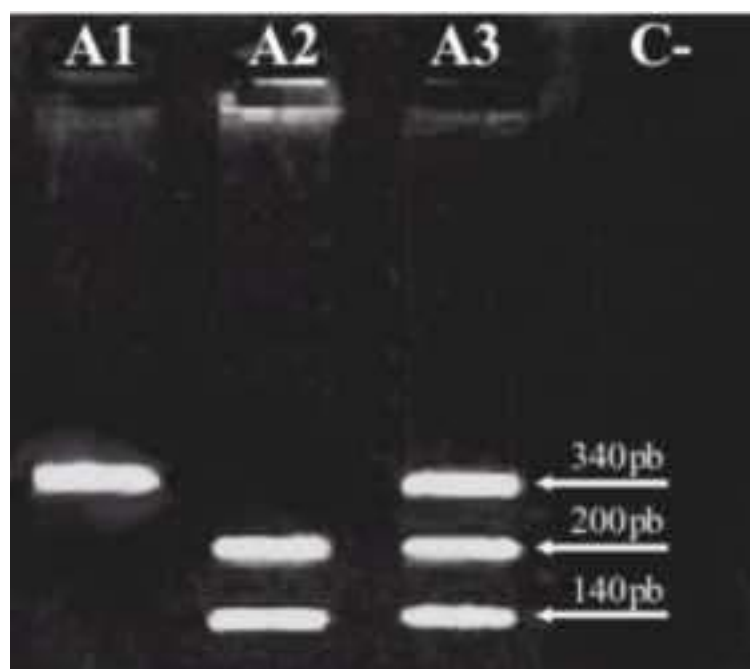


Figura 4. Gel de Agarose a 1.5% indicando o resultado da genotipagem do gene *CYP1A1m1*. A1: homozigoto T/T; A2: homozigoto C/C; A3: heterozigotos T/C; C-: Controle negativo.

3.5. Análise estatística e determinação da sobrevida

Os dados da genotipagem, dos casos e controles, foram tabulados em planilhas do *software* Excel® (2003). A avaliação das frequências alélicas e genotípicas das populações casos e controle, o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e a sua diferenciação gênica e genotípica foi realizada com o auxílio do *software* BioEstat® (versão 3.0). O teste do χ^2 de homogeneidade foi utilizado na comparação entre os dados sócio-demográficos (idade, sexo, hábitos tabagista e etilista). O teste foi realizado em tabelas de contingência 2x2 e 3x2. Adicionalmente, pode-se avaliar o risco relativo entre o polimorfismo de CYP1A1m1 e o câncer da laringe pelo teste de *Odds Ratio*, com intervalo de confiança de 95%. Para verificar a associação entre o genótipo e a idade do paciente no diagnóstico da doença, foi utilizado o teste de Tendência, com o auxílio do *software* BioEstat® 3.0. A sobrevida também foi calculada de acordo com os genótipos dos pacientes, para isso foi utilizado o método da Tábua de Vida Atuarial e posteriormente o teste de *logrank* utilizando o *software* GrahPad Prism® (Versão 4.0).

4. Resultados

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

Tabela IV. Distribuição dos dados sócios demográficos, quanto à idade e sexo, dos pacientes caso e controle.

<i>CYP1A1m1</i>	Caso n (%)	Controle n (%)	χ^2	GL	<i>p</i>
Idade (anos)					
< 40	2 (3,2)	1 (2,0)	2,49	2	0,28
40 – 60	32 (52,4)	31 (63,3)			
> 60	28 (44,4)	17 (34,7)			
Sexo					
Feminino	13 (22,2)	7 (14,3)	2,09	1	0,20
Masculino	49 (77,8)	42 (85,7)			
Total	62 (100,0)	49 (100,0)			

As frequências alélicas do gene *CYP1A1* para os alelos T e C foram de 58,9% e 41,1% para os pacientes com carcinomas laríngeos, e de 56,1% e 43,9% para o grupo controle, respectivamente. Pelo teste do χ^2 , a diferença alélica entre as populações não se mostrou significativa, tendo $p = 0,79$ ($\chi^2 = 0,16$; GL= 1 e IC= 95%). A distribuição das respectivas frequências encontra-se na Tabela V.

Tabela V. Distribuição das frequências alélicas entre as populações caso e controle.

<i>CYP1A1m1</i>	Caso %	Controle %	χ^2	GL	<i>p</i>
T	58,9	56,1	0,16	1	0,79
C	41,1	43,9			
Total	100,0	100,0			

De acordo com o teste de Hardy-Weinberg observou-se que as populações não se encontram em equilíbrio para a variante *m1* do gene *CYP1A1*. Ao ser aplicado o teste de χ^2 , a hipótese de nulidade foi rejeitada, pois $p > 0,05$ ($\chi^2 = 0,19$; GL = 2; IC = 95%). A distribuição das frequências genótípicas observadas e esperadas encontra-se na Tabela VI.

Tabela VI. Distribuição das frequências genótípicas entre as populações caso e controle.

Genótipo	Caso		Controle		χ^2	GL	<i>p</i>
	Esperados	Observados	Esperados	Observados			
T/T	21,5	20	15,4	14	0,19	2	0,90
T/C	30,0	33	24,1	27			
C/C	10,5	9	9,4	8			
Total		62		49			

Para verificar se a presença dos genótipos T/T, T/C e C/C possui relação com o risco do desenvolvimento do câncer laríngeo, foi aplicado o teste *Odds Ratio* (Tabela VII). Adicionalmente, foram associados aos genótipos, as variáveis sexo (Tabelas VIII e IX), tabagismo (Tabela X) e etilismo (Tabela XI). De acordo com o teste, o perfil genotípico não apresentou risco entre os pacientes com câncer da laringe, nem mesmo associados às variáveis sexo, etilismo e tabagismo.

Tabela VII. Resultado do teste de *Odds Ratio* para a variante *CYP1A1m1*.

Genótipo	Caso		Controle		OR	IC 95%	<i>p</i>
	GR	GNR	GR	GNR			
T/C	33	20	27	14	0,86	0,36 – 2,00	0,86
C/C	9	20	8	14	0,79	0,24 – 2,54	0,92
(T/C + C/C)	42	20	35	14	0,08	0,37 – 1,90	0,83

Legenda: GR = genótipo considerado de risco; GNR = genótipo não considerado de risco.

Tabela VIII. Resultado do teste de *Odds Ratio* para a variante *CYP1A1m1*, em homens.

Genótipos	OR	IC 95%	<i>p</i>
T/T x T/C	1,04	0,31 – 3,44	0,81
T/C x C/C	0,64	0,17 – 2,35	0,74
T/C x C/C	0,62	0,23 – 1,60	0,45

Tabela IX. Resultado do teste de *Odds Ratio* para a variante CYP1A1m1, em mulheres.

Genótipos	OR	IC 95%	p
T/T x T/C	0,60	N/A	0,71
T/C x C/C	2,00	N/A	0,81
T/C x C/C	3,33	N/A	0,52

Tabela X. Resultado do teste de *Odds Ratio* para a variante CYP1A1m1, em tabagistas.

Genótipos	OR	IC 95%	p
T/T x T/C	0,93	0,29 – 2,90	0,86
T/C x C/C	0,96	0,29 – 3,18	0,80
T/C x C/C	1,03	0,43 – 2,48	0,88

Tabela XI. Resultado do teste de *Odds Ratio* para a variante CYP1A1m1, em etilistas.

Genótipos	OR	IC 95%	p
T/T x T/C	0,78	0,24 – 2,54	0,91
T/C x C/C	0,59	0,16 – 2,18	0,64
T/C x C/C	0,75	0,24 – 2,34	0,84

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

Tabela XII. Distribuição das frequências genotípicas em relação à idade em intervalos de tempo.

Genótipo	Idade (anos)			A	X ²	p
	30 - 49	50 - 69	70 - 89			
T/T x T/C	3	5	1	-1,14	0,56	0,45
	6	23	4			
T/T x C/C	3	5	1	-0,75	0,17	0,67
	7	8	5			
T/C x C/C	6	23	4	0,49	0,04	0,82
	7	8	5			

A Tábua de Vida Atuarial permitiu calcular a sobrevida dos pacientes, ao final de 72 meses, de acordo com os respectivos genótipos. Para os pacientes homozigotos C/C (n=9), T/T (n=20) e heterozigotos T/C (n=33) as sobrevidas foram de 77,8%, 58,6% e 67,9%, respectivamente (Tabela XIII). As sobrevidas dos pacientes de acordo com os genótipos

podem ser melhores observadas nas Figuras 5, 6 e 7. Ao aplicar o teste de *logrank* entre os diferentes genótipos, não foram obtidas diferenças significativas entre as sobrevidas.

Tabela XIII. Distribuição das sobrevidas dos pacientes com câncer da laringe de acordo com o genótipo.

Genótipos	Nº de pacientes	Sobrevida (%)
T/T	20	77,8
T/C	33	58,6
C/C	9	67,9

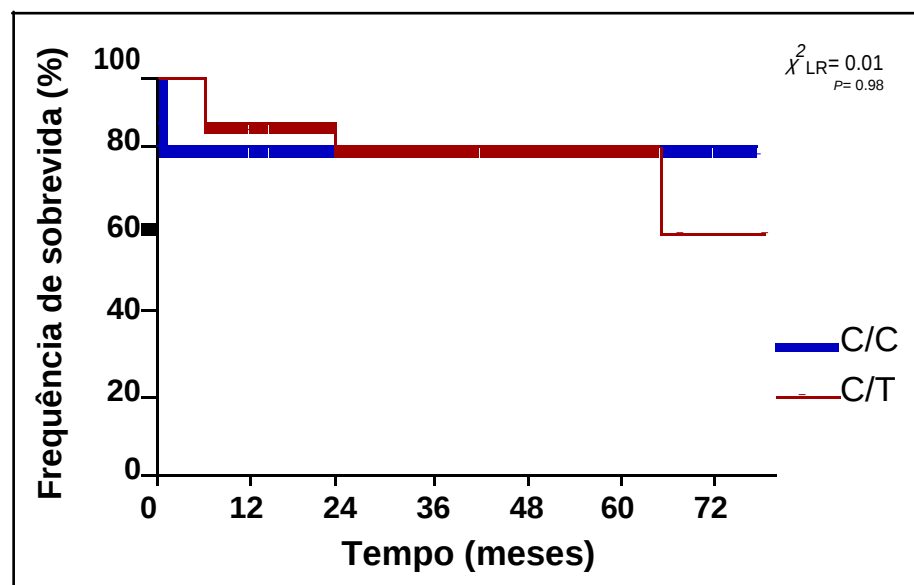


Figura 5. Gráfico de Sobrevivência dos pacientes C/C x C/T.

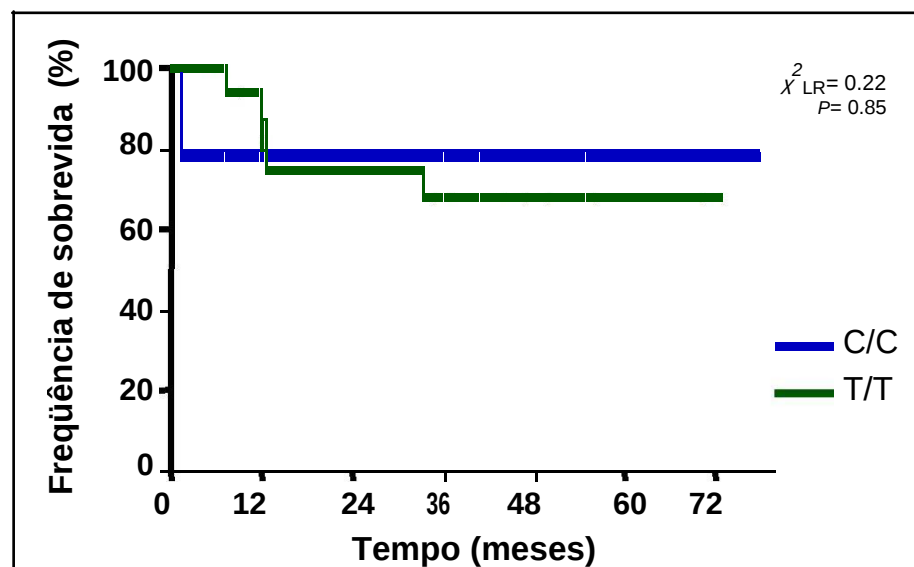


Figura 6. Gráfico de Sobrevivência dos pacientes C/C x T/T.

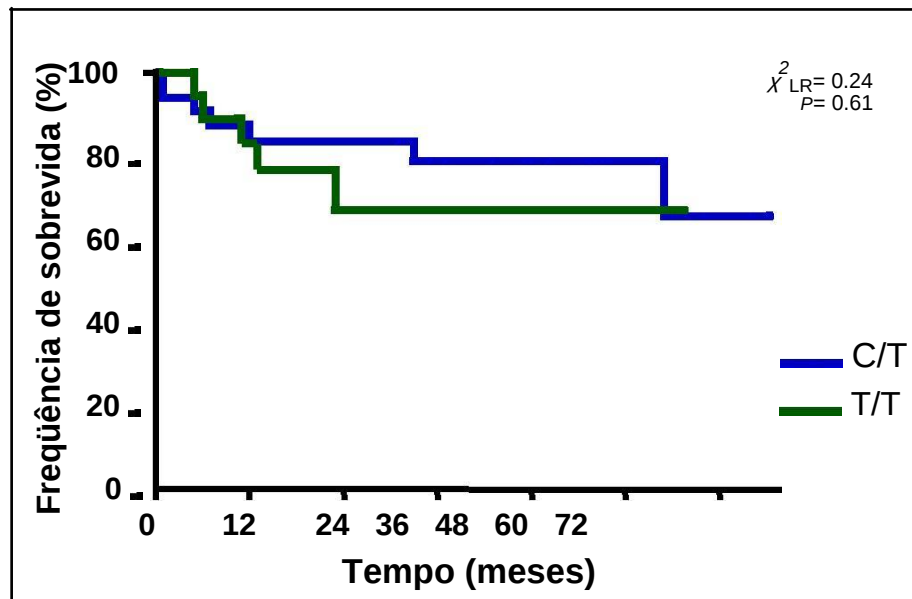


Figura 7. Gráfico de Sobrevivência dos pacientes C/T x T/T.

5. Discussão

Diversos estudos descritos na literatura sugerem que fatores exógenos do indivíduo, incluindo os polimorfismos genéticos podem conferir diferenças individuais na ocorrência do câncer (Conforti-Froes *et al.*, 1998; Bell *et al.*, 1993; Antilla *et al.*, 1991). Segundo Olshan *et al.* (2000) estudos que avaliem pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço se constituem em um modelo ideal para estudar interações entre genótipo e exposição ambiental. Enzimas envolvidas na metabolização de xenobióticos, tanto na ativação (Fase I) quanto na detoxificação (Fase II) têm recebido recentemente grande atenção como possíveis fatores de suscetibilidade individual a uma variedade de neoplasias.

Variantes alélicas polimórficas dos genes que codificam estas enzimas podem alterar a expressão ou a função enzimática, levando a um aumento ou a uma diminuição na ativação e detoxificação de carcinógenos. Tais enzimas fazem parte de superfamílias que possuem um importante papel na metabolização de um grande número de compostos, como os encontrados na dieta e na fumaça do cigarro, atuando, conseqüentemente, na manutenção da integridade genômica (Geisler & Olshan, 2001).

Segundo Bartsch (2000), desde que muitos compostos requerem ativação metabólica antes de se ligarem ao DNA, é provável que variações individuais no metabolismo influenciem na formação de aductos no material genético, podendo levar a um processo carcinogênico. Diversos estudos têm demonstrado associação entre variantes alélicas polimórficas em genes do metabolismo e exposição ambiental no risco de desenvolver câncer de pulmão, bexiga, cavidade bucal, dentre outros, principalmente em indivíduos fumantes (Au *et al.*, 2001).

No presente estudo foram estudados os genótipos de CYP1A1m1 em 62 pacientes com carcinomas espinocelular da laringe e em 49 controles. A comparação das frequências obtidas entre os dois grupos indicou ausência de associação positiva ou negativa com a

suscetibilidade ao câncer laríngeo, como indicado na Tabela VII.

O gene *CYP1A1* codifica uma enzima chave no metabolismo de agentes xenobióticos considerada um potencial marcador de suscetibilidade a vários tipos de cânceres, especialmente por estar envolvida com a biotransformação de PAHs, como o benzo(a)pireno, um potente carcinógeno presente na fumaça do cigarro (Vineis *et al.*, 1995). Todos os estudos de associação envolvendo o gene *CYP1A1m1*, descritos a seguir, incluindo o presente trabalho, adotam como genótipo considerado de risco o que contém, em heterozigose ou homozigose, os genótipos *CYP1A1* (T/C) ou *CYP1A1* (C/C), que são comparados em relação à frequência do genótipo homozigoto para o genótipo *CYP1A1* (T/T).

Sato *et al.* (2000) encontraram associação entre este gene (variante *m1*) e o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço, o que difere do observado por Matthias *et al.* (1998) e Marques *et al.* (2006) que, assim como os dados deste trabalho, não correlacionaram o gene *CYP1A1* ao câncer de laringe, apesar dos genótipos considerados de risco terem sido mais frequentes no grupo dos pacientes em relação ao dos controles (Tabela VII).

A associação do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço com o tabaco e o álcool tem sido reconhecida há muitos anos e dados moleculares fornecem evidências de que os carcinógenos encontrados nestas substâncias têm um papel causal importante na transformação para a malignidade. Os cânceres do assoalho bucal, laringe e hipofaringe raramente se desenvolvem em indivíduos não-fumantes, onde a borda lateral da língua é um sitio mais comum de neoplasia. Os não fumantes, em geral, apresentam neoplasmas da cabeça e do pescoço precocemente ou tardiamente se comparados com o grupo dos fumantes (Koch, 1999).

Pacientes com neoplasias primárias, que consomem o álcool e o tabaco intensamente, podem apresentar múltiplas lesões pré-cancerosas e cancerosas, processo conhecido como “cancerização de campo” (Slaugther, 1953), no trato aerodigestivo superior. Em geral, um

segundo câncer se desenvolve em indivíduos fumantes e não fumantes com frequência semelhante, mas um segundo CEC primário de cabeça e pescoço é muito mais comum em indivíduos tabagistas e etilistas obesos (Koch, 1999).

A não confirmação de associações também pode resultar de uma heterogeneidade de risco entre populações. Enquanto Kawajiri *et al.* (1990), Hayashi *et al.* (1991) e Nakachi *et al.* (1995) demonstraram correlação positiva entre os alelos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2B* e a susceptibilidade ao câncer de pulmão em populações japonesas, Hirvonen *et al.* (1992), Tefré *et al.* (1992) e Shields *et al.* (1993) não verificaram esta correlação em populações caucasóides ou afroamericanas.

Posteriormente, Xu *et al.* (1996) demonstraram associação entre o polimorfismo *CYP1A1m1* e câncer de pulmão em uma população norteamericana, concluindo que tal polimorfismo influencia na susceptibilidade à doença em caucasóides e japoneses da mesma forma. Estes dados levantam a questão sobre o verdadeiro impacto da mutação A4889→G, que caracteriza o alelo *CYP1A1*2B* (variante *m2*), sobre a função enzimática. Nakachi *et al.* (1991), Hayashi *et al.* (1991) e Kiyohara *et al.* (1996) admitem que a mutação afeta a atividade catalítica da enzima, enquanto Persson *et al.* (1997) postulam que a troca do aminoácido leucina por valina nesta região não interfere na ligação da enzima com o substrato, pois não muda a conformação da molécula.

Georgiadis *et al.* (2005) demonstraram a existência de uma indução diferencial de *CYP1A1*2A* (variante *m1*) e *CYP1A1*2B* (variante *m2*) mesmo em não fumantes quando estes são expostos à fumaça do tabaco presente no ambiente, bem como a elevação nos níveis de marcadores de dano genético nos portadores destas variantes. Embora a grande maioria dos estudos não demonstre associação deste polimorfismo isolado com o câncer de cabeça e pescoço, os genes do biometabolismo não agem isoladamente e a avaliação de múltiplos genes interagindo entre si e com a exposição aos carcinógenos pode ser necessária para

compreender este fenômeno.

Várias informações indicam um modelo poligênico para a susceptibilidade ao câncer, variando de alguns poucos alelos que conferem risco moderado até um número maior de alelos que conferem um pequeno aumento no risco. Estudos de ligação baseados em famílias têm sido a base para muitos sucessos no mapeamento de doenças Mendelianas, mas esta abordagem está praticamente limitada aos genes com alelos raros e de alta penetrância, não apresentando poder informativo capaz de detectar alelos que conferem risco moderado que, segundo Pharoah (2004), são normais nas doenças complexas.

Em nosso estudo, todos os pacientes do grupo caso declaram ser tabagistas, sendo a maioria heterozigotos T/C (53,2%) e homozigotos C/C (32,3%). Dos 36 pacientes etilistas, a maioria também são heterozigotos T/C (25,9%) e homozigotos C/C (19,4%). Tais dados, apesar de estarem associados ao alelo mutante C, são insuficientes para fornecer informações consistentes sobre a relação do tabaco com o desenvolvimento do câncer de laringe nos genótipos avaliados.

A relação entre o desenvolvimento da doença e a idade também não apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela XII). O mesmo foi observado nas variáveis sexo e sobrevida relativa. Todas essas associações podem ser observadas nas Tabelas VIII, IX e XIII e ainda, nas Figuras 5, 6 e 7.

A relação entre o genótipo e o fenótipo originado de *CYP1A1m1* ainda não é suficientemente compreendida. Assim, riscos associados com genótipos específicos avaliados neste estudo podem não ser detectados devido à atuação de outros fatores que influenciam a expressão das enzimas metabolizadoras de carcinógenos. Há evidências de que os níveis de metilação da região promotora de *CYP1A1* estão aumentados de forma significativa nos tumores de próstata (Jerónimo *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2001), fígado e mama (Esteller *et al.*, 1998). Esta alteração epigenética provavelmente, interfere na expressão do gene nestes

órgãos.

A distribuição e disposição dos carcinógenos da fumaça do cigarro na laringe ainda não foram bem estudadas e as vias específicas de ativação e detoxificação dos carcinógenos nos tecidos da cabeça e do pescoço também ainda não foram bem caracterizadas. A análise genotípica pode trazer informações sobre o papel das vias metabólicas de carcinógenos específicos. Entretanto, devido às divergências encontradas entre os diferentes estudos envolvendo estes genes do biometabolismo, estudos futuros devem ser intensificados objetivando obter informações mais consistentes, que possibilitem um melhor entendimento sobre as interações genético-ambientais em cânceres de cabeça e pescoço.

6. Conclusões

No presente estudo foram encontradas frequências alélicas de 58,9% e 56,1%, para o alelo selvagem T e 41,1% e 43,9% para o alelo mutante C, em casos e controles, respectivamente. Tais dados encontram-se homogeneamente distribuídas entre pacientes e controles, bem como entre os sexos masculino e feminino. Para as frequências genotípicas da variante *CYP1A1m1* as amostras estudadas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Não foram encontradas associações estatisticamente significativas das variantes alélicas e genotípicas *CYP1A1m1* com o carcinoma espinocelular da laringe. A ausência desta verificação, no entanto, não exclui completamente a possibilidade deste gene de exercer alguma influência no desenvolvimento do câncer laríngeo, tendo em vista que haplótipos envolvendo os diversos genes do biometabolismo podem contribuir de forma diferenciada para a carcinogênese.

A relação entre o desenvolvimento da doença e a idade também não apresentou diferença estatisticamente significativa. O mesmo foi observado nas variáveis sexo e hábitos tabagista e etilista. As taxas de sobrevida relativa observadas sugerem que não há diferença entre o perfil alélico e genotípico na população estudada.

Além de um acréscimo no tamanho amostral, para aumentar o poder de verificação estatística, estudos funcionais envolvendo as enzimas codificadas por este gene também devem ser realizados para a obtenção de resultados mais definitivos no estudo de associação do gene *CYP1A1* com o desenvolvimento da carcinogênese espinocelular da laringe.

CAPÍTULO IV. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS *GSTM1* (nulo) E *GSTT1* (nulo) ASSOCIADOS À SUSCETIBILIDADE GENÉTICA DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LARINGE.

Resumo

Polimorfismos em genes que codificam enzimas de fase II podem alterar sua expressão ou função, modificando o biometabolismo de compostos carcinógenos. Os genes *GSTM1* e *GSTT1*, codificam enzimas de mesmo nome, são fundamentais no processo de detoxificação de HAPs e de diversas moléculas endógenas, facilitando sua excreção. O objetivo principal do presente estudo foi de estabelecer os perfis genotípicos de *GSTM1* e *GSTT1* nulos em grupos caso-controle investigando os graus de suscetibilidade dos pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular (CEC) da laringe pelo Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge, ACCG, segundo hábitos tabagistas e etilistas. Ao total foram avaliadas 112 amostras, sendo 63 provenientes de pacientes com CEC da laringe e 49 de pacientes do grupo controle. Foram observadas frequências genotípicas positivas para os genes *GSTM1* e *GSTT1* de 41,3% (26/63) e 54,0% (34/63) para os pacientes com carcinomas laríngeos, e de 49,0% (24/49) e 51,0% (25/49) para o grupo controle, respectivamente. Para a avaliação do genótipo *GSTM1* (nulo) e *GSTT1* (nulo), os pacientes do grupo caso apresentaram 58,7% (37/63) e 46,0% (29/63) de genótipos nulos para *GSTM1* e *GSTT1*, enquanto que os pacientes do grupo controle apresentaram 51,0% (25/49) e 40,8% (20/49). Não foram encontradas associações estatisticamente significativas das variantes genotípicas *GSTM1* (nulo) e *GSTT1* (nulo) com o carcinoma espinocelular da laringe.

Palavras-chave: *GSTM1*, *GSTT1*, laringe e biometabolismo.

Abstract

*Polymorphisms in genes that encode fase II enzymes can change expression or function, modifying the biometabolism of carcinogens compound. *GSTM1* and *GSTT1* genes, encode enzymes with the same name, are essential in the detoxification of HPAs and various endogenous molecules, making the excretion easy. The main objective of this study was establish the profiles of *GSTM1* null and *GSTT1* genotypes in case-control groups investigating the suscetibility degrees of patients who were diagnosed with larynx squamous cell carcinoma (SCC) by the Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Jorge Araujo, ACCG, according to alcoholism and smoking habits. In total 112 samples were evaluated, 63 from patients with SCC of the larynx and 49 patients in the control group. Positive genotypic frequencies were observed for the genes *GSTM1* and *GSTT1* of 41.3% (26/63) and 54.0% (34/63) to the patients with laryngeal cancer, and 49.0% (24/49) and 51.0% (25/49) for the control group, respectively. For the assessment of genotype *GSTM1* (null) and *GSTT1* (null), the patients if the case group had 58.7% (37/63) and 46.0% (29/63) of genotypes for *GSTM1* null and *GSTT1*, while the patients in the control group showed 51.0% (25/49) and 40.8% (20/49). There were no statistically significance in associations of genotypic variants *GSTM1* (null) and *GSTT1* (null) with the larynx squamous cell carcinoma.*

Keywords: *GSTM1*, *GSTT1*, larynx and biometabolism.

1. Introdução

As neoplasias de cabeça e pescoço são responsáveis por uma grande incidência de óbitos em todo o mundo, constituindo a sexta causa de morte por câncer (Walker *et al.*, 2003). O carcinoma espinocelular é o tipo histológico mais freqüente, presente em mais de 90% dos casos (Casiglia & Woo, 2004; Ahmed *et al.*, 2000), tendo como principais fatores etiológicos o consumo de álcool e tabaco (Chang *et al.*, 2004). A fumaça do cigarro, composta por mais de 4000 substâncias, possui pelo menos 40 são carcinogênicas, iniciadoras ou promotoras de tumores em animais (Maser, 1997). A concentração dessas substâncias no organismo depende da atuação de enzimas envolvidas no biometabolismo, que compreende a ativação (Fase I) e detoxificação (Fase II) de compostos químicos (Maser, 1997; Anwar *et al.*, 1996). Polimorfismos em genes que codificam essas enzimas podem alterar sua expressão ou função, modificando o biometabolismo de compostos carcinógenos (Olshan *et al.*, 2000).

1.1. Glutathione-S-transferase (GST)

Um estudo realizado por Buetler & Eaton (1992) estima que existam pelo menos 20 GSTs na espécie humana, estando estas presentes no citoplasma microssomal e mitocôndrias de todas as células eucarióticas e procarióticas sendo expressas em altos níveis no fígado. Hayes *et al.*, (2005) descreveram que as GSTs do citoplasma dos mamíferos são todas diméricas com subunidades de 199 a 244 aminoácidos. Uma característica da GST é a sua combinação com a glutathione reduzida (GSH), que após combinada, apresenta maior especificidade para um segundo substrato (Cascorbi, 2006; Evans *et al.*, 2004).

A GSH, formada pelos aminoácidos glicina, cisteína e glutamato, é o co-fator para a GST, tendo sua capacidade redutora da GSH determinada pelo grupamento SH, presente na cisteína. Considerada a principal enzima detoxificante da fase II, a GST desempenha um papel fisiológico na iniciação da detoxificação de potenciais agentes alquilantes, incluindo

compostos farmacologicamente ativos, gerados intracelularmente ou encontrados na forma de xenobióticos (Figura 1). A reação de conjugação do grupo sulfidrílico da glutatona com grupos eletrofílicos de compostos xenobióticos, catalisada pela GST, torna os produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a excreção (To-Figueras *et al.*, 2002).

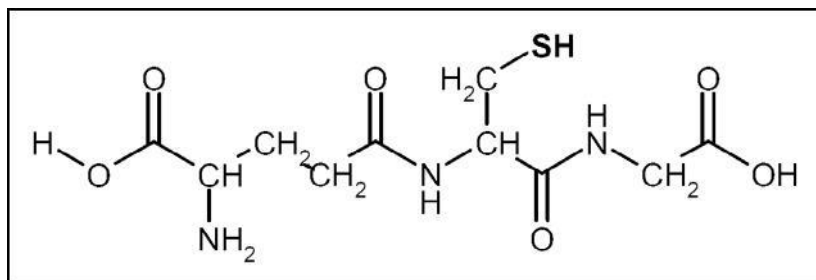


Figura 1. Estrutura bioquímica do Glutatião reduzido (GSH) [γ – Glutamilocisteiniloglicina].

Diferentes compostos, incluindo xenobióticos tóxicos e produtos reativos de processos intracelulares, como peroxidação de lipídios, atuam como substratos para a GST. Os substratos eletrofílicos normalmente compartilham característica de moléculas hidrofóbicas e estruturalmente são bastante diversos. Além disso, as GSTs têm um importante papel no metabolismo do estrogênio, agindo na metabolização de esteróides e radicais livres que podem indiretamente ser produzidos pelo metabolismo do estrogênio, reduzindo sua genotoxicidade (Van Der Aar, 1996)

Sete classes distintas foram identificadas, diferenciadas pelas seqüências de aminoácidos: Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega e Zeta, sendo a última classe ligada à membrana. Dentre as proteínas citosólicas as *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*, são as que possuem maior correlação com a suscetibilidade ao câncer (Ferreira, 2005). Tanto os xenobióticos, quanto diversas substâncias endógenas são conjugadas, por reações de sulfatação, acetilação, metilação, além de conjugações com GSH e aminoácidos, com diferentes substâncias. A conjugação de agentes tóxicos com a GSH é catalisada, na sua fase inicial, pela GST que atua

na Fase II da biotransformação, prevenindo danos à membrana celular e outras macromoléculas (Dybing *et al.*, 2002; Malmezat *et al.*, 2000).

Dentre estes agentes tóxicos, o benzopireno, principal carcinógeno da fumaça do cigarro, e o etanol são impedidos de se ligar a macromoléculas, como o DNA (Hayes & Pulford, 1995). Sua ação detoxificante é importante tanto na proteção contra o estresse oxidativo, como na prevenção do carcinoma de diversos sítios anatômicos (Babbitt, 2000). Matthias *et al.* (1999), em um estudo de meta-análise, relaciona o polimorfismo genético dessas enzimas, com o aumento da suscetibilidade a diversas neoplasias.

1.1.1. Os genes *GSTM1* e *GSTT1*

Na classe Mu, pelo menos 5 genes distintos para *GSTM* foram clonados e seqüenciados: *GSTM1*, *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* e *GSTM5*. Todos os genes foram mapeados no braço curto do cromossomo 1. Dentre os genes desta família encontra-se o gene *GSTM1*, situado no *locus* 1p13.1, que é polimórfico possuindo dois alelos funcionais (*GSTM1**A e *GSTM1**B), 8 éxons e um alelo com atividade nula por deleção (*GSTM1**0) [Figura 2]. Os alelos funcionais possuem a mesma eficácia de detoxificação. A proteína *GSTM1A* contém uma lisina na posição 172, enquanto a proteína *GSTM1B* contém asparagina nesta posição (Xu *et al.*, 1998).

Indivíduos com pelo menos um dos dois alelos funcionais para *GSTM1* (*GSTM1**A e *GSTM1**B) são chamados de *GSTM1* presente e apresentam a mesma eficiência metabólica. Já os indivíduos portadores da deleção deste gene são designados *GSTM1* nulo (Gattás *et al.*, 2004), pois a deleção freqüentemente está presente em ambos os alelos resultando no genótipo homozigoto nulo. O alelo nulo *GSTM1* resulta de uma recombinação homóloga envolvendo repetições de 4,2kb em 5' e 3' (Xu *et al.*, 1998), que ocasiona uma deleção de

16kb contendo todo o gene *GSTM1*. A excisão desse gene é precisa, deixando os genes adjacentes intactos.

Estudos mostram que a enzima *GSTM1* ativa é responsável pela detoxificação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) e solventes como o benzeno (Strange *et al.*, 1998). Indivíduos *GSTM1* nulos exibem ausência da atividade enzimática e sugere-se que eles possuam um risco aumentado para efeitos de uma grande variedade de carcinógenos ambientais (Millikan *et al.*, 2000).

O genótipo *GSTM1* nulo foi positivamente associado com níveis altos de adutos no DNA, sugerindo que este possa influenciar na carcinogênese. Apresenta uma frequência acima de 50% entre caucasóides, chineses e indianos (Board *et al.*, 1990). Em alguns estudos realizados em populações brasileiras as frequências do genótipo nulo descritas foram de 55% (Arruda *et al.*, 1998), 60,2% (Gattás & Soares-Vieira, 2000), 48,9% (Rossini *et al.*, 2002) e 55,4% (Gattás *et al.*, 2004). Devido à alta frequência do genótipo nulo na maioria das populações analisadas, que varia entre os grupos étnicos, a distribuição alélica deste gene tem sido muito estudada.

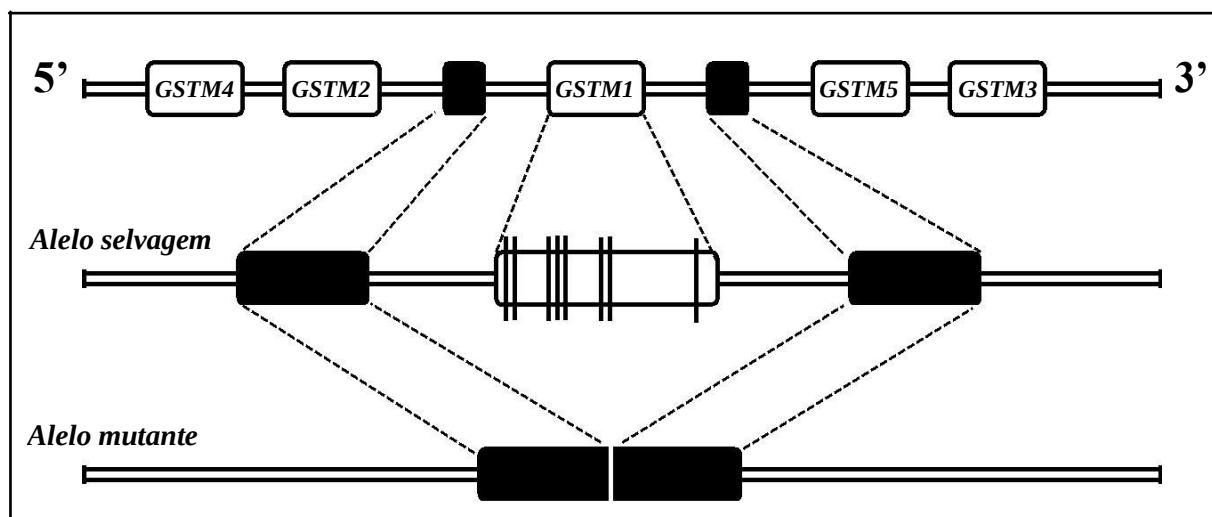


Figura 2. Desenho esquemático mostrando as posições dos genes da classe Mu de GST, no cromossomo 1, e a representação do alelo selvagem e mutante do gene *GSTM1*.

A subfamília da *GST* da classe Theta, consiste em 2 genes, *GSTT1* e *GSTT2*, localizados no cromossomo 22q11.2 e separados por aproximadamente 50kb. Ambos os genes possuem 5 éxons com divisões idênticas de íntron/éxon, mas possuem apenas 55% da identidade do aa. O gene *GSTT1* apresenta polimorfismo nulo, o que resulta na falta das proteínas ativas. Estudos mostram que 20 a 60% dos indivíduos não expressam esta enzima, devido à deleção do gene. Análises revelaram 2 regiões flanqueadoras (HA3 e HA5) contendo duas repetições idênticas de 403pb, que foram identificadas como regiões deleção/junção do *GSTT1* nulo (Sprenger *et al.* 2000).

A atividade de sua enzima está relacionada ao processo de detoxificação em pequenos hidrocarbonetos reativos, como o óxido de etileno (Strange *et al.*, 1999). A deleção em homozigose para o *GSTM1* é observada entre 20 a 70% em diferentes populações, enquanto que para o gene *GSTT1* esta variação é de 11 a 38% (Arruda *et al.*, 1998). A Figura 3 demonstra a representação esquemática do *GSTT1*, no cromossomo 22.

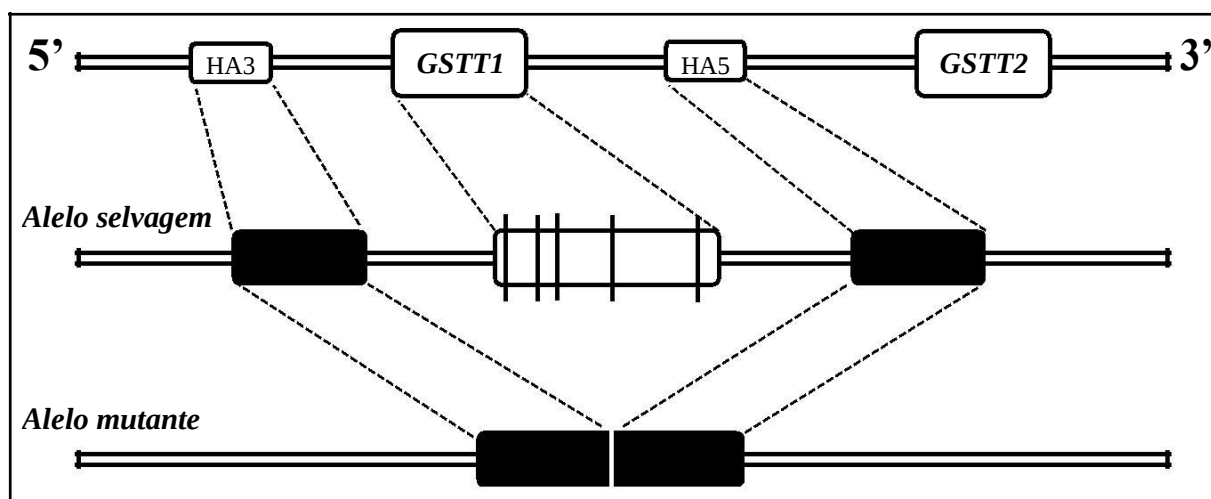


Figura 3. Desenho esquemático mostrando as posições dos genes da classe Teta de *GST*, no cromossomo 22, e a representação do alelo selvagem e mutante do gene *GSTT1*.

Em humanos, a conjugação do halometano dependente de Glutathione é polimórfica, com 60% da população classificada como *conjugadores* e 40% como não *conjugadores*. Pemble *et al.* (1994) demonstraram que o gene *GSTT1* está ausente em 38% da população. A

presença ou ausência do gene é coincidente com o fenótipo conjugador (*GSTT1* presente) e não conjugador (*GSTT1* nulo). A ausência da enzima implica na não detoxificação de uma série de compostos, como os halometanos sintéticos e outros químicos industriais.

As frequências do *GSTT1* nulo descritas na literatura são menores do que as descritas para o *GSTM1* nulo e há uma baixa variação entre diferentes grupos étnicos. Há indicações de que a única exceção ocorra em asiáticos, que apresentam uma frequência maior de genótipo *GSTT1* nulo, variando de 46 a 58% em chineses e de 42 a 46% em coreanos (Geisler & Olshan, 2001). Em um estudo na população brasileira, as frequências descritas foram de 26,3% em negros, 22,3% em brancos e 17,2% em mulatos (Gattás *et al.*, 2004). Outros estudos realizados na população brasileira, mas somente em caucasóides apontam frequências de 18,5% (Arruda *et al.*, 1998) e 25,1% (Rossini *et al.*, 2002).

Cheng *et al.* (1999) descreveram um método para a caracterização simultânea dos alelos *GSTM1* e *GSTT1* e estudaram os genótipos em afro-descendentes e caucasóides. A frequência do genótipo nulo para o *GSTM1* foi maior em brancos e para *GSTT1* nulo foi maior em afro-descendentes. A frequência observada do genótipo *GSTM1/T1* nulos não foi significativamente diferente do previsto, assumindo que os dois polimorfismos são independentes.

Genótipos *GSTT1/M1* nulos estão associados a um aumento de risco de câncer de bexiga, pulmão, colorretal e de cabeça e pescoço (Cotton *et al.*, 2000; Engel *et al.*, 2002); assim, como a outros tipos de câncer, pois a ausência dessas enzimas poderia reduzir a capacidade de um organismo de detoxificar metabólitos reativos. Além disso, os níveis de adutos de DNA, trocas entre cromátides-irmãs e mutações genéticas somáticas podem ser maiores em portadores dos genótipos *GSTM1/GSTT1* nulos (Rebbeck, 1997). Abdel-Rahman *et al.* (1996) observaram que as frequências da deleção em homozigose do gene *GSTM1*

variou de 20 a 70% nas diferentes populações investigadas, enquanto para o *GSTT1*, essa taxa foi de 11 a 38%.

A deficiência do gene *GSTM1* tem sido correlacionada a outras doenças associadas ao hábito tabagista, como arteriosclerose (Olshan *et al.*, 2003) e enfisema pulmonar (Cascorbi, 2006). Segundo Kadlubar (2001) o impacto de um único polimorfismo genético pode ser pequeno ou inexistente, mas a análise de interações entre várias variantes pode evidenciar uma suscetibilidade. Como exemplo destas interações, Autrup (2000), Geisler & Olshan (2001) e Gronau *et al.* (2003) sugeriram uma maior suscetibilidade para os indivíduos que possuem uma combinação de genótipos considerados de risco, como presença do alelo *CYP1A1**2A e *GSTM1/GSTT1* nulos.

Olshan *et al.*, (2000) demonstraram um aumento no risco de desenvolvimento de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, incluindo laringe, para indivíduos portadores de deleções do gene *GSTT1*. Naccarati *et al.*, (2006) encontraram associação entre danos genotóxicos e combinações genotípicas para os genes *EPHX1* (epóxido hidrolase) e *GSTM1/GSTT1* em população européia. Os mesmos autores também associaram maior formação de adutos no DNA em indivíduos com combinações dos genótipos *CYP1A1**2A e *GSTM1* nulo. Entretanto, Hahn *et al.*, (2002) não encontraram associação entre variantes dos genes *CYP1A1*, *GSTM1* e *NAT2* e desenvolvimento de cânceres bucais, sugerindo que a combinação destas não estaria relacionada a este câncer.

Como as enzimas codificadas por esses genes realizam um importante passo na detoxificação de xenobióticos, torna-se claro que a ausência de suas atividades pode levar a um aumento na toxicidade e na suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores malignos (Cascorbi, 2006). Diversos estudos detectaram uma frequência elevada do genótipo nulo para este gene em indivíduos portadores de diferentes neoplasias (Matthias *et al.*, 1999).

Segundo Shastri (2006), variações inter-individuais na suscetibilidade e na resposta ao tratamento de pacientes com câncer se constituem num sério problema. Não existem até o momento biomarcadores que possam predizer qual grupo estará mais suscetível ou que responderá positivamente aos efeitos adversos da presença das drogas no organismo. A identificação de indivíduos mais propensos a acumular mutações poderá, num futuro próximo, conduzir a novas perspectivas para o diagnóstico precoce e a prevenção de determinadas neoplasias.

Compreender os mecanismos envolvidos na suscetibilidade herdada motivará também o desenvolvimento protocolos terapêuticos mais específicos, assim como na prevenção de diversas neoplasias que possuam o cigarro e o etanol, como os principais agentes etiológicos (Gattás 2001; Wunsch e Zago, 2005). Desse modo, a variabilidade individual em genes relacionados aos processos de ativação e detoxificação metabólica parece crucial na suscetibilidade ao câncer de cabeça e pescoço, como o carcinoma espinocelular da laringe.

2. Objetivos

2.1. Geral

Estabelecer os perfis alélicos dos genes *GSTM1* (nulo) e *GSTT1* (nulo) em grupos caso-controle investigando os graus de suscetibilidade dos pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular (CEC) da laringe pelo Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge, ACCG, segundo hábitos tabagistas e etilistas.

2.2. Específicos

Analisar as frequências gênicas e genotípicas dos grupos estudados;

Determinar a provável susceptibilidade do CEC da laringe relacionada ao polimorfismo dos genes *GSTM1* (nulo) e *GSTT1* (nulo);

Determinar a sobrevida dos pacientes portadores dos genótipos *GSTM1* (nulo) e *GSTT1* (nulo);

Confrontar e identificar possíveis associações entre os genótipos *GSTM1* (nulo) e *GSTT1* (nulo) e os fatores de risco (sexo, idade, tabagismo e etilismo) no grupo dos casos;

Elaborar e sugerir um possível critério de prognóstico baseado nos perfis alélicos estudados.

3. Materiais e métodos

3.1. Grupo amostral

Foram avaliadas no total, 112 amostras, das quais 63 pacientes foram diagnosticados com carcinoma espinocelular da laringe e 49 indivíduos controles, que não possuem nenhuma suspeita de câncer nas vias aerodigestivas superiores, selecionados aleatoriamente no banco de amostras do Núcleo de Pesquisas Replicon. A participação na entrevista e a doação das amostras biológicas foram voluntárias, sendo a idade mínima de 15 anos. Os participantes, no momento da entrevista assinaram um termo de anuência (Anexo I), e foram acompanhados, através da observação dos prontuários médicos, por um período mínimo de 5 anos a partir da coleta das amostras para a estimativa das tendências de sobrevida. Todos os pacientes considerados foram diagnosticados com carcinomas da laringe (CID-O: C32). A participação individual teve caráter voluntário para ambos.

3.2. Obtenção das amostras

Foram coletados 10mL de sangue periférico heparinizado, colhidos em tubos *falcon* de 12mL, sendo posteriormente processados a 5000.g r.p.m. durante 15 minutos. A partir dessa etapa, o anel leucocitário foi aspirado e armazenado em microtubos, preservados a -20°C, para posterior análise.

3.3. Extração de DNA

A extração e purificação de DNA das amostras obtidas foram executadas com uso do kit de extração *Wizard® Genomic DNA Purifications Kit* (Promega®), de acordo com o protocolo de extração sugerido pelo fabricante. As amostras extraídas foram rotuladas e armazenadas a -20°C para serem utilizadas posteriormente usadas nas reações de PCR.

3.4. Genotipagem dos *GSTM1* e *GSTT1* pela técnica de PCR Multiplex.

Todas as 112 amostras foram submetidas à PCR em 25 μ L de reação, contendo água Mili-Q, 0,15nmol de cada *primer* alelo-específico (Prodimol®) [Tabela I], 1U de Taq DNA polimerase (Promega®), 1X de STR® *buffer* (Promega®) (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 0,2mM dNTPs e 0.5mM de MgCl₂) e ~100ng de DNA genômico total.

Tabela I. Características gerais dos *primers* utilizados para a avaliação genômica em pacientes com Câncer da Laringe.

Marcador	Seqüência	T.M.	Referência
<i>RH92600</i>	F: 5' TCATATGCAAAACAGCTTCCC 3' R: 5' CTGGTCCTTCAAGCCTGTATG 3'	135pb	
<i>GSTM1</i>	M1F: 5' GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC 3' M1R: 5' GTTGGGCTAAATATACGGTGG 3'	215pb	Abdel-Rahma <i>et al.</i> (1996)
<i>GSTT1</i>	T1F: 5' TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3' T1R: 5' TCACCGGATCATGGCCAGCA 3'	480pb	

T.M.: tamanho molecular.

Para a amplificação dos fragmentos de 135pb (*RH92600*), 215pb (*GSTM1*) e 480pb (*GSTT1*) foi utilizado o protocolo de termociclagem sugerido por Abdel-Rahma *et al.* (1996), com adaptações [Tabela II]. Posteriormente, 10 μ L do produto de PCR com adição de 3 μ L de tampão 1X de corrida (0,05% de azul de bromofenol e xileno cianol, 95% de formamida) foram resolvidos em gel de Agarose a 1,5% em TBE 1X, mediante aplicação de um campo elétrico constante de 10V/cm por 1 hora. Posteriormente, o gel foi submerso em TBE 1X contendo 5 μ L/mL de Brometo de etídeo (EtBr) por aproximadamente 15 minutos e em seguida as imagens foram capturadas em sistema de vídeo-documentação *ImageMasterVDS*® (Amersham Pharmacia Biotech, EUA), para análise da amplificação.

O *primer RH92600* amplifica uma região de microssatélite de 135pb localizado em 6q13, usado como controle endógeno da reação. Os fragmentos de 215 e 480pb foram observados, respectivamente, nos indivíduos *GSTM1* e *GSTT1* positivos. A ausência de

amplificação *GSTM1* (215pb) ou *GSTT1* (480pb), na presença de controle interno, indicou os respectivos genótipos nulos para cada gene, ou para ambos (Figura 4).

Tabela II. Protocolo de termociclagem para a genotipagem dos *primers* *RH92600*, *GSTM1* e *GSTT1*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Ciclos
Desnaturação inicial	94	5	1
Desnaturação	94	30s	30
Amplificação	50	45s	
Extensão	72	1	
Extensão final	72	7	1
Armazenamento	4	∞	∞

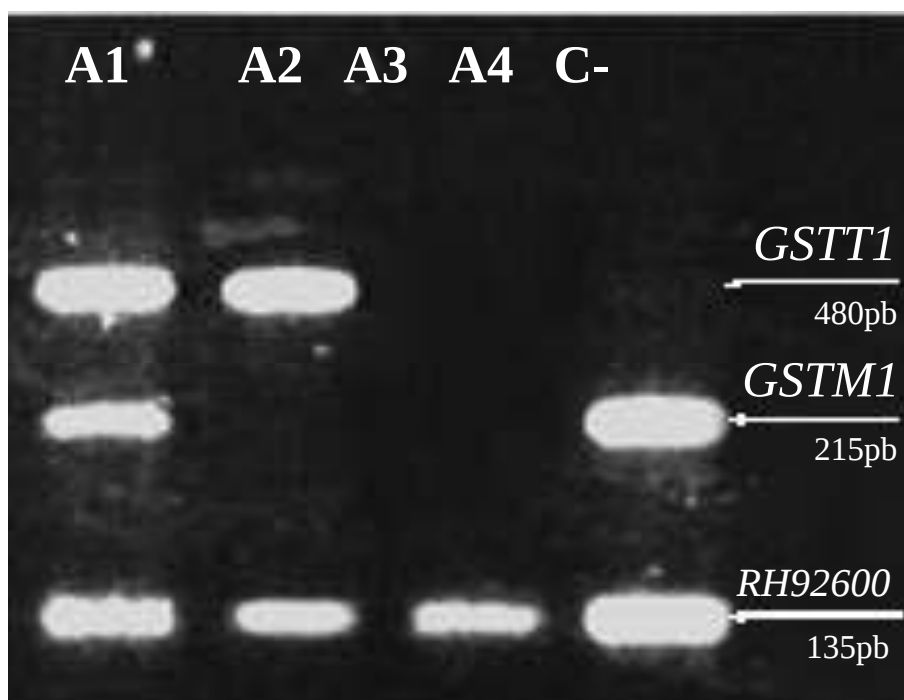


Figura 4. Gel de Agarose a 1.5% indicando o resultado da genotipagem do gene *GSTM1* e *GSTT1*. A1: *GSTT1/GSTM1* positivos; A2: *GSTT1* positivo; A3: *GSTM1* e *GSTT1* nulos; A4: *GSTM1* positivo; C-: Controle negativo.

3.5. Análise estatística e determinação da sobrevida

Os dados da genotipagem, tanto dos casos como dos controles, foram tabulados em planilhas do *software* Excel® (2003). O teste do χ^2 de homogeneidade foi utilizado na comparação entre os dados sócio-demográficos (idade e sexo). O teste foi realizado em tabelas de contingência 2x2 e 3x2, com o auxílio do *software* BioEstat® (3,0).

Adicionalmente, pode-se avaliar o risco relativo entre o polimorfismo dos genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* e o câncer da laringe pelo teste de *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95% das populações caso e controle, e estas duas variantes associadas ao sexo, tabagismo e etilismo.

Para verificar a associação entre o genótipo nulo e a idade em relação ao surgimento do carcinoma laríngeo, um teste de Tendência foi aplicado utilizando o *software* BioEstat® 3.0. A sobrevida também foi calculada de acordo com os genótipos dos pacientes, para isso foi utilizado o método da Tábua de Vida Atuarial e posteriormente o teste de Logrank utilizando o *software* *GrahPad Prism*® (Versão 4.0).

4. Resultados

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

Tabela III. Distribuição dos dados sócios demográficos, quanto à idade e sexo, dos pacientes caso e controle.

<i>GSTM1/T1</i>	Caso n (%)	Controle n (%)	χ^2	GL	<i>p</i>
Idade (anos)					
< 40	2 (3,2)	1 (2,0)	2,49	2	0,28
40 – 60	33 (52,4)	31 (63,3)			
> 60	28 (44,4)	17 (34,7)			
Sexo			2,92	1	0,12
Feminino	15 (23,8)	7 (14,3)			
Masculino	48 (76,2)	42 (85,7)			
Total	63 (100,00)	49 (100,0)			

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

Tabela IV. Distribuição das frequências genotípicas para *GSTM1* e *GSTT1* entre as populações caso e controle.

Genótipo	Caso n (%)	Controle n (%)	χ^2	GL	p
<i>GSTM1</i>					
Presente	26 (41,3)	24 (49,0)	0,27	1	1,19
Nulo	37 (58,7)	25 (51,0)			
<i>GSTT1</i>					
Presente	34 (54,0)	29 (59,2)	0,55	1	0,54
Nulo	29 (46,0)	20 (40,8)			

Para verificar se a presença dos genótipos nulos pode ter relação com o risco do câncer da laringe, foi aplicado o teste *Odds Ratio* em tabela de contingência 2 x 2 (Tabela V). Adicionalmente, foram associados aos genótipos as variáveis sexo (Tabelas VI e VII), tabagismo (Tabela VIII) e etilismo (Tabela IX). De acordo com o teste, nenhum dos genótipos dos pacientes oferece risco de câncer laringe, nem mesmo associados às variáveis sexo, etilismo e tabagismo.

Tabela V. Resultado do teste de *Odds Ratio* para os genótipos *GSTM1* e *GSTT1*.

Genótipo	Caso		Controle		OR	IC 95%	p
	GR	GNR	GR	GNR			
<i>GSTM1</i>	37	26	25	24	1,36	0,64 – 2,89	0,53
<i>GSTT1</i>	29	34	20	29	1,23	0,58 – 2,63	0,71

Legenda: GR = genótipo considerado de risco; GNR = genótipo não considerado de risco.

Tabela VI. Resultado do teste de *Odds Ratio* para os genótipos *GSTM1* e *GSTT1*, em homens.

Genótipos	OR	IC 95%	p
<i>GSTM1</i>			
Presente x Nulo	0,64	0,28 – 1,49	0,42
<i>GSTT1</i>			
Presente x Nulo	0,65	0,28 – 1,53	0,44

Tabela VII. Resultado do teste de *Odds Ratio* para os genótipos *GSTM1* e *GSTT1*, em mulheres.

Genótipos	OR	IC 95%	p
<i>GSTM1</i>			
Presente x Nulo	1,66	0,24 – 11,57	0,96
<i>GSTT1</i>			
Presente x Nulo	2,85	0,41 – 19,64	0,53

Tabela VIII. Resultado do teste de *Odds Ratio* para os genótipos *GSTM1* e *GSTT1*, em tabagistas.

Genótipos	OR	IC 95%	<i>p</i>
<i>GSTM1</i> Presente x Nulo	0,68	N/A	0,87
<i>GSTT1</i> Presente x Nulo	3,92	0,38 – 39,92	0,47

Tabela IX. Resultado do teste de *Odds Ratio* para os genótipos *GSTM1* e *GSTT1*, em etilistas.

Genótipos	OR	IC 95%	<i>p</i>
<i>GSTM1</i> Presente x Nulo	0,54	0,19 – 1,50	0,35
<i>GSTT1</i> Presente x Nulo	0,59	0,21 – 1,64	0,45

Foi verificada a associação entre o genótipo nulo dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e a idade no momento do diagnóstico relacionado ao risco de câncer da laringe, utilizando o Teste de Tendência. Foram utilizadas tabelas de contingência 2 x k, onde foram inseridas as frequências absolutas dos indivíduos em relação ao genótipo e à idade em intervalos de tempo. Os resultados sugerem que não há relação entre o intervalo de tempo e o desenvolvimento do câncer de laringe nos pacientes estudados. A distribuição das frequências genotípicas em relação à idade em intervalos de tempo e os respectivos valores de A e *p* encontram-se na Tabela X.

Tabela X. Distribuição das frequências genotípicas em relação à idade em intervalos de tempo.

Genótipo	Idade (anos)			A	X ²	<i>p</i>
	30 - 49	50 - 69	70 - 89			
<i>GSTM1</i> (Presente x Nulo)	6 10	14 23	6 4	2,47	0,99	0,31
<i>GSTT1</i> (Presente x Nulo)	11 5	18 19	5 5	-2,76	1,20	0,27

A Tábua de Vida Atuarial permitiu calcular a sobrevida dos pacientes, ao final de 72 meses, de acordo com os respectivos genótipos. Para os pacientes com o genótipo *GSTM1* nulo (n=37) e *GSTM1* presente (n=26) as sobrevidas foram de 73,2% e 62,3%, respectivamente. Os pacientes com o genótipo *GSTT1* nulo (n=29) e *GSTT1* presente (n=34)

apresentaram sobrevida relativa de (Tabela XI). As sobrevidas dos pacientes de acordo com os genótipos podem ser melhores observadas nas Figuras 5, 6 e 7. Ao aplicar o teste de Logrank entre os diferentes genótipos, não foram obtidas diferenças significativas entre as sobrevidas.

Tabela XI. Distribuição das sobrevidas dos pacientes com câncer da laringe de acordo com os genótipos *GSTM1* e *GSTT1*.

Genótipos		Nº de pacientes	Sobrevida (%)
<i>GSTM1</i>	Presente	26	73,2
	Nulo	37	62,3
<i>GSTT1</i>	Presente	34	54,2
	Nulo	29	85,2

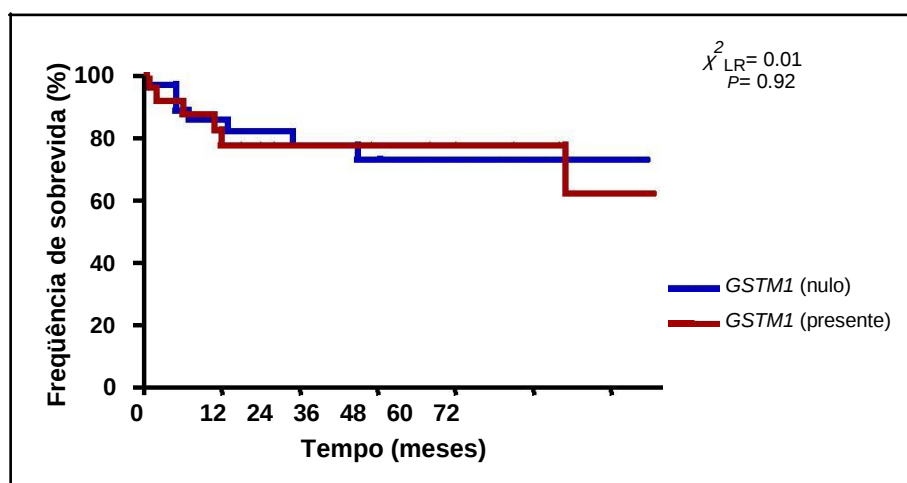


Figura 5. Gráfico de Sobrevivência dos pacientes *GSTM1* nulo e presente.

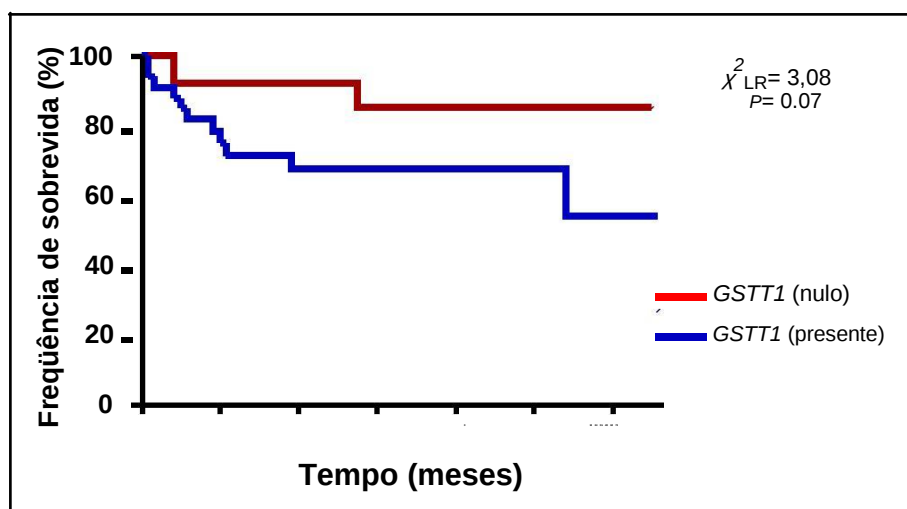


Figura 6. Gráfico de Sobrevivência dos pacientes *GSTT1* nulo e presente.

5. Discussão

A relação entre as bases genéticas e moleculares com o câncer é objeto de estudo de diversos estudos na saúde humana, proporcionando um melhor conhecimento acerca da biologia dos tumores. Com o advento das técnicas de biologia molecular, proporcionando abordagens moleculares com maior poder de resolução, espera-se que a compreensão da suscetibilidade genética e da interação entre os fatores genéticos e ambientais elucidará novos aspectos sobre a etiologia dos cânceres humanos. Tal promessa poderá contribuir para o desenvolvimento de procedimentos mais eficazes na prevenção e no tratamento destas importantes doenças, responsáveis por uma ponderável morbidade e mortalidade das populações humanas (Chang *et al.*, 2004).

Resultados obtidos em estudos sobre polimorfismos genéticos e a suscetibilidade ao câncer de cabeça e pescoço em geral, avaliando também o efeito de diferentes fatores ambientais, vêm proporcionando uma melhor compreensão da doença. Indivíduos tabagistas e etilistas crônicos são mais suscetíveis à iniciação e progressão da carcinogênese laríngea (Silva, 2003). Somados a estes fatores indivíduos com polimorfismos genéticos desfavoráveis possuem uma maior predisposição à doença e conseqüentemente, um pior prognóstico.

Variantes alélicas polimórficas dos genes que codificam estas enzimas podem alterar a expressão ou a função enzimática, levando a um aumento ou a uma diminuição na ativação e detoxificação de carcinógenos. Tais enzimas fazem parte de superfamílias que possuem um importante papel na metabolização de um grande número de compostos, como os encontrados na dieta e na fumaça do cigarro, atuando, conseqüentemente, na manutenção da integridade genômica (Geisler & Olshan, 2001).

Segundo Bartsch (2000), desde que muitos compostos requerem ativação metabólica antes de se ligarem ao DNA, é provável que variações individuais no metabolismo influenciem na formação de adutos no material genético, podendo levar a um processo

carcinogênico. Diversos estudos têm demonstrado associação entre variantes alélicas polimórficas em genes do metabolismo e exposição ambiental no risco de desenvolver câncer de pulmão, bexiga, cavidade bucal, dentre outros, principalmente em indivíduos fumantes (Au *et al.*, 2001).

Dentre os sistemas de detoxificação já descritos, as GSTs possuem importante papel, fornecendo proteção contra compostos eletrofílicos e produtos do estresse oxidativo, pois vem sendo sugerido que estas enzimas fazem parte de um mecanismo de resposta adaptativa aos danos causados por compostos químicos (Schneider *et al.*, 2004). As GSTs estão amplamente distribuídas na natureza, encontradas desde as bactérias até o homem, e são expressas em tecidos de mamíferos (Hayes & Pulford, 1995).

Indivíduos com genótipo nulo para *GSTM1*, ocupacionalmente expostos ao estireno, apresentaram um aumento na troca entre cromátides irmãs, além de terem um aumento significativo na concentração de metabólitos urinários, quando comparados com indivíduos com *GSTM1* presente (Teixeira *et al.*, 2002).

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a frequência dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulos em grupos caso-controle investigando os graus de suscetibilidade dos pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular (CEC) da laringe pelo Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge, ACCG, segundo as variáveis sexo, hábitos tabagistas e etilistas e período de tempo.

As frequências genotípicas para *GSTM1* e *GSTT1* nulos não se mostrou diferentes estatisticamente entre pacientes do grupo caso e controle (Tabela IV). Não foram observadas associações entre o risco relativo entre os genótipos considerados de risco (*GSTM1* e *GSTT1* nulos) e os genótipos ditos como selvagens (*GSTM1* e *GSTT1* presente) [Tabela V]. As variáveis sexo e estilo de vida não se mostraram diferentes estatisticamente entre os grupos caso e controle, como pode ser observado nas tabelas Tabela VI, VII, VIII e IX. Não houve

diferença estatisticamente significativa entre os intervalos de tempo na datas do diagnóstico dos pacientes com CEC da laringe quanto aos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulos (Tabela X). As sobrevidas relativas dos pacientes de acordo com os genótipos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela XI e Figuras 5, 6 e 7).

Enquanto diversos estudos recentes demonstram que os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1*, separadamente ou combinados, são fatores genéticos de alto risco para o desenvolvimento de tumores. O genótipo *GSTM1* nulo já foi associado ao desenvolvimento de diversos tipos de cânceres, como o de pulmão (Gaspar *et al.*, 2004); bexiga (Johnson & Evans, 2002); mama (Mitruen *et al.*, 2001) e de cabeça e pescoço (Busch *et al.*, 2002; Matthias *et al.*, 2002; Au *et al.*, 2003). Dentre os tumores mais freqüentemente associados à ausência do gene *GSTM1*, destaca-se o câncer de pulmão, pelo fato de *GSTM* serem ativos na detoxificação de certos epóxidos dos HPAs encontrados na fumaça do cigarro e em outros produtos de combustão (Hayes & Pulford, 1995).

A freqüência do gene *GSTM1* nulo em pacientes chineses com adenocarcinoma de pulmão, segundo Gao & Zhang (1999), foi de 76,9% contra 49,2% em indivíduos saudáveis. Aktas *et al.* (2001) estudaram a relação entre o genótipo *GSTM1* nulo e o câncer superficial e invasivo de bexiga. A deleção do gene *GSTM1* foi encontrada em 54,3% de todos os pacientes com câncer e em 64,3% dos pacientes que apresentam a forma invasiva do câncer de bexiga.

Rossi *et al.* (1999), avaliaram a excreção de ácido fenilmercaptúrico e t,t – MA (metabólito do benzeno) em motoristas de ônibus municipais, correlacionando com o polimorfismo genético das enzimas de fase I e II, demonstrando altos níveis de excreção urinária do t,t – MA em indivíduos com o genótipo *GSTM1* nulo. Resultados semelhantes foram mostrados por Bergamaschi *et al.* (1999) analisando a urina de ciclistas, e também demonstraram que altos níveis de tolueno e benzeno foram encontrados nos ciclistas com deleção do gene *GSTM1*.

Nossos dados corroboram com os achados de Jourenkova *et al.* (1999), Hirvonen (1997) e Vermeulen *et al.* (1996) que não observaram um moderado aumento no risco dos pacientes com genótipos nulos para *GSTM1* e *GSTT1* em pacientes com câncer de laringe sem diferenças significantes. Poucos estudos têm se dirigido a avaliar associações entre o genótipo/fenótipo de *GSTM1*, porém com resultados inconclusivos (Lafuente *et al.* 1993). Por outro lado, o efeito do polimorfismo de *GSTT1* associado ao câncer de laringe apresentou-se duas vezes maior em indivíduos do grupo controle (Jahnke *et al.* 1996). Recentemente Gajecka *et al.* (2005) encontraram um aumento significativo no risco relativo dos genes *CYP1A1*, *NAT2*, *GSTM1* e *XPB* em pacientes caucasóides da Polônia relacionados à carcinogênese laríngea.

Risch *et al.* (2003) observaram que consumo de álcool crônico em alemães, assim como a exposição à fumaça do cigarro estão relacionados associados aos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulos e consequentemente, a um maior risco no desenvolvimento do câncer de laringe. To-Figueras *et al.* estudando pacientes com câncer de laringe da Espanha encontraram uma relação entre os genes *EH* e *GSP1* com a suscetibilidade aumentada a carcinogênese da laringe em pacientes tabagistas crônicos, já que os produtos destes genes estão envolvidos no metabolismo de hidrocarbonetos aromáticos.

A análise genotípica pode trazer informações sobre o papel das vias metabólicas de carcinógenos específicos. Entretanto, devido às divergências encontradas entre os diferentes estudos envolvendo estes genes do biometabolismo, estudos longitudinais que avalie o impacto dos polimorfismos das enzimas de fase II do metabolismo associados ao câncer de laringe são muito importantes e podem tornar-se ferramentas importantes na tentativa de identificar pacientes com risco para o desenvolvimento de futuros carcinomas.

6. Conclusões

No presente estudo foram encontradas frequências genotípicas positivas observadas para os genes *GSTM1* e *GSTT1* de 41,3% (26/63) e 54,0% (34/63) para os pacientes com carcinomas laríngeos, e de 49,0% (24/49) e 51,0% (25/49) para o grupo controle, respectivamente. Para a avaliação do genótipo *GSTM1* (nulo) e *GSTT1* (nulo), os pacientes do grupo caso apresentaram 58,7% (37/63) e 46,0% (29/63) de genótipos nulos para *GSTM1* e *GSTT1*, enquanto que os pacientes do grupo controle apresentaram 51,0% (25/49) e 40,8% (20/49), não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos caso e controle.

Não foram encontradas associações estatisticamente significativas das variantes genotípicas *GSTM1* (nulo) e *GSTT1* (nulo) com o carcinoma espinocelular da laringe. A ausência desta verificação, no entanto, não exclui completamente a possibilidade destes genes de exercer alguma influência no desenvolvimento do câncer laríngeo, tendo em vista que haplótipos envolvendo os diversos genes do biometabolismo podem contribuir de forma diferenciada para a carcinogênese.

A relação entre o desenvolvimento da doença e a idade também não apresentou diferença estatisticamente significativa. O mesmo foi observado nas variáveis sexo e hábitos tabagista e etilista. As taxas de sobrevida relativa observadas sugerem que não há diferença entre o perfil alélico e genotípico na população estudada.

Além de um acréscimo no tamanho amostral, para aumentar o poder de verificação estatística, estudos funcionais envolvendo as enzimas codificadas por estes genes também devem ser realizados para a obtenção de resultados mais definitivos no estudo de associação dos genes *GSTM1* e *GSTT1* com o desenvolvimento da carcinogênese espinocelular da laringe.

CAPÍTULO V. AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ALÉLICA DOS GENES *Cyp2a29* E *Gstp1* EM CAMUNDONGOS BALB/c SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA PELA CICLOFOSFAMIDA NO TRATAMENTO DO SARCOMA 180.

Resumo

O ataque indiscriminado promovido pelas drogas antineoplásicas às células de rápida proliferação, cancerosas ou normais, produz os indesejáveis efeitos colaterais ou tóxicos, conhecidos e extremamente temidos pelos indivíduos que necessitam submeter-se ao tratamento. Algumas substâncias quimioterápicas, como a Ciclofosfamida, têm um efeito negativo considerável em tecidos e órgãos normais. Essas alterações podem e devem ser avaliadas em células e tecidos sob o efeito da droga. O presente estudo abordou avaliações toxicológicas da Ciclofosfamida e a análise do polimorfismo dos genes *Cyp2a29* e *Gstp1* em camundongos BALB/c e correlacionando-os com a toxicidade da droga através da avaliação dos órgãos comumente afetados. Primeiramente, foi determinada a DL₅₀ da droga em 40 camundongos, divididos segundo a dose estabelecida: 25, 50, 100, 250 e 500mg/Kg. Posteriormente, outros 40 camundongos foram utilizados na avaliação do polimorfismo genético dos genes *Cyp2a29* e *Gstp1* subdivididos em quatro grupos: A (controle), B (controle tumoral), C (caso) e D (controle da droga). A DL₅₀ da ciclofosfamida administrada foi de 474mg/Kg. A DL₅₀ da ciclofosfamida injetada nos camundongos BALB/c foi 348mg/Kg. Quanto à toxicidade, a ciclofosfamida ocasionou redução do peso corporal em diferentes doses administradas e os rins, baço, fígado, coração e pulmões foram os órgãos mais comumente afetados. Os animais que receberam a dose de 500mg/Kg foram a óbito em 24 horas, três animais da dose de 250mg/Kg apresentaram óbito ao final de uma semana. A avaliação da toxicidade demonstrou alterações de diferentes graus de congestão observados no baço, fígado e coração. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas e genotípicas de *Cyp2a29* e *Gstp1* nos grupos dos animais estudados. Tal observação deve-se provavelmente, a característica da linhagem BALB/c serem isogênicas. Estudos que preconizam a utilização de testes toxicológicos combinados à avaliação anatomopatológica e investigação da variabilidade genética permitem a padronização de protocolos de tratamento de diversos quimioterápicos.

Palavras-chave: *Cyp2c29*, *Gstp1*, ciclofosfamida e sarcoma 180.

Abstract

The indiscriminate attack promoted by antineoplastic drugs of fast cells proliferation, normal or cancerous, produces the undesirable or toxic side effects, known and extremely feared by individuals who need to submit to this treatment. Some quimioterapics substances, such as Cyclophosphamide, have a considerable negative effect on tissues and normal organs. These changes can and should be evaluated in cells and tissues under the influence of drugs. This study addressed the Cyclophosphamide toxicological evaluation and analysis of the polymorphism of *Cyp2a29* and *Gstp1* BALB/c genes in mice, correlating them with the toxicity of drugs through the assessment of organs commonly affected. First, it was determined the DL₅₀ of the drug in 40 mice, divided according to established dose: 25, 50, 100, 250 and 500mg/Kg. Subsequently, another 40 mice were used on the assessment of the genetic polymorphism of genes *Cyp2a29* and *Gstp1* divided into four groups: A (control), B (control tumor), C (case) and D (control of drugs). The DL₅₀ of cyclophosphamide administered was 474mg/Kg. The LD₅₀ of cyclophosphamide injected in BALB/c mice was 348mg/Kg. As for toxicity, cyclophosphamide caused reduction in body weight at different doses and kidneys, spleen, liver, heart and lungs were the organs that were most commonly affected. The animals that received a dose of 500mg/Kg died in 24 hours, three animals with a dose of 250mg/Kg died the end of one week. The evaluation of toxicity showed changes of varying degrees of congestion observed in the spleen, liver and heart. There were not found statistically significant differences between the frequencies of allelic and genotypic to *Cyp2a29* and *Gstp1* in groups of animals studied. This observation should be probably the characteristic line BALB/c are isogenic. Studies that make the use of toxicological tests combined anatomopathological the evaluation and investigation of genetic variability allow the standardization of various chemotherapy protocols for treatment.

Keywords: *Cyp2c29*, *Gstp1*, cyclophosphamide and sarcoma 180.

1. Introdução

Sabe-se que há muito tempo pacientes tratados com diversas drogas apresentam variabilidade de resposta e de suscetibilidade à toxicidade a medicamentos. De fato, uma proporção considerável de pacientes tomando uma dose padronizada de determinado medicamento não responde, responde apenas parcialmente ou experimentam reações adversas ao medicamento (Lazarou *et al.*, 1998). Nos Estados Unidos, mais de dois milhões de hospitalizações e 100.000 mortes por ano são decorrentes de reações adversas a medicamentos. Ainda, aproximadamente 4% de todos os novos medicamentos lançados são retirados do mercado devido às reações adversas, configurando uma situação desastrosa para a indústria farmacêutica, que gasta milhões de dólares para desenvolver um novo produto (Jefferys *et al.*, 1998).

1.1. Aspectos gerais da Farmacogenética

Todo indivíduo apresenta reações distintas aos medicamentos, que podem variar desde o benefício para o paciente até reações adversas. As conseqüências desses eventos podem ser um simples desconforto ou até mesmo levar à hospitalização. Tais situações decorrem da variabilidade da resposta das pessoas aos medicamentos, o que, em boa parte, se deve a fatores genéticos ou hereditários (Avolio & Sato, 2004).

Variações na resposta ao tratamento de determinadas drogas são atribuídos a diversos fatores tais como doenças, diferenças na natureza bioquímica dos medicamentos, fatores ambientais e polimorfismos genéticos. O estudo das variações na capacidade de metabolização de xenobióticos já identificou inúmeros polimorfismos genéticos, sendo a maioria desses de relevância clínica. A Farmacogenética/Farmacogenômica estuda as influências genéticas sobre as respostas a medicamentos. A Farmacogenética analisa os

efeitos de genes isolados, enquanto que a Farmacogenômica estuda simultaneamente, vários genes e suas interações (Shastry, 2006).

A primeira referência à variabilidade da resposta farmacológica é atribuída ao matemático grego Pitágoras (580-500 a.C.), que descreveu, em 510 a.C., a intoxicação provocada por determinadas favas em alguns, mas não em todos os indivíduos que as ingeriam. A Farmacogenética moderna teve suas origens na década 1950, com a demonstração de associações entre alterações genéticas e a metabolização de medicamentos pelo organismo (Suarez-Kurtz, 2004). Por outro lado, a Farmacogenômica, em 1995, surgiu da união da farmacogenética com a genômica e a biotecnologia (Nobert & Vesell, 2004).

A Farmacologia básica, ou pré-clínica teve início em 1660 com o médico suíço Johann Wepfer, que realizou um grande número de trabalhos testando a toxicidade de remédios em animais. Na França, dois grandes cientistas, François Magendie (1820) e Claude Bernard (1850), demonstraram o local de ação de muitos medicamentos, por meio de pesquisas em animais. A farmacologia evoluiu rapidamente, a partir destas descobertas, e atualmente milhares de novos remédios são descobertos e testados em animais, para a avaliação da toxicidade e a possível utilidade em medicina (Lima, 2001).

Apesar de constituir um desafio à estratégia tradicional de criar remédios de uso universal, a indústria farmacêutica pode utilizar a variabilidade genética para desenvolver novas drogas destinadas a pacientes com genótipos específicos. Os primeiros frutos dessa nova terapia são, por exemplo, drogas antitumorais para células com alterações genéticas específicas. Antes de iniciar o tratamento, portanto, é indispensável demonstrar a presença dessas alterações (Fonseca *et al.*, 2000).

Na terapia atual, a prescrição de medicamentos é feita essencialmente com base no diagnóstico, sintomatologia e algumas peculiaridades do paciente, tais como, idade, função hepática e/ou renal, gestação ou lactação entre outros. Mesmo nas tentativas de

individualização da terapêutica, que consideram o paciente como um todo, não se costuma levar em conta os fatores genéticos interferentes na eficácia e na toxicidade dos fármacos (Johnson & Evans, 2002). Outro aspecto a se considerar na prescrição é a dosagem adequada do fármaco, pois é essa que determina o efeito terapêutico desejado (Lima, 2001).

Estima-se que somente um terço dos indivíduos obtém benefícios terapêuticos a partir de medicamentos prescritos, enquanto em dois terços, o medicamento não atua como esperado ou é pouco tolerado (Norton, 2001). Como exemplo desse problema, pode-se citar a quimioterapia, que é frequentemente interrompida devido ao aparecimento de sintomas tóxicos ao organismo. Por isso, antes de escolher o tratamento quimioterápico, é importante investigar a variabilidade genética correlacionada à eficácia de tratamento, bem como as principais alterações moleculares do tumor (Pinto, 2005).

O desafio a ser vencido pelos farmacogeneticistas é investigar o componente genético da variabilidade de resposta aos medicamentos e transferir esses conhecimentos aos profissionais da saúde, aos usuários de medicamentos, à indústria farmacêutica, visando obter, para qualquer remédio, a melhor relação risco/benefício. Para tanto, faz-se necessário à pesquisa em seres humanos, que deve estar fundamentada na experimentação prévia realizada em animais, em laboratórios ou em outros fatos científicos (Suarez-Kurtz, 2004).

1.2. O Sarcoma 180 (S180) e sua utilização em camundongos (*Mus musculus*)

Camundongos e ratos são as espécies mais utilizadas na pesquisa básica e avançada, devido ao uso comum em pesquisas toxicológicas, e da disponibilidade de dados para indução de micronúcleo usando-se uma grande variedade de agentes químicos. Tanto machos como fêmeas podem ser utilizados, a não ser que exista evidência de diferença de toxicidade entre os sexos.

A espécie *Mus musculus* é frequentemente utilizada como modelos em ensaios experimentais de estudo em Biologia devido ao seu ciclo de vida, alta capacidade procriação e tamanho reduzido. O genoma do *Mus musculus* foi o Segundo genoma de mamífero a ser sequenciado, facilitando a comparação entre este genoma com o dos humanos. A eutanásia destes animais deve ser realizada por métodos que induzam perda rápida de consciência e morte sem dor ou *stress* (Choudhary *et al.*, 2005).

O sarcoma 180 (S180) é bastante utilizado em estudos experimentais com taxa de disseminação e índice de proliferação determinados, permitindo o estudo comparativo no uso de substâncias potencialmente tóxicas. O transplante de suas células é realizado, em animais, via inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal, com crescimento em até 100% dos casos, no qual pode ocorrer regressão natural em 8 a 10%. Em geral, ocorre ulceração da pele por volta do 28º dia e 30º dia (Wal *et al.*, 2003).

1.3. Ciclofosfamida.

A quimioterapia antineoplásico tem como objetivo o tratamento de diversos tumores malignos, tornando-se uma das mais importantes e promissoras maneiras de combater o câncer. Essa forma de tratamento pode ser empregada de forma curativa ou paliativa, dependendo do tipo e extensão do tumor, além da condição física do paciente. A associação da quimioterapia a outras formas de tratamento é bastante comum (Mealey *et al.*, 1994). Seu emprego antes da cirurgia e/ou radioterapia na tentativa de promover a erradicação de micrometástases constitui a quimioterapia neo-adjuvante. Porém, o uso depois da cirurgia e/ou radioterapia constitui a quimioterapia adjuvante (Sonis, 1998).

O ataque indiscriminado promovido pelas drogas antineoplásicos às células de rápida proliferação, cancerosas ou normais, produz efeitos indesejáveis colaterais ou tóxicos,

conhecidos e extremamente temidos pelos indivíduos que necessitam submeter-se ao tratamento (Mealey *et al.*, 1994).

Os agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer podem ser divididos de acordo com as seguintes classes: agentes alquilantes, no qual a ciclofosfamida está inserida, sendo o agente mais amplamente utilizado desta classe; antimetabólitos, produtos naturais, como os alcalóides da Vinca rósea, os taxanos, alguns antibióticos, entre outros; hormônios e antagonistas e agentes diversos, tais como os complexos de coordenação da platina, a antracenediona, o inibidor da tirosinocinase (Chabner & Calabresi, 1995; Almeida *et al.*, 2005).

Os agentes alquilantes, de forma geral, têm como alvo a molécula de DNA da célula tumoral, apresentando geralmente boa eficácia e produzindo aumentos significativos na expectativa de vida de pacientes com câncer, especialmente quando associados à antineoplásicos de diferentes mecanismos de ação (Haskel, 1990). Porém, por sua relativa inespecificidade, tornam-se tóxicos também para os tecidos saudáveis, principalmente os de maior grau de proliferação. Consequentemente, os esforços agora estão direcionados no sentido de se produzir agentes mais seletivos. Se isso for possível, poderíamos dispor de drogas mais eficazes, pois agiriam especificamente nos mecanismos moleculares da neoplasia, com um grau bem menor de toxicidade (Oliveira & Alves, 2002).

A Ciclofosfamida é um antineoplásico sintético, pertencente à classe dos agentes alquilantes, no grupo das mostardas nitrogenadas. Essa classe tem a propriedade de se tornar um forte eletrólito pela Formação de intermediários de íon carbônio ou de complexos com a molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA). Essas reações resultam na formação de ligações covalentes entre o DNA e componentes nucleofílicos formados pela alquilação, como grupos fosfato, amino, sulfidril, hidroxila, carboxila e imidazol, causando danos estruturais ao ácido nucleico. A ciclofosfamida constitui-se de um pó branco cristalino, de

forma molecular $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P.H_2O$ e peso molecular de 279.1kDa. Seu nome químico é 2-[bis(2-cloroetil)amino]tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforina 2-óxido monohidrato, sendo solúvel em água, soluções salinas ou etanol (Goodman & Giman, 2003) [Figura 1].

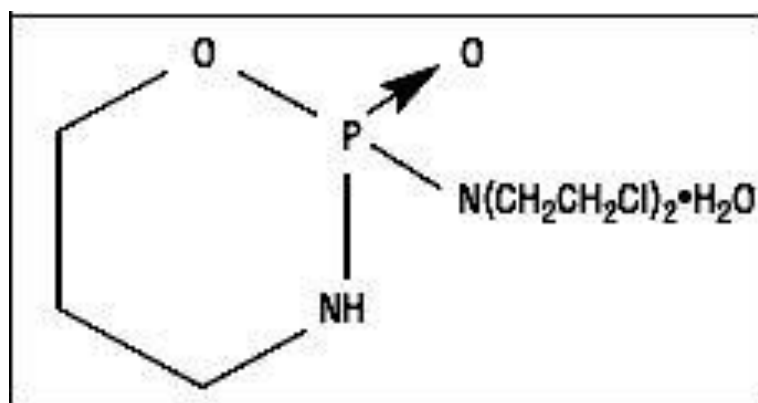


Figura 1. Estrutura bioquímica da ciclofosfamida indicando o grupo bis-(2-clorowtil) ligado no centro com a molécula de nitrogênio.

A atividade biológica da ciclofosfamida, bem como do restante dos integrantes do grupo das mostardas nitrogenadas, baseia-se na presença do grupo bis-(2-cloroetil). Ela é hidroxilada no fígado pelo grupo *CYP2B* das isoenzimas das citocromo P450-oxidases, sendo convertida em 4-hidroxíciclofosfamida, portanto, a ciclofosfamida é uma pró-droga. Essa dependência de ativação Bioquímica por meio do sistema do citocromo P450 confere vantagem em relação aos outros compostos do grupo das mostardas nitrogenadas. Estes são quimicamente instáveis em graus variados, de forma que alguns deles são extremamente instáveis, reagindo quase totalmente no organismo poucos minutos após a sua administração, podendo aumentar sua toxicidade (Goodman & Gilman, 2003).

A 4-hidroxíciclofosfamida fica em equilíbrio dinâmico com o tautômero acíclico aldofosfamida. Ela pode ainda ser oxidada pela aldeído-oxidase no fígado ou no tecido tumoral e, talvez, por outras enzimas, produzindo os metabólitos carboxifosfamida e 4-cetociclofosfamida, que não possuem atividade biológica significativa. Aparentemente, a

lesão hepática é minimizada por essas reações secundárias, enquanto quantidades significativas dos metabólitos ativos, como a 4-hidroxíciclofosfamida e a aldofosfamida são transportados até o local alvo pelo sangue. Nas células tumorais, a aldofosfamida sofre clivagem espontânea, com produção de mostarda de fosforamina e acroleína, sendo o primeiro responsável pelos efeitos antitumorais e o segundo responsável pela cistite hemorrágica observada com o uso de ciclofosfamida (Andersson, 1994).

Portanto, a mostarda de fosforamina realiza a alquilação do DNA das células tumorais, resultando na ligação cruzada das cadeias dos ácidos nucléicos ou na ligação de um ácido nucléico a uma proteína, alterações estas que danificam seriamente a molécula de DNA, tendo como resultado final a morte celular. Os verdadeiros mecanismos da morte celular relacionada com a alquilação do DNA não estão bem elucidados, mas acredita-se que o gene celular *p53* identifica a lesão do DNA e inicia o processo de apoptose, sendo esta especialmente mais intensa em células com alto índice mitótico, como as células malignas das neoplásicas, células da pele e do sangue (Goodman & Gilman, 2003). A Figura 2 esquematiza a ação das CYPs no metabolismo da ciclofosfamida em humanos.

1.4. Polimorfismo genético de *Cyp2c29*

A superfamília de genes do citocromo *P450* codifica numerosas enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo de compostos endógenos como os hormônios esteróides, ácidos graxos e algumas vitaminas lipossolúveis (A e D), assim como no metabolismo de xenobióticos, entre várias drogas, agentes carcinógenos, pesticidas, alcalóides entre outros. O complexo do citocromo *P450* está altamente distribuído em animais, vegetais e protistas, existentes na natureza antes mesmo da divisão entre organismos eucariontes e procariontes (Ortiz de Montellano, 1995).

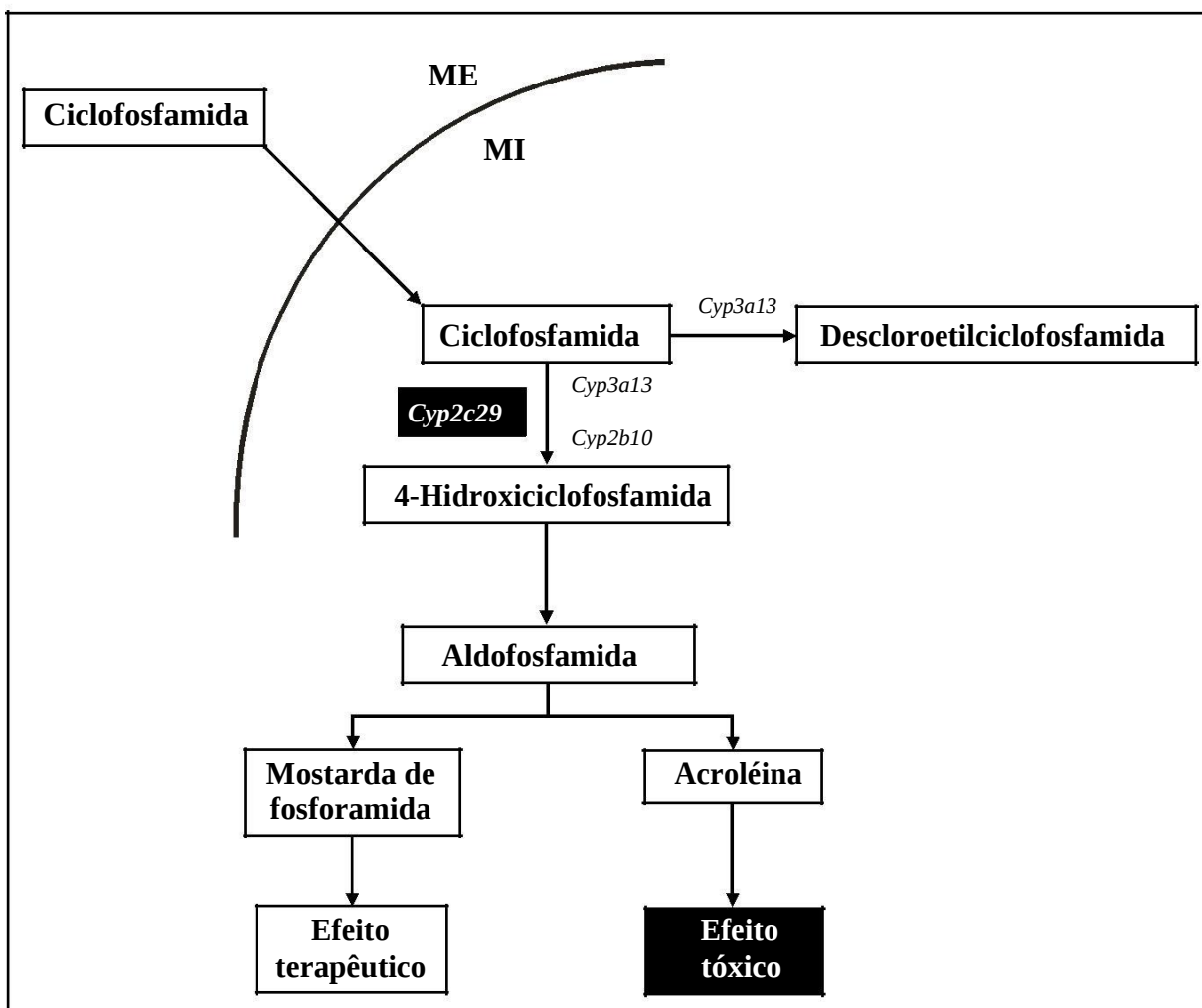


Figura 2. Desenho esquemático mostrando a ação da *Cyp3a13*, *Cyp2c29* e *Cyp2b10* no metabolismo da ciclofosfamida, resultando nos metabólitos mostarda de fosforamida (efeito terapêutico) e acroléina (efeito tóxico). Modificado de Watters *et al.* (2003). Onde: ME: meio extracelular e MI: meio intracelular.

A subfamília *CYP2C* representa aproximadamente 20% do total do conteúdo hepático em citocromo *P450*, sendo a *CYP2C9* a mais abundante, seguido por, *CYP2C8* e *CYP2C19*. A *CYP2C9* está envolvida no metabolismo de diversos quimioterápicos antineoplásicos com a ciclofosfamida, ifosfamida e tamoxifeno (Edwards *et al.*, 1998). Dados *in vitro* demonstraram que os alelos *CYP2C9**2 – C430T (Arg144Cys) e *3 – a1075C(Ile359Leu) estão associados com reduções significativas no metabolismo intrínseco de drogas quando comparados com o alelo *CYP2C9**1 (Ingelman-Sundberg *et al.*, 1999). O mesmo estudo demonstrou que o alelo selvagem para *CYP2C9* é mais eficiente que o alelo

*CYP2C9*3* no metabolismo de 4-hidroxíciclofosfamida e 4-hidroxiifosfamida. Watters *et al* (2003) não encontrou nenhuma correlação entre os genótipos *CYP3A4/5*, *CYP2C9* e *CYP2B6* na resposta com a ciclofosfamida em diferentes linhagens de camundongos submetidos a esta droga.

A família *Cyp2c* é a maior e mais complexa das citocromo-oxigenases em camundongos, inclusive *Cyp2C29*, *Cyp2C37*, *Cyp2C38*, *Cyp2C39*, *Cyp2C40*, *Cyp2C44*, *Cyp2C50*, *Cyp2C54* e *Cyp2C55*. Semelhante às proteínas encontradas em humanos, a *Cyp2C*, em camundongos, possui um papel fisiológico importante na oxidação de ácido araquidônico, hormônios esteróides entre outros. A *Cyp2C29*, encontrada principalmente no fígado, apresenta-se com uma enzima de importante atividade monooxigenase (Lee *et al.*, 2002). O gene *Cyp2C29* em *Mus musculus*, está localizado no locus 19D2, sendo que o RNAm apresenta 1473 nucleotídeos que codifica para 490 aminoácidos. A proteína *Cyp2C29* possui homologia com a *CYP2C18* (71%) e a *CYP2C9* (70%) em humanos. Um polimorfismo do tipo *nonsense*, no éxon 2 do gene *Cyp2C29*, foi identificado por Watters *et al* (2003) em várias linhagens de camundongos resultando em uma alteração *Met106Ile* na cadeia polipeptídica (Figura 3).

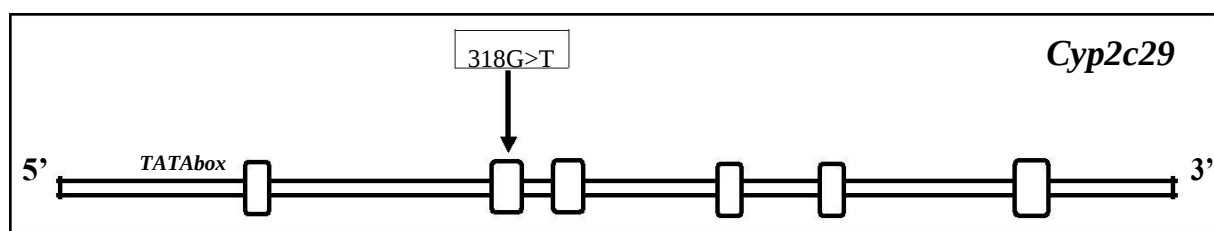


Figura 3. Desenho esquemático do gene *Cyp2c29*, indicando a localização do polimorfismo 318G>T, localizado no éxon 2, assim como as extremidades 5' (região promotora e TATAbox) e 3' (região UTR).

1.5. Polimorfismo genético de *Gstp1*

As glutationas S-transferases são responsáveis pela detoxificação celular de inúmeros compostos hidrofílicos, sintetizados no citosol ou encontrados na forma de agentes xenobióticos. São em cerca de 20 isoformas presentes em seres humanos (Windersten & Mannervik, 1995). Sua ação detoxificante é importante tanto na proteção contra o estresse oxidativo, diversas neoplasias e outras doenças degenerativas como na eliminação de metabólitos resultantes do processo de ativação de inúmeras pró-drogas (Babbitt, 2000).

O gene *GSTP1*, localizado em 11q13, codifica a isoenzima GSTP1 que está envolvida no metabolismo de compostos alogenados, moléculas de baixo peso molecular e epóxidos reativos de alguns PAHs em humanos (Dusinká *et al.*, 2001). Board *et al.* (1990) descreveram três alelos diferentes de *GSTP1*, sendo estes denominados *GSTP1**A, o alelo selvagem, *GSTP1**B e *GSTP1**C. A variante *GSTP1**B apresenta uma transição A/G no nucleotídeo 313 do éxon 5, mudando o códon 105 de ATC (Ile) para GTC (Val). O *GSTP1**C é caracterizado por duas transições de nucleotídeos, sendo a primeira, a mesma observada no *GSTP1**B, e a segunda, uma transição C/T no nucleotídeo 341 do éxon 6, resultando na mudança de GCG (Ala) para GTG (Val) no códon 114.

O alelo *GSTP1**B foi associado com o aumento da incidência de cânceres de bexiga, testículo e próstata (Harries *et al.*, 1997), laringe e faringe (Matthias *et al.*, 1998) e pulmão (Ryberg *et al.*, 1997), devido à atividade da variante *GSTP1**B. Desse modo, a variante *GSTP1**B, por apresentar menor capacidade de detoxificação dos metabólitos ativos, pode ser um fator de risco e um indicador de suscetibilidade para o câncer nos quais os PAHs estejam envolvidos na etiologia, como ocorre no caso dos carcinomas de boca, cuja incidência aumenta de modo muito importante entre os indivíduos expostos ao tabaco.

O gene *Gstp1* em *Mus musculus*, localizado no locus 19A, possui cerca de 2,5kb, com 7 éxons, RNAm de 630 nucleotídeos, que codifica para um produto de 210 aminoácidos

(Hatayama *et al.*, 1990). Ritchie *et al* (2007) observaram um polimorfismo 313A>G do tipo *nonsense*, no éxon 5 do gene *Gstp1*, em camundongos, resultando na substituição do aminoácido isoleucina por valina no códon 104 da proteína *Gstp1* (Figura 4). As proteínas *Gstp1*, em camundongos, apresentam concentrações elevadas em tecidos neoplásicos, sendo a sua expressão regulada por andrógenos (Ritchie *et al.*, 2007). Tal relação indica uma provável associação entre a *Gstp1* e o desenvolvimento espontâneo de tumores em camundongos.

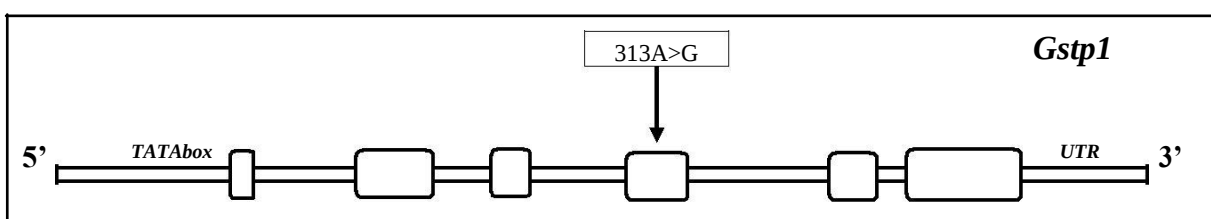


Figura 4. Desenho esquemático do gene *Gstp1*, indicando a localização do polimorfismo genético 313A>G, localizado no éxon 4, assim como as extremidades 5' (região promotora e TATAbox) e 3' (região UTR).

O uso de animais com objetivos científicos é uma prática comum, mas para que seja moralmente aceitável e apresente resultados confiáveis, é fundamental ter-se a consciência que o animal, como ser vivo, possui hábitos de vida próprios da sua espécie, apresenta memória, preserva o instinto de sobrevivência e é sensível a angústia e à dor, razões que preconizam posturas éticas em todos os momentos do desenvolvimento dos estudos com animais de experimentação (De Luca, 1996).

As pesquisas pré-clínicas em animais de experimentação resultam em descobertas científicas cujos resultados podem justificar ensaios clínicos com humanos. Estas pesquisas *in vivo* permitem a avaliação inicial quanto à dose eficaz, a dose tóxica e a dose letal do medicamento em estudo (Lima, 2001). Entretanto, deve-se ter em conta que cada etapa da manipulação desses animais precisa ser conduzida sob rigorosos padrões éticos (Otake *et al.*, 2006).

A evolução a cerca do desenvolvimento das áreas de conhecimento, tendo como ferramenta o eixo epistemológico, com especial ênfase àquelas de biologia e medicina, necessitam da obtenção de recursos de origem animal para atender necessidades humanas, como nutrição, trabalho e criação de fármacos potencialmente utilizados no tratamento de uma ampla diversidade de enfermidades. Tais necessidades repercutem no desenvolvimento de ações de experimentação animal, razão pela qual se preconizam posturas éticas concernentes aos diferentes momentos de desenvolvimento de estudos com animais de experimentação (De Luca, 1996).

2. Objetivos

2.1. Geral

— Identificar os perfis alélicos dos genes *Cyp2C29* e *Gstp1* em camundongos BALB/c na tentativa de estabelecer uma dose-resposta individual da Ciclofosfamida no tratamento do Sarcoma 180 (S180), baseado na suscetibilidade alélica dos genes de bioativação e de detoxificação da droga.

2.2. Específicos

— Determinar a frequência alélica dos genes *Cyp2c29* e *Gstp1* em 40 camundongos divididos em grupos caso-controle, submetidos ao enxerto pela linhagem celular de S180 e tratados com a Ciclofosfamida;

— Correlacionar os perfis alélicos dos genes *Cyp2c29* e *Gstp1* em grupos caso-controle com a redução do tumor, confrontando com os dados anatomopatológicos obtidos a partir dos órgãos analisados.

3. Material e métodos

3.1. Grupo amostral

Foram utilizados 80 camundongos da linhagem BALB/c (isogênicos), machos, oriundos da criação mantida pelo Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os animais, assim que chegaram ao Laboratório de Patologia, foram submetidos à quarentena, e posteriormente, alojados em quatro grupos de dez, em gaiolas de polipropileno (30 x 20 x 13 cm) com tampa de ácido inoxidável e maravalha de pinho branco. Água da rede de abastecimento pública filtrada e ração commercial para camundongos (Nutrilabor, Guabi) foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento.

A higienização e troca das gaiolas e camas de maravalha foram realizadas duas vezes por semana (terça e sexta-feira) sempre no período da manhã. As condições ambientais para a acomodação dos animais no Biotério de Experimentação do IPTSP foram: temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2$, umidade relativa do ar em torno de 70% e ciclo claro-escuro constante, sendo o período claro das 07 às 19h.

3.2. Cálculo da DL₅₀

Após o período de quarentena no Biotério de Experimentação, 40 camundongos, com idade entre 6 e 8 semanas com o peso no intervalo de 21 a 26 gramas, foram selecionados ao acaso a um dos cinco grupos. Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos para uma maior acomodação respeitando o limite de animais por caixa. Animais fora do peso e que apresentavam quaisquer alterações anatomofisiológicas foram excluídos do estudo. Os animais foram divididos em grupos segundo as doses 25, 50, 100, 250 e 500mg/kg de ciclofosfamida.

Os camundongos foram devidamente marcados com a solução corante de ácido pícrico a 0,2%, em regiões anatômicas padronizadas para uma melhor identificação do animal. Todas as gaiolas foram identificadas com etiquetas que continham dados sobre a linhagem de camundongos utilizada, grupo e datas referentes ao nascimento, a inoculação da droga, coleta de amostras e eutanásia.

3.2.1. Administração da Ciclofosfamida

A Ciclofosfamida utilizada no estudo apresentava-se como pó extemporâneo obtido comercialmente como Genuxal (Baxter oncology GmbH, Frankfurt, Alemanha). A droga foi gentilmente cedida pelo CEBROM (Centro Brasileiro de Radioterapia, Oncologia e Mastologia de Goiânia). A ampola de Genuxal (1g) foi diluída em solução salina a 0,9% resultando em uma concentração estoque de 96mg/mL. A droga foi administrada via intraperitoneal, seguindo a dose respectiva de cada grupo. Os camundongos foram acompanhados, diariamente, após a data de inoculação da droga durante sete dias. O peso dos animais foi obtido no primeiro e no último dia do experimento. A eutanásia foi realizada no 8º dia do experimento, onde todos os animais foram pesados, sendo retirados os rins, baço, fígado, pulmões e coração para pesagem e análise anatomopatológica dos mesmos.

3.3. Ensaio pré-clínico

Para a análise do grau de toxicidade e suscetibilidade dos genes *Cyp2c29* e *Gstp1*, 40 camundongos foram selecionados, com idade entre 7 e 9 semanas com o peso no intervalo de 21 a 26 gramas, selecionados ao acaso. Foram criados quatro grupos (A, B, C e D), no qual cada grupo foi tratado seguindo um protocolo pré-estabelecido (Tabela I). Os camundongos foram devidamente marcados com a solução corante de ácido pícrico a 0,2%, em regiões

anatômicas padronizadas para uma melhor identificação do animal. Todas as gaiolas foram identificadas com etiquetas que continham dados sobre a linhagem de camundongos utilizada, grupo e datas referentes ao nascimento, a inoculação da droga e do tumor, coleta de amostras e eutanásia.

Tabela I. Distribuição amostral dos grupos caso-controle.

Grupos	Transplante da linhagem de Sarcoma 180 (120µL)	Tratamento com ciclofosfamida (50mg/kg/dia)
A (controle)	Não	Não
B (controle tumoral)	Sim	Não
C (casos)	Sim	Sim
D (controle da droga)	Não	Sim

3.3.1. Linhagem tumoral do Sarcoma 180 (S-180)

O Sarcoma 180 (S-180) ou Tumor de Crocker (ATCC-TIB66) é um tumor indiferenciado que foi descoberto em ratos albinos machos em 1914 (WAL *et al.*, 2002). É um tumor bastante utilizado em estudos experimentais, por isso com disseminação e índice de proliferação determinados, permitindo o estudo comparativo no uso de substâncias potencialmente genotóxicas.

A linhagem tumoral de Sarcoma 180 (S180) foi obtida junto ao Laboratório de Genética, ICB/UFG, onde as células tumorais foram armazenadas e cultivadas *in vivo*, em camundongos *BALB/c*, que fornecerão células tumorais a serem transplantadas nos animais em estudo. Foram injetados 200`L de células tumorais, provenientes da cavidade peritoneal dos animais de suporte, nos animais dos Grupos B e C, via intramuscular, na região femural da pata posterior esquerda de cada camundongo.

3.3.2. Tratamento com a Ciclofosfamida (CF)

A ciclofosfamida foi administrada via intraperitoneal na dose de 250 mg/kg, por um período de cinco dias alternados, a partir da data de instalação do S-180 (12º dia). No momento do tratamento foram inoculados 200`L de ciclofosfamida (50mg/kg/dia) diluída em salina (0.9%). O tratamento do Sarcoma 180 seguiu o protocolo sugerido por Watters *et al.* (2003), com modificações. A tabela II mostra delineamento experimental realizado no tratamento do S-180 com a ciclofosfamida em camundongos BALB/c.

Tabela II. Distribuição das etapas realizadas durante a experimentação animal no tratamento do S-180 com a ciclofosfamida em camundongos BALB/c.

Fases	Dias	Procedimentos experimentais
I	1 ao 12	Realização do transplante de células do Sarcoma 180 (5.10^6 células) Coleta dos dados biométricos e avaliação do crescimento tumoral
II	12 ao 21	Tratamento quimioterápico com a ciclofosfamida (50mg/kg/dia) Coleta dos dados biométricos e análise dos achados clínicos
III	21 ao 27	Realização da eutanásia e coleta de amostras

3.3.3. Acompanhamento e análise dos aspectos clínicos

Os camundongos foram acompanhados, diariamente, desde a data de transplante das células tumorais do Sarcoma 180 (1º dia), até a data em que eles foram submetidos à eutanásia (27º dia). Dados como o peso, tamanho do tumor, aspectos fisiológicos (ex.: excreção), neurológicos (ex.: depressão) e anatômicos (ex.: locomoção) foram devidamente observados e registrados.

3.3.4. Eutanásia dos animais, coleta e armazenamento dos órgãos

Sete dias após a inoculação da última dose da ciclofosfamida, foram coletadas amostras de sangue heparinizado, em tubos *ependorff* de 2mL, obtidos a partir do plexo orbital, devidamente rotulados e armazenados em *freezer* a -20°C na forma de banco de amostras, para serem utilizadas na identificação do polimorfismo dos genes *Cyp2c29* e *GSTp1*

por PCR. Posteriormente, os animais foram submetidos à eutanásia pelo método de inalação por éter etílico e a necropsia foi realizada a partir de uma ampla incisão longitudinal e outra transversal na parede abdominal, sendo coletados os rins, o baço, o fígado, os pulmões e o coração para análise macroscópica.

3.3.5. Análise anatomopatológica dos rins, baço, fígado, pulmões e coração

Os rins, o baço, o fígado, os pulmões e o coração foram analisados segundo critérios anatomopatológicos previamente estabelecidos pelo Laboratório de Patologia, IPTSP. Parâmetros como dimensões, coloração, consistência, peso, viscosidade desses órgãos nos diferentes grupos de estudo permitirão auxiliar na avaliação da citotoxicidade e eficiência de cura do tratamento da Ciclofosfamida em Sarcoma 180.

3.4. Identificação dos Polimorfismos dos genes *Cyp2C29* e *Gstp1*

A extração de DNA das amostras obtidas foi executada com uso do kit de extração Wizard® Genomic (Promega), de acordo com o protocolo de extração sugerido pelo próprio fabricante. As amostras depois de extraídas foram rotuladas e armazenadas em *freezer* a -20°C. Para a genotipagem específica dos alelos *Cyp2c29* e *Gstp1* foi utilizado o protocolo sugerido por Watters e cols., 2003. Os *amplicons* obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e, após coloração com Brometo de etídio (10mg/mL), os resultados foram analisados pelo sistema radioanalítico de imagens *Image Master VDS®* (Pharmacia Biotech). A sequência do *primers* utilizados, a enzima de restrição correspondente e o tamanho do fragmento amplificado podem ser observados na Tabela III.

Tabela III. Características gerais dos *primers* utilizados para a identificação genotípica dos genes *Cyp2c29* e *Gstp1*.

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>	<i>Polimorfismo</i>	<i>Locus</i>
<i>Cyp2c29</i>	f1 5' – GCATGAATGAGGTTTACAC – 3'	318 G>T	19D
	f2 5' - TGAGTGTGGAAACAATAGAG – 3'		
<i>Gstp1</i>	p1 5' - AGGGATCAGTCATGCTGTC – 3'	313A>G	19A
	p2 5' – GACCTCTCCTGAAGCTGTC – 3'		

3.5. Análise estatística e determinação da sobrevida

Os dados do cálculo da DL₅₀, assim como todos os dados dos aspectos clínicos e anatomopatológicos foram armazenados em planilhas do *software* Excel®, 2005. Para a análise de variância entre as médias obtidas no cálculo da DL₅₀ foi utilizado o teste de ANOVA. Para a comparação entre as médias obtidas na fase experimental do tratamento S-180 com a ciclofosfamida foi utilizado o teste *t* de *Student*. Em todos os casos, o teste foi de caráter bidirecional e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os cálculos estatísticos foram utilizados com o auxílio do *software* BioEstat (3,0). Na identificação do polimorfismo dos genes *Cyp2c29* e *Gstp1* foi utilizado o teste de χ^2 , com o auxílio do *software* BioEstat (3.0). Foi considerado valor estatisticamente significativo quando $p < 0,005$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Cálculo da DL₅₀

A média dos pesos corporais dos animais pré-inoculação da droga foi de 22g. Os resultados da administração da ciclofosfamida nos animais apresentaram diferenças anatomopatológicas importantes para cada grupo de dose estabelecida. Conforme ilustrado na Figura 5, observa-se que houve redução na diferença de peso entre o dia pós-morte e de pré-inoculação dos camundongos cuja dose administrada foi 250mg/kg.

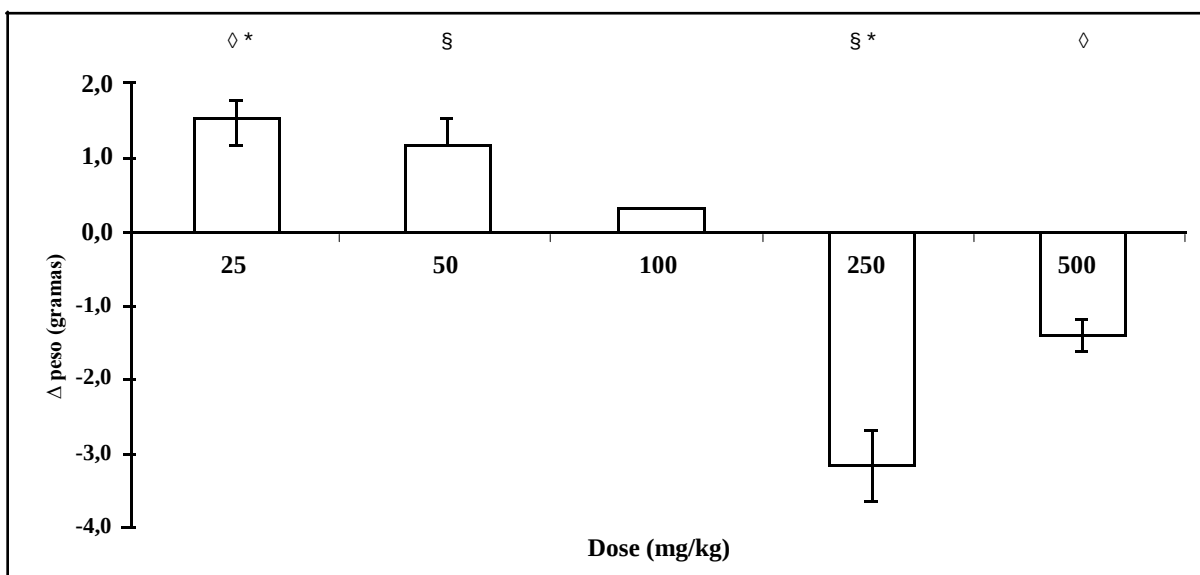


Figura 5. Variação da diferença da média dos pesos corporais dos camundongos *BALB/c* submetidos a doses diferentes de ciclofosfamida, do dia 8 pós-morte e do dia 1 da pré-inoculação.

Entretanto, camundongos cuja a dose administrada foi de 500mg/kg tiveram menor redução de peso quando comparados com os camundongos do grupo de 250mg/kg. Esse resultado pode ser justificado pelos efeitos crônico, após 24h, e agudo, até 24h, a partir da inoculação da droga. Uma vez que todos os camundongos submetidos a 500mg/kg foram a óbito dentro de 24h, esses efeitos podem ser categorizados como agudos. Por outro lado, as doses entre 25 e 250mg/kg resultaram em efeitos crônicos, cujos sintomas foram detectados

após 24h de inoculação. Três animais da dose de 250mg/kg apresentaram óbito ao final de uma semana.

A DL₅₀ da ciclofosfamida calculada obtida a partir da inoculação nos camundongos BALB/c, Segundo o modelo probits, foi de 287mg/kg. Quanto à toxicidade, a ciclofosfamida ocasionou redução do peso corporal em diferentes doses administradas. Os rins, baço, fígado, coração e pulmões foram os órgãos mais comumente afetados. A avaliação da toxicidade demonstrou alterações de diferentes graus de congestão observados no baço, fígado e coração.

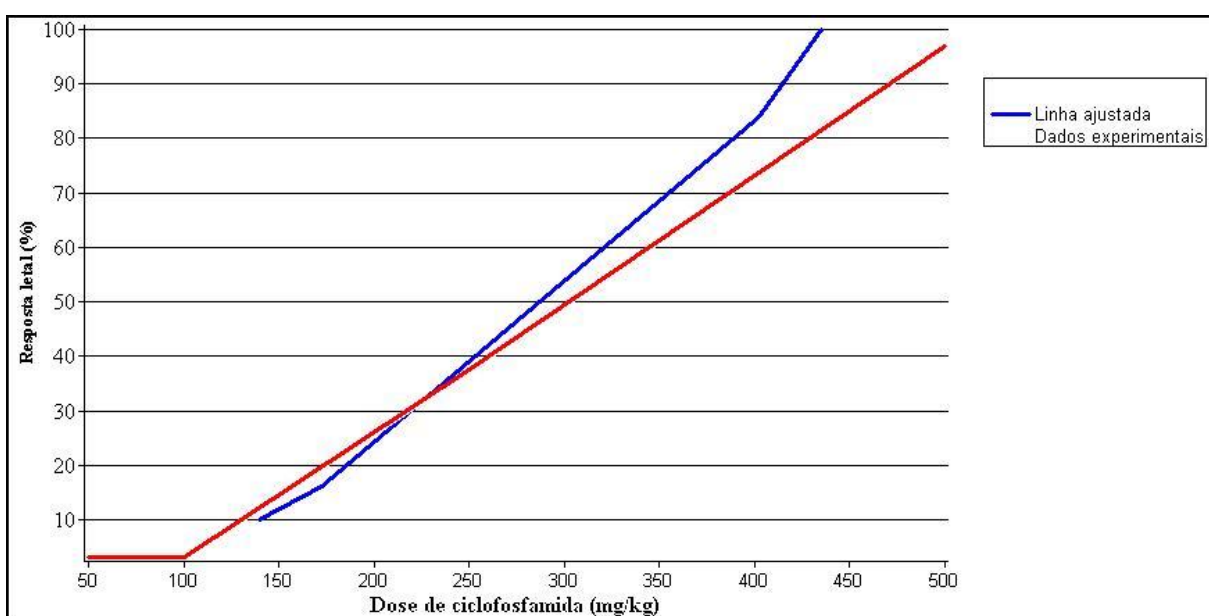


Figura 6. Cálculo da Dose letal media (DL₅₀) da ciclofosfamida em camundongos BALB/c, segundo o modelo Probits.

Após a morte dos camundongos, uma incisão longitudinal e outra transversal foram realizadas para a retirada e pesagem dos rins, o baço, o fígado, o coração e os pulmões (Tabela IV). Se relacionado o peso dos órgãos com as doses administradas, puderam-se observar diferenças significativas entre diferentes doses, principalmente no fígado e no coração. Uma vez que a ciclofosfamida é uma droga de atividade citostática (Almeida *et al.*, 2005), esses resultados sugerem que as diferentes doses administradas acarretaram na

diminuição do peso dos rins, pulmões, coração, fígado e baço. Quanto à massa corporal do animal, a dose de ciclofosfamida administrada foi inversamente proporcional entre as doses de 25 e 250mg/kg.

Tabela IV. Variação da média da massa corporal (Δm), em gramas, dos camundongos BALB/c de acordo com as diferentes doses de ciclofosfamida.

Órgãos	25mg/kg	50mg/kg	100mg/kg	250mg/kg	500mg/kg
Rim Esquerdo	0,194 [*]	0,180	0,164	0,149 [*]	0,175
Rim Direito	0,189 [*]	0,187 [†]	0,171	0,147 ^{*†}	0,179
Baço	0,108 [*]	0,102 [†]	0,079	0,055 ^{*†}	0,166
Fígado	1,322 ^{*†}	1,127 [§]	1,087 ^{†+}	0,863 ^{*†§+}	1,226 [‡]
Coração	0,119 ^{*§}	0,116 ^{+£}	0,100 [◊]	0,089 ^{‡§£}	0,169 ^{‡◊+*}
Pulmões	0,152 ^{*†}	0,179	0,161	0,198 [*]	0,200 [†]
Massa corporal do animal	24,163	22,900	21,938	18,900	20,063

*†‡◊+§£ p<0,05 – Teste de ANOVA.

Na Tabela V encontra-se os dados relacionados à classificação macroscópica dos órgãos em congestões discreta, moderada e acentuada. Segundo os dados obtidos houve diferenças significativas nos graus de congestão estabelecidos para cada órgão, principalmente o fígado, o baço e o coração.

Tabela V. Frequência da presença dos graus de congestão dos órgãos analisados nos camundongos BALB/c submetidos a doses diferentes de ciclofosfamida.

Dose (mg/kg)	Graus de Congestão	RE % (n)	RD % (n)	B ⁺ % (n)	F [*] % (n)	P % (n)	C [£] % (n)
25	Discreta	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
	Moderada	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
	Acentuada	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
50	Discreta	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
	Moderada	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
	Acentuada	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
100	Discreta	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	25 (2/8)	0 (0/8)
	Moderada	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
	Acentuada	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
250	Discreta	37,5 (3/8)	50 (4/8)	0 (0/8)	12,5 (1/8)	62,5 (5/8)	0 (0/8)
	Moderada	25 (2/8)	25 (2/8)	0 (0/8)	12,5 (1/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
	Acentuada	25 (2/8)	12,5 (1/8)	12,5 (1/8)	12,5 (1/8)	37,5 (3/8)	0 (0/8)
500	Discreta	12,5 (1/8)	12,5 (1/8)	12,5 (1/8)	12,5 (1/8)	12,5 (1/8)	12,5 (1/8)
	Moderada	75 (6/8)	75 (6/8)	75 (6/8)	75 (6/8)	50 (4/8)	75 (6/8)
	Acentuada	12,5 (1/8)	12,5 (1/8)	12,5 (1/8)	12,5 (1/8)	37,5 (3/8)	12,5 (1/8)

Legenda: RE – Rim Direito, RE – Rim Esquerdo, B - Baço, F - Fígado, P - Pulmão e C - Coração.

4.2. Avaliação da eficácia e toxicidade da ciclofosfamida

A avaliação da eficácia e toxicidade da ciclofosfamida foi dividida em três fases: Fase I, que corresponde ao desenvolvimento do tumor, Fase II, que corresponde ao período de quimioterapia e por ultimo, Fase III, fase de avaliação terapêutica e toxicidade da droga. Os dados da Fase I demonstram que os animais dos grupos B e C, não enxertados com o Sarcoma 180, apresentam um aumento na massa corporal cerca de 2,2 vezes, durante os doze primeiros dias do experimento, comparados com os animais do grupo A e D ($p < 0,05$) [Figura 7].

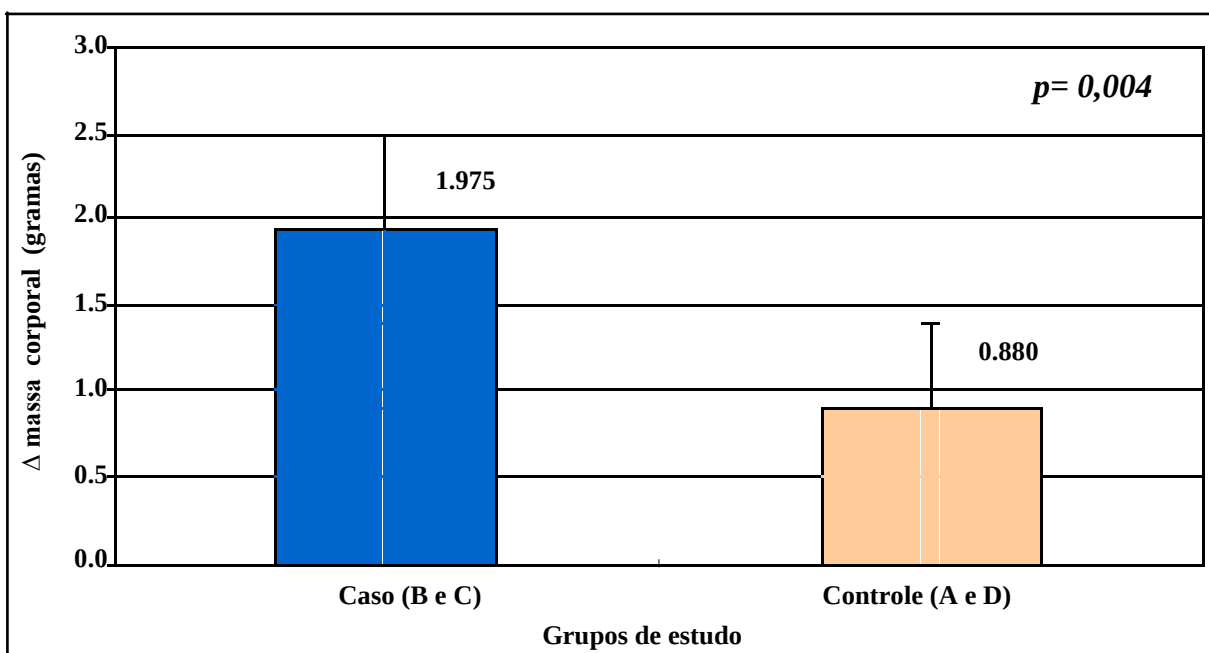


Figura 7. Variação da massa corporal (Δm), em gramas, durante a Fase I do crescimento tumoral do S-180, em camundongos BALB/c.

A média das áreas da pata posterior esquerda dos animais dos grupos B e C, durante a Fase I apresentaram um aumento de tamanho de aproximadamente, 1,8 vezes em relação aos animais dos grupos A e D, sendo observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) [Figura 8]. Portanto, tanto a variação do massa corporal (Δm), quanto o cálculo da área da pata posterior esquerda, permitiu avaliar de forma satisfatória a instalação do tumor na região intramuscular da pata posterior esquerda de todos os camundongos transplantados com

Sarcoma 180, passivo de observação macroscópica a partir do 11º dia da realização do enxerto. Esses dados reforçam a utilização do Sarcoma 180, como modelo de carcinogênese em linhagens isogênicas de camundongos *BALB/c*.

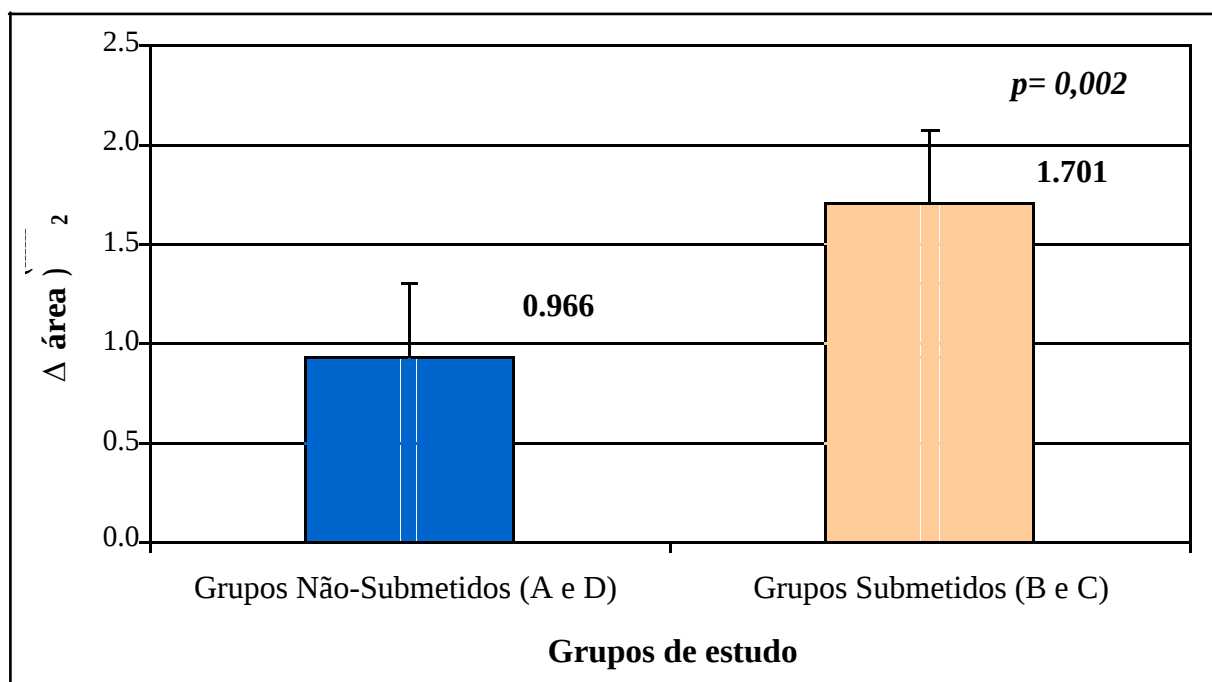


Figura 8. Variação da área da pata posterior esquerda (ΔA), em mm^2 , durante a Fase I do crescimento tumoral do S-180, em camundongos *BALB/c*.

Poucos sinais clínicos, como alterações nas fezes, pêlos eriçados, reflexo e letargia foram identificados nos animais que receberam o transplante do S-180 (Grupo B e C), não tendo diferenças significantes quando comparados aos animais dos grupos A e D. O comprometimento da locomoção observado em 40% (4/10) dos animais do grupo B no 14º dia sugere que o tumor possui alta capacidade proliferativa, sendo comprovado com o óbito do camundongo B3 (Grupo B), no 23º dia do experimento.

Wal *et al.* (2003) descreveram que os camundongos quando inoculados via subcutânea, chegam ao óbito por volta do 28º dia após a inoculação do S-180. Portanto o transplante via intramuscular realizado no presente estudo obteve uma proliferação mais

acentuada do que comparado ao transplante realizado via subcutânea, com um maior comprometimento da locomoção e o aumento da expansão a partir do local transplantado.

A Figura 9 ilustra a evolução do Sarcoma 180, pela análise da pata posterior esquerda (PPE) dos animais, após o término do tratamento com a ciclofosfamida e a data da realização da eutanásia (Fase III). A variação das diferenças das médias da área (ΔA) entre os animais do Grupo C (caso) e do Grupo B (controle do tumor) submetidos ao transplante de S-180, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Dunham & Stewart (1953) sugerem que a invasão para tecidos vizinhos, como o tecido esquelético e conjuntivo, são manifestações biológicas que podem falsear os dados biométricos obtidos pela variação da área da PPE.

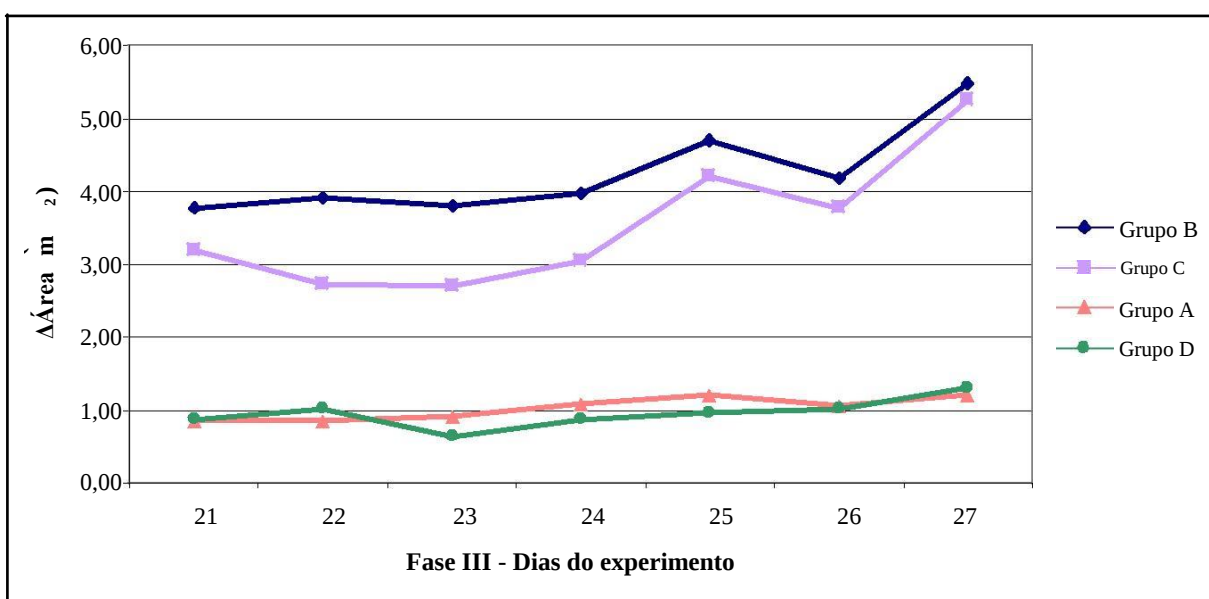


Figura 9. Variação da área da pata posterior esquerda (ΔA), em mm^2 , durante a Fase III do crescimento tumoral do S-180, em camundongos BALB/c.

Considerando-se que os camundongos do Grupo C submetidos ao enxerto com S-180 e tratados a partir do 12º dia do experimento, não apresentaram redução do ΔA , pode-se inferir, que a evolução tumoral pode ter sido um importante fator negativo no tratamento do S-180. Na terapia neo-adjuvante, cujo o objetivo principal é a redução do tumor, a análise da

expansão tumoral feita exclusivamente, pela observação macroscópica, não foi suficiente para obter êxito no tratamento do S-180. Dessa forma, estudos que preconizam a avaliação de fluídos biológicos e o acompanhamento por análise de imagem combinados com o tratamento em diferentes estágios da evolução tumoral, poderão contribuir de forma gradativa para o efeito dose-resposta da droga nos animais.

Não foram observadas diferenças significativas entre as medias da massa corporal Δm entre os grupos no início do estudo (Fase I). Por outro lado, os animais dos grupos A e C apresentaram o Δm estatisticamente diferentes com os animais dos grupos B e D durante a Fase III, indicando que a análise da variação massa corporal é uma ferramenta útil na avaliação do tratamento (Figura 10).

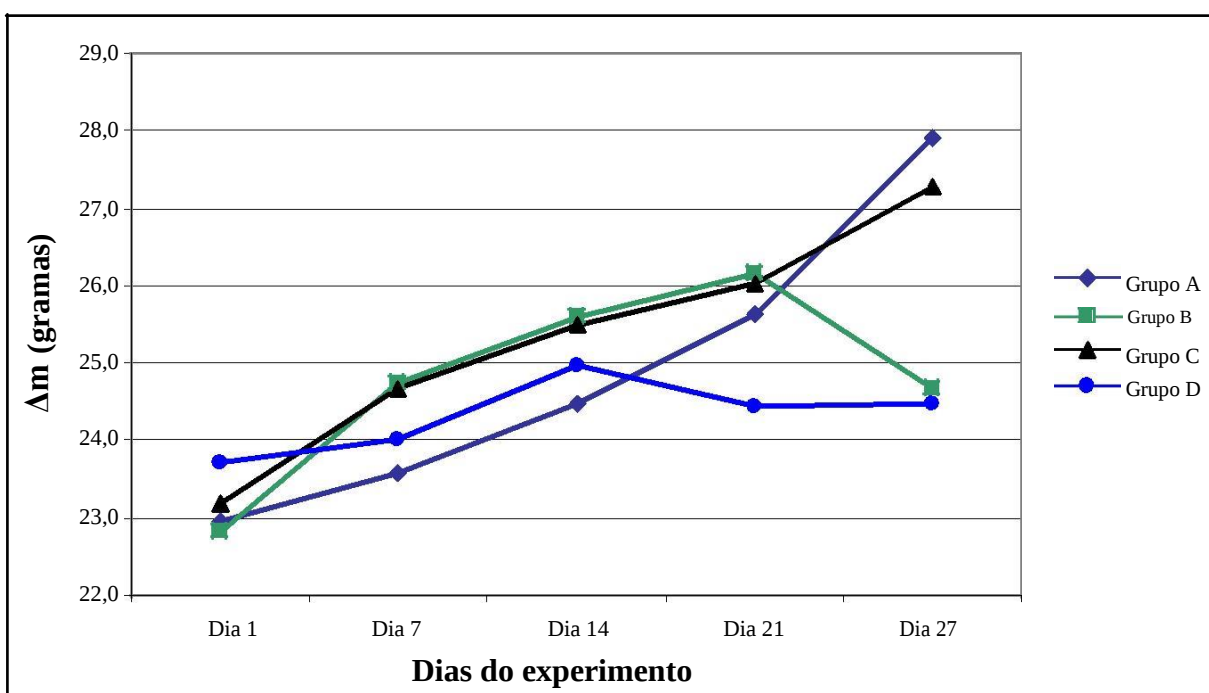


Figura 10. Avaliação da massa corporal (Δm), em gramas, durante todo o experimento, em camundongos BALB/c.

Após o tratamento e durante a fase de avaliação da Resposta à ciclofosfamida foi possível observar a redução da massa corporal dos animais não-tratados pela droga (Grupo B), quando comparados ao contínuo ganho da massa corporal dos animais tratados com a

droga (Grupo C). Os animais que receberam apenas a droga (Grupo D) apresentaram redução da massa corporal, com comitadamente com os animais do Grupo B, durante a Fase III. Esta observação deve-se provavelmente ao efeito adverso ocasionado pelo processo de Carcinogênese, nos animais do Grupo B, e pelo efeito imunossupressor da droga nos animais do Grupo C.

A análise anatomopatológica permitiu avaliar o grau de toxicidade da resposta ao tratamento com ciclofosfamida, identificando quais órgãos foram comumente afetados, além de sugerir possíveis efeitos adversos que surgiram durante e após o tratamento com o quimioterápico. A Figura 11 ilustra os dados obtidos a partir da massa dos órgãos calculados após a eutanásia. Houve diferenças significativas entre a massa do fígado e baço. Foi identificada hepatoesplenomegalia em todos os animais do Grupo C e 80% dos animais do Grupo B, ambos transplantados com S-180.

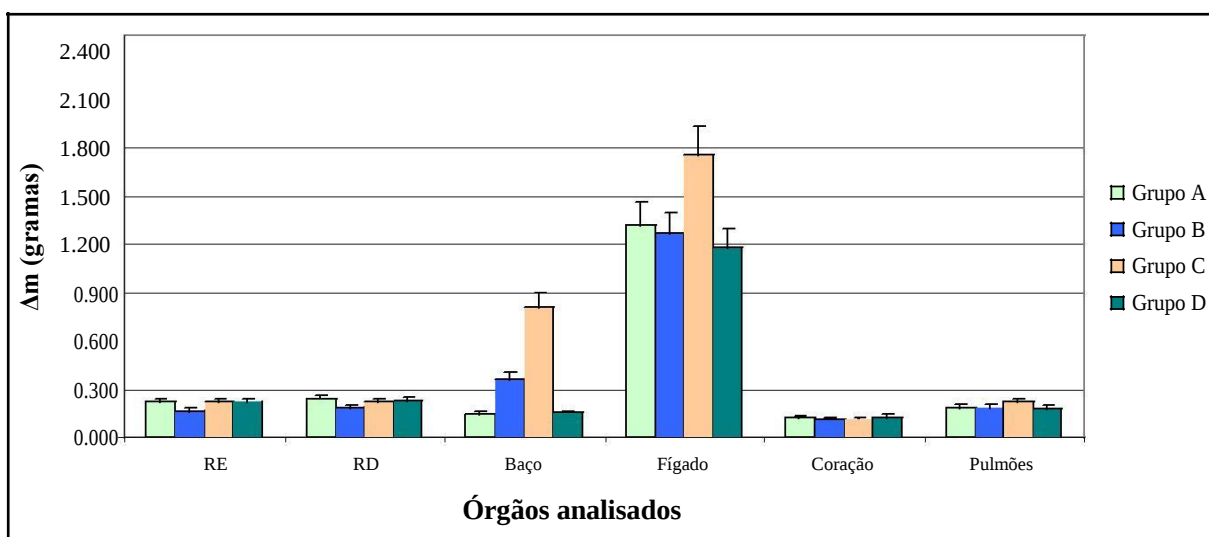


Figura 11. Avaliação do grau de toxicidade, segundo a massa (em gramas) dos órgãos comumente relacionados à resposta ao tratamento da ciclofosfamida, em camundongos BALB/c.

Durante a realização da necrópsia foi observada cistite hemorrágica em 20% (2/10) dos camundongos submetidos apenas à inoculação da droga (Grupo D). Esse dado corrobora

com os achados clínicos de Wal *et al.* (2002) que descreveram esse como o principal efeito adverso relacionado ao tratamento pela ciclofosfamida. Zhang *et al.* (2006), sugeriram que a manifestação clínica da cistite hemorrágica pode ser ocasionada pelo metabólito tóxico, denominado acroleína, da ciclofosfamida.

4.3. Investigação do polimorfismo genético de *Cyp2c29* e *Gstp1* no processo de bioativação e detoxificação da ciclofosfamida

As frequências genotípicas e alélicas dos genes *Cyp2c29* e *Gstp1* encontram-se distribuídas na Tabela VI e VII. De acordo com o teste de Hardy-Weinberg todos os grupos de tratamento encontram-se em equilíbrio. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os animais tratados (Grupo C) e os não tratados (Grupo B). Watters e cols., 2003 não observaram diferenças significativas entre camundongos de diversas linhagens tratados com ciclofosfamida para o gene *Cyp2c29*. Provavelmente, a homogeneidade da distribuição genotípica entre os camundongos da linhagem BALB/c dá-se em função de serem todos isogênicos, preservando a identidade genética dos animais.

Estudos de experimentação animal que utilizem animais de diferentes linhagens lisogênicas ou não lisogênicas devem ser realizados para investigar de forma mais abrangente o perfil genético da espécie *Mus musculus*. O fato de não ter ocorrido a associação entre as frequências genotípicas dos genes de biometabolismo da ciclofosfamida, *Cyp2c29* e *Gstp1* e o fenótipo apresentado pelos animais durante o experimento não descarta a hipótese da Resposta individual da droga mediado o polimorfismo genético de tais genes, pois assim como no trabalho de Watters e cols. (2003) a variação é dependente de inúmeros fatores genéticos e epigenéticos que podem influenciar na análise experimental.

Tabela VI. Distribuição das frequências genotípicas de *Cyp2c29* e *Gstp1* em camundongos BALB/c submetidos à quimioterapia pela ciclofosfamida, no tratamento do Sarcoma 180.

Gene	Grupo A n (%)	Grupo B n (%)	Grupo C n (%)	Grupo D n (%)	X^2	p
<i>Cyp2c29</i>						
G/G	8 (80)	7 (70)	8 (80)	7 (70)	3,13	0,79
G/T	2 (20)	2 (20)	1 (10)	3 (30)		
T/T	0 (0)	1 (10)	1 (10)	0 (0)		
<i>Gstp1</i>						
G/G	6 (75)	7 (70)	6 (60)	7 (70)	5,48	0,48
G/A	2 (25)	3 (30)	3 (30)	0 (0)		
A/A	0 (0)	0 (0)	1 (10)	0 (0)		

Tabela VII. Distribuição das frequências alélicas de *Cyp2c29* e *Gstp1* em camundongos BALB/c submetidos à quimioterapia pela ciclofosfamida, no tratamento do Sarcoma 180.

Gene	Grupo A %	Grupo B %	Grupo C %	Grupo D %	X^2	p
<i>Cyp2c29</i>						
G	90	80	85	85	3,92	0,27
T	10	20	15	15		
<i>Gstp1</i>						
G	87,5	85	75	100	28,0	0,001
A	12,5	15	25	0		

Para as pesquisas básicas no campo da Biologia, os camundongos têm sido os animais de escolha. São facilmente manuseáveis, possuem características geneticamente bem definidas e um ciclo de procriação rápido (Andersen *et al.*, 2004). O valor da pesquisa básica em um sistema que utilize camundongo é realçado pelo enorme impacto que esta pesquisa tem na intervenção clínica da doença humana (Goldsby *et al.*, 2002).

Linhagens endocruzadas de camundongos isogênicos, isto é, animais geneticamente idênticos (singênico) produzidos por endogamia são utilizados com a finalidade de controlar as variações experimentais causadas por diferenças na composição genética dos animais experimentais (Abbas *et al.*, 2003; Goldsby *et al.*, 2002).

As linhagens isogênicas são desenvolvidas por cruzamentos repetidos entre as ninhadas de irmãos e irmãs. A endogamia repetida por 20 gerações, geralmente, fornece uma linhagem cujas ninhadas são homozigóticas em cerca de 90% de todos os *loci*. Mais de 150 diferentes linhagens endocruzadas de camundongos estão disponíveis para a pesquisa básica, sendo que os *BALB/c*, produzido pela primeira vez por Macdowell, são muito utilizados no Brasil (Andersen *et al.*, 2004; Goldsby *et al.*, 2002).

Dessa forma, os dados obtidos pela análise molecular e o fato da população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg inferem que alta frequência de homozigotos observados entre os camundongos, confirmam a isogênicidade dos camundongos *BALB/c* em estudos experimentais. Tal observação foi fundamental para minimizar os efeitos adversos do tratamento que, porventura, poderiam ocorrer caso a linhagem utilizada não fosse endogâmica. Por outro lado, para a avaliação de polimorfismo genéticos, os camundongos *BALB/c* pelo fato de serem singênicos, não são recomendados, a não ser que sejam comparados com outras linhagens, isogênicas ou não, aumentando a variabilidade genética do estudo.

5. Conclusões

A avaliação da toxicidade da ciclofosfamida em camundongos *BALB/c* indicam que doses acima de 500mg/kg tem um forte efeito letal, em um período de 24h. A DL₅₀ encontrada foi de 287mg/kg. A hiperplasia de rins, baço, fígado, coração e pulmões foi a principal manifestação clínica observada, provavelmente, devido a atividade inflamatória do quimioterápico. Dentre os órgãos mais afetados por diferentes graus de congestão, o baço, o fígado e o coração se destacaram como os órgãos mais afetados pela toxicidade da atuação da ciclofosfamida.

Os resultados encontrados na evolução do Sarcoma 180, utilizando 5.10^6 células (200μL), via intramuscular, em camundongos *BALB/c*, permitiu a utilização de forma eficaz em estudos *in vivo* na avaliação do polimorfismo de genes de biometabolismo. Os ensaios pré-clínicos apontam diferenças anatomopatológicas importantes na instalação do tumor, eficácia e toxicidade no tratamento da ciclofosfamida nos subgrupos avaliados.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas e genóticas de *Cyp2c29* e *Gstp1* na tentativa de associar tais frequências com a resposta individual ao crescimento tumoral e ao tratamento com a ciclofosfamida, nos animais estudados. Tal observação deve-se provavelmente, à característica da linhagem *BALB/c* serem isogênicas, não descartando a possibilidade de associação entre o genótipo e o fenótipo dos camundongos submetidos ao transplante de Sarcoma 180 e o tratamento com a ciclofosfamida.

Estudos que preconizem a utilização de testes toxicológicos combinados à avaliação anatomopatológica e investigação da variabilidade genética pode oferecer a padronização de protocolos de tratamento de diversos quimioterápicos.

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



ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS

Goiânia, 30 de junho de 1998.

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

Prezada Sra.,

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

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

Colocamo-nos ao seu inteiro dispor para esclarecimentos necessários.

Cordiais Saudações.


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

ANEXO 2. Parecer favorável do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Goiás.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PROTOCOLO
043/2007

Goiânia, 02 de outubro de 2007

PARECER CONSUBSTANCIADO

I. IDENTIFICAÇÃO:

Título do projeto: Avaliação do potencial genotóxico dos novos compostos de rutênio utilizando testes cito genéticos in vitro

Pesquisador Responsável: Alessandra de Santana Braga B. Ribeiro- ICB

Pesquisador Participante: Elisângela de Paula Silveira Lacerda- ICB

Local de realização: ICB I

Área Temática: II

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto de acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões).


Profa Dra Rina Goreti Amaral
Coordenadora do COEP/UFG

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas, A; Lightman, AH; Pober, JS. *Imunologia Celular e Molecular*. 4^{ed}. **Rio de Janeiro: Revinter** 2003; 50p.
2. Abdel-Rahman, SZ; El-Zein, RA; Anwar, WA; Au, WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. **Cancer Lett.** 1996; 10: 229-233.
3. Achutti, A & Menezes, AMB. Epidemiologia do tabagismo. In: *Guia Nacional de Prevenção e Tratamento do Tabagismo*. Rio de Janeiro: **Vitrô Comunicação & Editora** 2001. p.9-27.
4. ACS: American Cancer Society. Laryngeal & hipopharyngeal cancer. 2002. Acesso em: <http://www.cancer.org/>. 20/04/08.
5. Ahmed, KA; Robbins, KT; Wong, F; Salazar, JE. Efficacy of concomitant chemoradiation and surgical salvage for N3 nodal disease associated with upper aerodigestive tract carcinoma. **Laryngoscope** 2000; 110(11):1789-93.
6. Aktas, D; Ozen, H; Atsu, N; Tekin, A; Sozen, S; Tuncbilek, E. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism in bladder cancer patients. A marker for invasive bladder cancer? **Cancer Genet Cytogenet** 2001; 125:1-4.
7. Albernaz, PLM; Fukuda, Y; Ganança, MM; Munhoz, MSL. *Otorrinolaringologia para o clínico geral*. São Paulo: **BYK** 1997. 262p.
8. Albertini, RJ. Biomarker responses in human populations: towards a worldwide map. **Mutat. Res.** 1999; 428: 217-226.
9. Almeida, VL; Leitão, A; Reina, LDCB; Montanari, CA; Donnici, CL; Lopes, MT. Câncer E Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos E Ciclo-Celular Não Específicos Que Interagem Com O DNA: Uma Introdução. **Quim. Nova** 2005; 28(11): 118-129.
10. Alonso, JM. Conservative surgery of the cancer of the larynx. **Trans. Amer. Acad. Ophthalm. and Otolaryngology** 1947; 51: 633-642.

11. Amorim, LMF; Lotsch, PF; Simão, TA; Gallo, CVM; Pinto, LFR. Analysis of CYP1A1 exon 7 polymorphisms by PCR-SSCP in a Brazilian population and description of two novel gene variations. **Mutat. Res.** 2004; 547: 35-40.
12. Andersen, M; D'Almeida, V; Ko, GM; Kawakami, R; Martins, PJF; Magalhães, LE; Tufik, S. Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação. 1^{ed}. São Paulo: UNIFESP 2004; 122p.
13. Andersson, BS; Mroue, M; Britten, RA; Murray, D. The role of DNA damage in the resistance of human chronic myeloid leukemia cells to cyclophosphamide analogues. **Cancer Research** 1994; 54(20): 5394-400.
14. Ankathil, R; Mathew, A; Joseph, F; Nair, MK. Is oral cancer susceptibility inherited? Report of five oral cancer families. **Eur. J. Cancer B. Oral. Oncol.** 1996; 32b(1): 63-7.
15. Antilla, S; Hietanen, E & Vainio, M. Smoking and peripheral type of cancer are related to high levels of pulmonary cytochrome – P450 IA in lung cancer patients. **International Journal Cancer** 1991. 47:681-685.
16. Anttilla, S; Hietanen, E; Vainio, H; Camus, AM; Gelboin, HV; Park, SS; Heikkila, L; Karjalainen, A; Bartsch, H. Smoking and peripheral type of cancer are related to high levels of pulmonary cytochrome P450IA in lung cancer patients. **Int. J. Cancer** 1991; 47: 681-685.
17. Anwar WA, Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA. Genetic polymorphism of GSTM1, CYP2E1 and CYP2D6 in Egyptian bladder patients. **Carcinogenesis** 1996; 17(9): 1929-32.
18. Aprigliano, F & Mello, LFP. Tratamento Cirúrgico do Câncer da Laringe - Análise de 1055 casos. São Paulo **Arq. Int. Otorrinolaringol.** 2006; 10(1): 36-45.
19. Arruda, VR; Grignoli, C.E; Gonçalves, MC; Soares, MC; Menezes, R; Saad, ST; Costa, FF. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? **Clinical Genetics** 1998; 54:210-214.
20. Au, WW; Oh, HY; Grady, J; Salama, SA; Heo, MY. Usefulness of genetic susceptibility and biomarkers for evaluation of environmental health risk. **Environ. and Mol. Mutagenesis** 2001; 37: 215-225.

21. Auerbach, C; Hammond, EC; Garfinkel, L. Histologic Changes in the Larynx in relation to smoking habits. **Cancer** 1970; 25: 92-104.
22. Austin, DF & Reynolds P. Laryngeal Cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni JR: Cancer Epidemiology and Prevention, 2nd. **New York: Oxford University Press** 1996. págs. 619-636.
23. Autrup, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. **Mut. Res.** 2000; 464: 65-76.
24. Avolio, CF & Sato, M. Farmacogenômica, Trabalhando pela construção de uma política de uso racional dos medicamentos. **Informativo do CRIM** 2004; Ano IV (3): 1-4.
25. Babbitt, PC. Reengineering the glutathione S-transferase scaffold: a rational design strategy pays off. **Proceeding National Academy Sciences: Washington** 2000; 97(19): 10293-10300.
26. Bartsch, H & Hietanen, E. The role of individual susceptibility in cancer burden related Bartsch, H. Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. **Mutat. Res.** 2000; 462: 255-279.
27. Bastian, RW; Bouchayer, M; Cornut, G; Loire, R; Roch, JB; Witzig, E. Epidermoid cysts, sulci, and mucosal bridges of the true vocal cord: a report of 157 cases. **Laryngoscope** 1985; 95:1087-94.
28. Bell, DA; Taylor, JA; Paulson, DF; Robertson, CN; Mohler, JL; Lucier, GW. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen metabolism of gene glutathione S-transferase M1(GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. **Journal National Cancer Institute** 1993; 85:1158-1164.
29. Berganaschi, E; Brustolin, A; DePalma, G. Biomarkers of dose and susceptibility in cyclists exposed to monoaromatic hydrocarbons. **Toxicol. Lett.** 1999; 108: 241-247.
30. Biological markers in environmental health research. Environ. **Health Perspect.** 1987; 74: 3-9.
31. Board, PG; Coggan, M; Johnston, P; Ross, V; Suzuki, T; Webb, CG. Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. **Pharmacol Ther.** 1990; 48: 357-369.

32. Buch, CS; Notani, PN; Bhisey, RA. Polymorphism at GSTM1, GSTM3 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer in an Indian population. **Carcinogenesis** 2002; 23:803-807.
33. Buetler, TM & Eaton, DL. Glutathione S-transferase: aminoacid sequence comparison, Calvert, GM; Ward, E; Schnorr, TM; Fine, LJ. Cancer risks among workers exposed to metalworking fluids: a systematic review. **Am. J. Ind. Med.** 1998; 33(3):282-92.
34. Canevari, RA & Rogatto, SR. Câncer de Cabeça e Pescoço. In: Oncologia Molecular. **São Paulo: Atheneu** 2004; p.189 - 201.
35. Caporaso, N. Selection of candidate genes for population studies. Em: Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. **Lyons: IARC Scientific publications** 1999: 148: 23-36.
36. Cascorbi, I; Brockmöller, J; Roots, I. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. **Cancer Res.** 1996; 56: 4965-9.
37. Casiglia, J & Woo, SB. A comprehensive review of oral cancer. **Gen Dent** 2001; 49(1):72-82.
38. Casper, J & Colton, R. Compreendendo os problemas da voz: Uma abordagem Fisiológica para o tratamento dos Distúrbios da voz. **Porto Alegre: Artes Médicas** 1996.
39. Cerovac, Z; Sarcevic, B; Kralj, Z; Ban, J. Detection of Human Papillomavirus (HPV) Type 6, 16 and 18 in head and neck squamous cell carcinomas by In Situ Hybridization. **Neoplasma** 1996; 43(4): 185-194.
40. Chabner, BA & Calabresi, P. As Bases Farmacológicas da Terapêutica; Goodman, LS; Gilman, A, eds.; **Mc Graw Hill: Rio de Janeiro** 1995; 903-949.
41. Chang, HW; Ling, GS; Wei, WI; Yuen, AP. Smoking and drinking can induce p15 methylation in the upper aerodigestive tract of healthy individuals and patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer** 2004; 101(1):125-32.
42. Cheng, L; Sturgis, EM; Eicher, SA; Char, D; Spitz, MR; Wei, Q. Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of squamous-cell carcinoma of head and neck. **Int. J. Cancer** 1999; 84: p. 220-224.

43. Chevalier, D; Allorge, D; Lo-Guidice, JM; Cauffiez, C; Lhermitte, M; Lafitte, JJ; Broly, F. Detection of known and two novel (M331I and R464S) missense mutations in the human CYP1A1 gene in a French Caucasian population. **Hum. Mutat.** 2001; 17: 355.
44. Choudhary, D; Jansson, I; Stoilov, I; Sarfarazi, M; Schenkman, JB. Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1-4) during development and in divergent adult tissues. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 2005; 436: 50-61.
45. Conforti-Froes, N; El-Zein, R; Au, W. Genetic polymorphism and their Nobert, DW & Vesell, ES. Advances in pharmacogenomics and individualized drug therapy: exciting challenges that lie ahead. **European Journal of Pharmacology** 2004, 500 (1-3): 267-280.
46. Conti, M & Fernández, J. O sistema fonatório. Bases anatômicas e funcionais. In: Casanova, JP. Manual de Fonoaudiologia. **Porto Alegre: Artes Médicas** 1992; p. 65-80.
47. Cotton, SC; Sharp, L; Little, J; Brockton, N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a huge review. **Am. J. Epidemiol.** 2000; 151(1): 7-32.
48. Crofts, F; Cosma, GN; Currie, D; Taioli, E; Toniolo, P; Garte, SJ. A novel CYP1A1 gene polymorphism in African-Americans. **Carcinogenesis** 1993; 14: 1729-31.
49. Curado, MP. Variáveis prognósticas na sobrevida do paciente com câncer glótico inicial – estudo de 72 casos – Hospital Araújo Jorge, Goiânia [dissertação]. São Paulo: **Universidade de São Paulo** 2000.
50. Dalton, TP; Dieter, MZ; Matlib, RS; Childs, N; Shertzer, HG; Genter, MB; Nebert, DW. Targeted knockout in the Cyp1a1 gene does not alter hepatic constitutive expression of other genes in the mouse [Ah] battery. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2000; 267: 184–189.
51. Daly, AK; Cholerton, S; Gregory, W; Idle, JR. Metabolic polymorphisms. **Pharmac. Ther.** 1993; 57: 129-160.
52. Dângelo, JG & Fatini, CA. Sistema Respiratório. In: Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar. 2ª ed. São Paulo: **Ateneu** 2001; p.106-20.
53. De Luca, RR; Alexandre, SR *ET AL.* Manual Para Técnicos em Bioterismo. 2ª^{ed} **COBEA/FINEP** 1996; 75p.

54. Duham, LJ & Stewart, HL. A survey of transplantable and transmissible animal tumors. **J. Natl. Cancer Inst.** 1953; 5: 1299-377.
55. Dusinká, M; Ficek, A; Horska, A; Raslova, K; Petrovska, H; Vallova, B; Drlickova, M; Wood, SG; Stupakova, A; Gasparovic, J; Bobek, P; Nagyova, A; Kovacikova, Z; Blazicek, P; Liegebel, U; Collins, AR. Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. **Mutat. Res.** 2001; 482: 47-55.
56. Dybing, E; Doe, J; Groten, J; Kleiner, J; O'Brien, J; Renwick, AG; Schlatter, J; Steinberg, P; Tritscher, A; Wlaker, R; Younes, M. Hazard characterization of chemicals in food and diet. **London: Food Chemical and Toxicology** 2002; 40(2): 237-282.
57. Edwards, RJ; Adams, DA; Watts, PS; Davies, DS; Boobies, AR. Development of a comprehensive panel of antibodies against the major xenobiotic metabolising forms of cytochrome P450 in humans. **Biochem Pharmacol** 1998; 56: 377-387.
58. Ellsworth, DL; Hallman, DM; Boerwinkle, E. Impact of the Human Genome Project on epidemiologic research. **Epidemiologic Review** 1997; 19: 3-13.
59. Engel, LS; Taioli, E; Pfeiffer, R; Garcia-Closas, M; Marcus, PM; Lan, Q; Boffetta, P; Vineis, P; Autrup, H; Bell, DA; Branch, RA; Brockmoller, J; Daly, AK; Heckbert, SR; Kalina, I; Kang, D; Katoh, T; Lafuente, A; Lin, HJ; Romkes, M; Taylor, JA; Rothman, N. Pooled analysis and meta-analysis of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: a HuGE review. **Am. J. Epidemiol.** 2002; 156(2): 95-109.
60. Esteller, M; Corn, PG; Urena, JM; Gabrielson, E; Baylin, SB; Herman, JG. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. **Cancer Res.** 1998; 5: 4515-4518.
61. Evans, AJ; Henner, WD; Eilers, KM; Montalto, MA; Wersinger, EM; Andersen, PE. Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. **Head Neck** 2004; 26(1):63-70.
62. Feigelson, HS; Rodriguez, C; Robertson, AS. Determinants of DNA yield and quality from buccal cell samples collected with mouthwash. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2001; 10(9):1005-8.
63. Ferreira, CG & Rocha, JC. Suscetibilidade Genética ao Câncer. In: Oncologia Molecular. Parte III: Oncogenética, 3^{ed}, **Atheneu Editora** 2005, págs. 295:305.

64. Ferreras, AM; Tapia, JPR; Meana, MVG; Álvarez, IA; Coto, E & Suárez Nieto, C. Asociación entre la Interacción del Vírus del Papiloma Humano y La Pérdida de Heterozigosidad del Gen P53 em los Carcinomas Epidermoides de Cabeza y Cuello. **Acta Otorrinolaringol Esp.** 2001; 52: 546-552.
65. Fonseca, SM; Machado, RCL; Paiva, DR; Almeida, EPM; Massunaga, VVM; Junior, WR, Koide, T; Tadocoro, H. Manual de Quimioterapia Antineoplásica. **Rio de Janeiro: Ed. Reichmann & Affonso** 2000; 164p.
66. Foulkes, WD; Brunet, JS; Kowalski, LP; Narod, AS; Franco, EL. Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: A case-control study. **Int. J. Cancer** 1995; 63: 769-773.
67. Gadelha, MEC; Gonçalves, MIR; Pontes, PAL. Alterações estruturais mínimas da laringe. In: PINHO, S.M.R. Fundamentos em fonoaudiologia: tratando os distúrbios da voz. **São Paulo: Guanabara Koogan** 1998; p.65-71.
68. Gaikovitch, EA; Cascorbi, I; Mrozikiewicz, PM; Brockmöller, J; Frotschl, R; Köpke, K; Gerloff, T; Chernov, JN; Roots, I. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and P-glycoprotein in a Russian population. **Eur J Clin Pharmacol.** 2003, 59(4): 303-12.
69. Gajicka, M; Rydzanicz, M; Jaskula-Sztul, R; Kujawski, M; Szyfter, W; Szyfter, K. CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, NAT2, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms or their combinations are associated with the increased risk of the laryngeal squamous cell carcinoma. **Mutat Res.** 2005; 574(1-2):112-23.
70. Gao, Y & Zhang, Q. Polymorphisms of the GSTM1 and CYP2D2 genes associated with susceptibility to lung cancer in Chinese. **Mutat Res** 1999; 444:441-449.
71. Garfinkle, D. Studies on pig liver microsomes. I. Enzyme and pigment composition of different microsomal fractions. **Arch Biochem Biophys** 1958; 77:493-510.
72. Garte, SJ; Trachman, F; Crofts, F; Toniolo, P; Buxbaum, J; Bayo, S; Taioli, E. Distribution of composite CYP1A1 genotypes in Africans, African-Americans and Caucasians. **Human Hered.** 1996; 46: 121-127.
73. Gaspar, P; Moreira, J; Kvitko, K; Torrer, M; Moreira, A; Wiemer, T. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? **Genetics and Molecular Biology** 2004; 27: 133-138.

74. Gattás, GJF. Associação de genes polimórficos de metabolização de xenobióticos e câncer de boca e de laringe. **Mutagênese** 2001, supl. 47.
75. Gattás, GJF; Kato, M; Soares-Vieira, JA; Siraque, MS; Kohler, P; Gomes, L.; Rego, M. AV; Bydlowski, SP. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 2004; 34: 451-458.
76. Gattás, GJF; Soares-Vieira, JA. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. **Occup. Med.** 2000; 50(7): 508-511.
77. Geisler, SA & Olshan, AF. GSTM1, GSTT1 and the risk os squamous cell carcinoma of the head and neck. **Am. J. Epidem.** 2001; 154: 95-105.
78. Geordiais, P; Topinka, J; Vlachodimitropoulos, D; Stoikidou, M; Gioka, M; Stephanou, G; Autrup, H; Demopoulos, NA; Katsouyanni, K; Sram, R; Kyrtopoulos, SA. Interactions between CYP1A1 polymorphisms and exposure to environmental tobacco smoke in the modulation of lymphocyte bulky DNA adducts and chromosomal aberrations. **Carcinogenesis** 2005; 26: 93-101.
79. Gibson, GG & Skett, P. Induction and inhibition of drug metabolism e Techniques and experiments illustrating drug metabolism. In: Chapman & Hall (Editors), Introduction to Drug Metabolism. 2ª edition. **Blackie Academic & Professional, London Glasgow New York.** 1994.
80. Goldsby, RA; Kindt, TJ; Osborne, BA. Kuby Imunologia. 4^{ed}. **Rio de Janeiro: Revinter** 2002; 35p.
81. Goldstein, AM; Blot, WJ; Greenberg, RS; Schoenberg, JB; Austin, DF; Preston-Martin, S; Winn, DM; Bernstein, L; Mclaughlin, JK; Fraumeni, JF. Familial risk in oral and pharyngeal cancer. **Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.** 1994; 30(5): 319-22.
82. González, MV; Alvarez, V; Pello, MF; Menéndez, MJ; Suárez, C; Coto, E. Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase-M1, and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to head and neck cancer. **J. Clin. Pathol.** 1998; 51: 294-298.
83. Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. 10ª ed. **Rio de Janeiro: McGraw-Hill** 2003; 200p.

84. Gronau, S; Koenig-Greger, D; Jerg, M; Riechelmann, H. GSTM1 enzyme concentration and enzyme activity in correlation to the genotype of detoxification enzymes in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Oral Disease** 2003; 9:62-67.
85. GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. **Cancer Epidemiol. Biom. and Prevent.** 1997; 6:733-743.
86. Guenguerich, FP. Metabolism of chemical carcinogens. **Carcinogenesis** 2000; 21:345-351.
87. Haast, MH. Applied embriology of the larynx. Canadian. **Journal of Oto-Laryngology** 1975; 4: 412-416.
88. Hahn, M; Hagedorn, G; Kuhlisch, E; Schackert, HK; Eckelt, U. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity cancer. **Oral Oncology** 2002; 38:486-490.
89. Harries, LW; Stubbins, MJ; Forman, D; Howard, GC; Wolf, CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione Stransferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. **Carcinogenesis** 1997; 18: 641-644.
90. Haskel, CM. Cancer Treatment. **Saunders: Philadelphia** 1990; 152p.
91. Hatayama, I; Satoh, K; Sato, K. A cDNA sequence coding a class pi glutathione S-transferase of mouse. **Nucleic Acids Res** 1990; 18(15): 4606.
92. Hauashi, S; Watanable, J; Nakachi, K; Kawajiri, K. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. **J. Biochem.** 1991; 110: 407-411.
93. Hayaschi, S; Watanable, J; Nakachi, K; Kawajiri, K. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. **J. Biochem.** 1991; 110: 407-411.
94. Hayes, JD & Pulford, DJ. The glutathione Stransferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Review Biochemistry Molecular Biology** 2005; 30: 445-600.

95. Hildebrand, CE; Gonzalez, FJ; McBride, OW; Nebert, DW. Assignment of the human 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible cytochrome P1-450 gene to chromosome 15. **Nucleic Acids Res.** 1985; 13: 2009-2016.

96. Hirvonen, A. Genetic factors in individual response to environmental exposures. **JOEM**, 1995; 37: 37-43.

97. Hirvonen, A. Combinations of susceptible genotypes and individual responses to toxicants. **Environ. Health Perspect.** 1997; 105(4): 755–758.

98. Hirvonen, A; Husgafvel-Pursiainen, K; Karjalainen, A; Anttila, S; Vainio, H. Point mutation MspI and Ile-Val polymorphisms closely linked in the CYP1A1 gene: lack of association with susceptibility to lung cancer in a Finnish study population. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention** 1992; 2:485-489.

99. Hodgson, E & Levi, PE. Metabolism of toxicants Phase I Reactions. In: Introduction to Biochemical Toxicology. 2nd, Appleton & Lange. **Norwalk, Connecticut** 1994.

100. IARC. Occupational exposures to mists and vapours from sulfuric acid and other strong inorganic acids and other industrial chemicals. In: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lyon: International Agency For Research on Cancer Lyon 1992; volume: 54, págs. 41-119.

101. INCA/MS: Instituto Nacional do Câncer / Ministério da Saúde. Carcinoma Epidermóide da cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia** 2001; 47(4):361-76.

102. INCA/MS: Instituto Nacional do Câncer / Ministério da Saúde. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2006.

103. Ingelman-Sundberg, M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. **Mutat. Res.** 2001; 482: 11-19.

104. Ingelman-Sundberg, M; Oscarson, M; McLellan, RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. **Trends Pharmacol Sci** 1999; 20: 342-349.

105. Jahnke, V., Matthias, C., Fryer, A., and Strange, R. Glutathione S-transferase and cytochrome P-450 polymorphism as risk factors for squamous cell carcinoma of the larynx. **Am. J. Surg.** 1996; 172: 671-673.

106. Jaiswal, AK; Gonzalez, FJ; Nebert, DW. Human dioxin-inducible cytochrome P1-450: complementary DNA and amino acid sequence. **Science** 1985; 228: 80-3.
107. Jefferys, DB; Leakey, D; Lewis, JA; Payne, S; Rawlins, MD. New active substances authorized in the United Kingdom between 1972 and 1994. **Br J Clin Pharmacol** 1998; 45(2):151-6.
108. Jerónimo, C; Usadel, H; Henrique, R; Oliveira, J; Lopes, C; Nelson, WG; Sidransky, D. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.** 2001; 93:1747-1752.
109. Johnson, JA & Evans, WE. Molecular Diagnostics as a predictive tool: genetics of drug efficacy and toxicity. **Trends in molecular medicine** 2002; 8(6): 300-305.
110. Jourenkova, N., Reinikainen, M., Bouchardy, C., Dayer, P., Benhamou, S., and Hirvonen, A. Larynx cancer risk in relation to glutathione S-transferases M1 and T1 genotypes and tobacco smoking. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 1998; 7: 19–24.
111. Kaderlic, KR & Kadlubar, FF. Metabolic polymorphism and carcinogen-DNA adduct formation in human populations. **Pharmacogenetics** 1995; 5: S108-117.
112. Kaderlik, RK & Kadlubar, FF. Metabolic activation and carcinogen – DNA adduct detection in human larynx. **Cancer Research** 1994; 54: 4915-4919.
113. Kadlubar, FF. Concluding remarks: symposium on Genetic Susceptibility to Environmental Toxicants. **Mutation Research** 2001; 482:111-113.
114. Karlsen, F; Kalantari, M; Jenkins, A; Pettersen, E; Kristensen, G; Holm, R; Johansson, B; Hagmar, B. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of Human Papillomavirus. **J. Clinical. Microbiol.** 1996; 34(9): 2095-2100.
115. Kashima, H & Mounts, P. Tumors of the head and neck, larynx, lung and esophagus and their possible relation to HPV. In: Syrjanen, k.; Gissmann, L.; Koss, L. (eds) Papillomaviruses and human disease. **New York and Tokio: Springer, Heidelberg** 1987; p. 139-157.
116. Kato, S; Shields, G; Caporaso, N; Sugimira, H; Trivers, GE; Tucker, MA; Trump, BF; Weston, A; Harris, CC. Analysis of cytochrome p450 2E1 genetic polymorphisms in relation to human lung cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention** 2004; 3: 515-518.

117. Kawajiri, K; Watanabe, J; Gotoh, O; Tagashira, Y; Sogawa, K; Fujii-Kuriyama, Y. Structure and drug inducibility of the human cytochrome P-450c gene. **Eur J Biochem.** 1986; 159: 219-25.
118. Kellermann, G; Luyten-Kellermann, M; Shaw, CR. Genetic variation of aryl hydrocarbon hydroxylase in human lymphocytes. **Am J Hum Genet.** 1973; 25: 327-31.
119. Kierszenbaum, AL. Histologia e Biologia Celular. **Rio de Janeiro: Elsevier**, 2004.
120. Kim, KM; Kim, YM; Shim, YS, Kim, KH, Chang, HS, Choi, Jo. Epidemiologic survey of head and neck cancers in Korea. **Journal of Korean Medical Science** 2003;18:80-7.
121. Kimura, ET & Baía, GS. Rede ONSA e o Projeto Genoma Humano do Câncer: Contribuição ao Genoma Humano. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 2002; 46(4): 325-329.
122. Kiyohara, C; Hirohata, T; Inutsuka, S. The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms of the CYP1A1 gene. **Jpn. J. Cancer. Res.** 1996; 87: 18-24.
123. Klingenberg, M. Pigments of rat liver microsomes. **Arch Biochem Biophys** 1958; 75:376-386.
124. Koch, WM; Lango, M; Sewell, D; Zahurak, M; Sidransky, D. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. **Laryngoscope** 1999; 109: 1544-1551.
125. Kowalski, LP; Miguel, REV; Ulbrich, FS. In: A Atuação da Fonoaudiologia no Câncer de Cabeça e Pescoço. **São Paulo: Lovise** 2000, págs. 97-04.
126. Kuhl, I. Laringologia prática ilustrada. **Rio de Janeiro: Revinter** 1991. 164p.
127. Lafuente, A., Pujol, F., Carretero, P., Villa, J. P., and Cuchi, A. Human glutathione S-transferase i.t (GST IL) deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. **Cancer Lett.** 1993; 68: 49-54.
128. Lazarou, J; Pomeranz, BH; Corey, PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. **JAMA** 1998; 279: 1200-5.

129. Lima, DR. Terapêutica Clínica. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan** 2001. 518p.
130. Lin, X; Asgari, K; Putzi, MJ; Gage, WR; Yu, X; Cornblatt, BS; Kumar, A; Piantadosi, S; Deweese, TL; De Marzo, AM; Nelson, WG. Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide. **Cancer Res.** 2001; 61: 8611-8616.
131. Lofiego, J. Laringectomia: avaliação e terapia fonoaudiológica. **Rio de Janeiro: Revinter** 1994. 203p.
132. Macleod, S; Sinha, R; Kadlubar, FF; Lang, NP. Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 influence the in vivo function of CYP1A2. **Mutat. Res.** 1997; 376: 135-142.
133. Maier, H; Tisch, M; Enderle, G; Dietz, A; Weidauer, H. Occupational exposure to paint, lacquer and solvents, and cancer risk in the area of the upper aero-digestive tract. **HNO** 1997; 45(11): 905-908.
134. Malmezat, D; Breuille, P; Capitan, P; Miranda, P; Obled, C. Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. **Journal of Nutrition, Philadelphia** 2000; 130: 1239-1246.
135. Marczyński, B; Kraus, T; Rozynek, P; Raithel, HJ & Baur, X. Association between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in DNA of workers highly exposed to asbestos and their clinical data, occupational and non-occupational confounding factors, and cancer. **Mutat. Res.** 2000; 468(2): 203-12.
136. Marques, CF; Koifman, S; Koifman, RJ; Boffetta, P; Brennan, P; Hatagima, A. Influence of CYP1A1, CYP2E1, GSTM3 and NAT2 genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: results from a case-control study in Rio de Janeiro. **Oral Oncology** 2006; 42: 632-637.
137. Maser, E. Stress, hormonal changes, alcohol, food constituents and drugs: factors that advance the incidence of tobacco smoke-related cancer? **TIPS** 1997; 18(8):270-5.
138. Masson, LF; Sharp, L; Cotton, SC; Little, J. Cytochrome P-450 1A1 Gene Polymorphisms and Risk of Breast Cancer: A HuGE Review. **Am. J. Epidemiol.** 2005; 161: 901-915.

139. Matthias C, Jahnke V, Jones PW, Hoban PR, Alldersea JE, Worrall Sf et al. Cyclin D1, Glutathione S-Transferase, and Cytochrome P450 genotypes and outcome in patients with upper aerodigestive tract cancers: assessment of the importance of individual genes using multivariate analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1999; 8(9):815-23.
140. Matthias, C; Bockmuhl, V; Jahnke, V.; Harries, LW; Wolf, CR; Jones, PW; Alldersea, J; Worrall, SF; Hand, P; Fryer, AA; Strange, RC. The glutathione S-transferase GSTP1 polymorphism: effects on susceptibility to oral/pharyngeal and laryngeal carcinomas. **Pharmacogenetics** 1998; 8:1-6.
141. Mealey, BL. Dentistry and the cancer patient: part 1- oral manifestations and complications of chemotherapy. **Compendium, Janesburg** 1994; 15(10): p.1252.
142. Meleca, RJ; Dworkin, JP; Kewson, DT; Stachler, RJ; Hill, SL. Functional outcomes following nonsurgical treatment for advanced-stage laryngeal carcinoma. **Laryngosc.**, Philadelphia 2003; 113(4): 720-728.
143. Menezes, AMB; Horta, BL; Oliveira, ALB; Kaufmann, RAC; Duquia, R; Diniz, A; Motta, LH; Centeno, MS; Estanislau, G; Gomes, L. Risco de câncer de pulmão, laringe e esôfago atribuível ao fumo. **Rev Saúde Pública** 2002;36(2):129-34.
144. Meyer, UA; Zanger, UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. **Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.** 1997; 37: 269-296.
145. Milikan, R; Pittman, G; Tse, C; Savitz, DA; Newman, B; Bell, D. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 and breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2000 ;9:567-73.
146. Millikan, R; Pittman, G; Tse, CK; Savitz, DA; Newman, B; Bell, D. Glutathione S-transferases M1, T1, and P1 and breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.** 2000; 9(6): 567–573.
147. Mitruen, K; Jourenkova, N; Kataja, V; Eskelinen, M; Kosma, V; Benhamou, S; Vainio, H; Uusitupa, M; Hirvonen, A. Glutathione S-transferase *M1*, *M3*, *P1*, and *T1* genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. **Can. Biom. Prev.** 2001; 10(3): 229-256.
148. Naccarati, A; Soucek, P; Stetina, R; Haufrod, V; Kumar, R; Vodickova, L; Trtkova, K; Dusinska, M; Hemminki, K; Vodicka, P. Genetic polymorphisms and possible gene–gene interactions in metabolic and DNA repair genes: Effects on DNA damage. **Mutation Research** 2006; 593: 22–31.

149. Nair, S & Pillai, MR. Human Papilloma Virus, Cellular Genetics and Susceptibility to Cervical Cancer. **Int. J. Hum. Genet.** 2005; 5(1): 11-17.
150. Nakachi, K; Imai, K; Hayashi, S; Watanabe, J; Kawajiri, K. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. **Cancer Res.** 1991; 51: 5177-5180.
151. Nebert, DW & Russel, DW. NATIONAL RESEARCH COUNCIL, COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS. Clinical importance of the cytochromes P450. **Lancet** 2002; 360:1155-62.
152. Nelson, DR; Kamataki, T; Waxman, DJ; Guengerich, FP; Estabrook, RW; Feyereisen, R; Gonzalez, FJ; Coon, MJ; Gunsalus, IC; Gotoh, O; Okuda, K; Nebert, DW. The P450 superfamily - update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. **DNA Cell Biology** 1993; 12: 115-126.
153. Niv, A; Sion-Vardi, N; Gatot, A; Nash, M & Fliss, DM. Carcinoma of the oral cavity and oropharynx. **J. Laryngol. Otol.** 2000; 114(1): 41-6.
154. Nobert, DW & Vesell, ES. Advances in pharmacogenomics and individualized drug therapy: exciting challenges that lie ahead. **European Journal of Pharmacology** 2004; 500(1-3):267-280.
155. Noda, T; Sasagawa, T; Dong, Y; Fuse, H; Namiki, M; Inoue, M. Detection of Human Papillomavirus (HPV) DNA. In: Archival Specimens of Benign Prostatic Hyperplasia and Prostatic Cancer Using a Highly Sensitive Nested PCR Method. **Urol. Res.** 1998.
156. Noronha, MJR & Dias, FL. Câncer da laringe: uma abordagem multidisciplinar. **Rio de Janeiro: Revinter** 1997.
157. Norton, RM. Clinical Pharmacogenomics: applications in pharmaceutical R & D. **Drug discovery today** 2001; 6(4): 180-185.
158. Oinonen, T & Lindros, KO. Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. **Biochem J** 1998; 329:17-35.
159. Oliveira, F. Ser negro no Brasil: alcances e limites. **Estudos Avançados** 2004; 18(50): 57-60.

160. Oliveira, RB & Alves, RJ. Agentes Antineoplásicos Biorredutíveis: Uma nova Alternativa Para o Tratamento de Tumores Sólidos. **Quim. Nova.** 2002; 25(6): 976-984.
161. Olshan, AF; Weissler, MC; Watson, MA; Bell, DA. GSTM1, GSTT1, GSTP1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2000 ;9(2):185-91.
162. Omura, T & Sato, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. **J Biol Chem** 1964; 239:2370-8.
163. Ortiz de Montellano, PR. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry. 2nd, **New York: Plenum Press** 1995; 170p.
164. Otake, AH; Roger, C; Zatz, R. Câncer: Novos alvos para tratamento. **Ciência Hoje** 2006; 38(223): 28-33.
165. Parkinson, A. Biotransformation of Xenobiotics. In: Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons, International Edition, **McGraw-Hill** 2001; 6: 133-224.
166. Pemble, S; Schroeder, KR; Spence; SR; Meyer, DJ; Hallier, E; Bolt, HM; Ketterer, B; Taylor, JB. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and characterization of genetic polymorphism. **Biochemical Journal** 1994; 300: 271-276.
167. Percy, C; Holten, VV; Calum M. Classificação Internacional de Doenças para Oncologia. 2^a ed. **São Paulo: Edusp** 1996.
168. Persson, I; Johansson, I; Ingelman-Sundberg, M. In vitro kinetics of two human CYP1A1 variant enzymes suggested to be associated with interindividual differences in cancer susceptibility. **Biochem Biophys Res Commun.** 1997; 231: 227-30.
169. Pharoah, PDP; Dunning, AM; Ponder, BAJ; Easton, DF. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. **Nat. Rev. Cancer** 2004; 4: 850-860.
170. Pinto, LFR. Farmacogenômica e suas promissoras aplicações em oncologia clínica. **Prática Hospitalar** 2005; Ano VII (41): 1-6.
171. Pontes, PAL. Tratado de Otorrinolaringologia. **SBORL** 2002.

172. Rebbeck, TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes. Ribeiro, LR; Salvadori, DMF; Marques, EK. *Mutagênese Ambiental. Canoas: Editora Ulbra*. 1^a edição, 2003.
173. Risch A, Ramroth H, Raedts V, Rajaei-Behbahani N, Schmezer P, Bartsch H, Becher H, Dietz A. Laryngeal cancer risk in Caucasians is associated with alcohol and tobacco consumption but not modified by genetic polymorphisms in class I alcohol dehydrogenases ADH1B and ADH1C, and glutathione-S-transferases GSTM1 and GSTT1. *Pharmacogenetics*. 2003; 13(4):225-30.
174. Ritchie, KJ; Henderson, CJ; Wang, XJ; Vassieva, O; Carrie, D; Farmer, PB; Gaskell, M; Park, K; Wolf, CR. Glutathione transferase pi plays a critical role in the development of lung carcinogenesis following exposure to tobacco-related carcinogens and urethane. *Cancer Res*. 2007; 67(19): 9248-57.
175. Rogers, AS. The role of cytochrome P450 in developmental pharmacology. *J. Adolescent Health* 1994; 15: 635-640.
176. Rossini, A; Rapozo, DCM; Amorim, LMF; Macedo, JMB; Medina, R; Neto, JFN; Gallo, CVM; Pinto, LFR. Frequencies of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet. Mol. Res*. 2002; 1(3): 233-240.
177. Ryberg, D; Skaug, V; Hewer, A; Phillips, DH; Harries, LW; Wolf, CR; OGREID, D; Ulvik, A; Vu, P; Haugen, A. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1285-1289.
178. Sachidanandam, R; Weissman, D; Schmidt, SC. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409: 928-33.
179. Saito, T; Egashira, M; Kiyotani, K; Fujieda, M; Yamazaki, H; Kiyohara, C; Kunitoh, H; Kamataki, T. Novel Nonsynonymous Polymorphisms of the CYP1A1 Gene in Japanese. *Drug Metab. Pharmacokinet* 2003; 18: 218-221.
180. Santiago, C; Bandrés, F; Gómez-Gallego, F. Polimorfismos de citocromo P450: papel como marcador biológico. *Medicina del Trabajo* 2002; 11(3): 130-140.
181. Santos, D.A. A atuação do psicólogo junto a pacientes cirúrgicos com câncer de cabeça e pescoço. In: Bruscato, W.L.; Benedetti, C.; Lopes, S.R.A. *A prática da Psicologia*

Hospitalar na Santa Casa de São Paulo: novas páginas em uma antiga história. **São Paulo: Casa do Psicólogo** 2004.

182. Sasaki, CT & Weaver, EM. Physiology of the larynx. **Am J Med** 1997; 103:9-18.
183. Sato, M; Sato, T; Izumo, T; Amagasa, T. Genetically high susceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined genotyping of CYP1A1 and GSTM1 genes. **Oral Oncol.** 2000; 36: 267-271.
184. Schneider, J; Bernges, U; Philipp, M; Woitowitz, HJ. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphism and lung cancer risk in relation to tobacco smoking. **Cancer Letters** 2004; 208:65-74.
185. Shastry, BS. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. **Pharmacogenomics J** 2006; 6(1):16-21.
186. Shiboski, CH; Shiboski, SC; Silverman, S. Trends in oral cancer rates in the United States, 1973-96. **Community Dentistry and Oral Epidemiology** 2000; 28: p. 249-256.
187. Shields, PG; Caporaso, NF; Falk, RT; Sugimura, H; Trivers, GE; Trump, BF; Hoover, RN; Weston, A; Harris, CC. Lung cancer, race, and CYP1A1 genetic polymorphism. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** 1993; 2: 481-485.
188. Silva, AMTC. Avaliação Epidemiológica do Câncer da Laringe na população de Goiânia no período de 1988 a 1998. Registro de Câncer de Base Populacional do Hospital Araújo Jorge – Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Goiânia [**dissertação**]. Goiás: Universidade Federal de Goiás; 2003.
189. Slaughter, DP; Southwick, HW; Smejkal, W. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. **Cancer** 1953; 6: 963-968.
190. Smart, J & Daly, AK. Variation in induced CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTM1 polymorphisms. **Pharmacogenetics** 2000; 10: 11-24.
191. Sonis, ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral Oncol. Kidlington** 1998; 34: 39-43.
192. Spitz, MR & Bondy, ML. Genetic susceptibility to cancer. **Cancer** 1993; 72: 991-995.

193. Sprenger, R; Schlagenhauser, R; Kerb, R; Bruhn, C; Brockmoller, J, Roots, I; Brinkmann, U. Characterization of glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotypephenotype correlation. **Pharmacogenetics** 2000; 10: 557-565.
194. Spurr, NK, Gough AC, Stevenson K, Wolf CR: Msp-1 polymorphism detected with a cDNA probe for the P-450 I family on chromosome 15. **Nucleic Acids Res.** 1987; 15: 5901.
195. Strange, RC, Lear, JT; Fryer, AA. Glutathione S-transferase polymorphisms: influence on susceptibility to cancer. **Chemical Biological Interaction** 1998; 111-112: 351-364.
196. Suarez-Kurtz, G. Farmacogenômica. A genética dos medicamentos. **Ciência Hoje** 2004; 35(208): 20-27.
197. Talamaini, R; Bosetti, C; La Vecchia, C; Dal Maso, L; Levi, F; Bidoli, E; Negri, E; Pasche, C; Vaccarella, S; Barzan, L & Franceschi, S. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. **Cancer Causes and Control** 2002; 13(10): 957-964.
198. Taningher, M; Malacarne, D; Izzoti, A; Ugolini, D; Parodi, S. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. **Mutat. Res.** 1999; 436: 227- 261.
199. Tavani, A; La Vecchia, G; Gallus, S; Lagiou, P; Trichopoulos, D; Levi, F; Negri E. Red meat intake and cancer risk: a study in Italy. **International Journal of Cancer** 2000. 86(3):425-8.
200. Tefré, T; Ryberg, D; Haugen, A; Nebert, DW; Skaug, V; Brogger, A; Borresen, AL. Human CYP1A1 (cytochrome P1 450) gene: lack of association between the MSP I restriction fragment I polymorphism and incidence of lung cancer in a Norwegian population. **Pharmacogenetics** 1992; 1: 20-25.
201. Teixeira, JP; Gaspar, J; Martinho, G; Silva, S; Rodrigues, S; Mayan, O; Martin, E; Farmer, PB; Rueff, J. Aromatic DNA adduct levels in coke oven workers: correlation with polymorphisms in genes GSTP1, GSTM1, GSTT1 and CYP1A1. **Mutation Research** 2002; 517: 147-155.
202. Thomé, R; Thomé, DC; Royg, CRC. Tumores cartilagosos da laringe. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia** 2001; 67(6):809-17.

203. To-Figueras, J; Gene, M; Gómez-Catalán, J; Pique, E; Borrego, N; Caballero, M; Cruellas, F; Raya, A; Dicenta, M; Corbella, J. Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphisms in relation to laryngeal carcinoma risk. **Cancer Lett.** 2002 ; 187(2):95-101.
204. Tortora, G. Princípios de Anatomia e Fisiologia. 9. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2002.
205. Tucker, GF. The anatomy of the laryngeal cancer. Workshop from the Centennial Conference of Laryngeal Cancer. NewYork: **Appleton Century Crafts** 1976; p. 11-25.
206. Uno, S; Dalton, TP; Shertzer, HG; Genter, MB; Warshawsky, D; Talaska, G; Nebert, DW. Benzo[a]pyrene-induced toxicity: paradoxical protection in Cyp1a1 (-/-) knockout mice having increased hepatic BaP-DNA adduct levels. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2001; 289: 1049–1056.
207. Van Der Aar, EM; Bouwman, T; Commandeur, NM; Vermeulen, NPE. Structure-activity relationships for chemical and glutathione transferase- catalysed glutathione conjugation reactions of a series of 2-substituted 1-chloro-4-nitrobenzenes. **Biochem. J.** 1996; 320: 531-540.
208. Vermeulen, GJ; Mulder, H; Nieuwenhuyse, WHM; Peters; PJ Van Bladeren (eds.), Glutathione S-Transferases: Structure, Function and Clinical Implications, **London: Taylor and Francis** 1996; p. 239–248.
209. Vineis, P. Interactions between genetics and environmental exposures: the example of cancer. **Epid. Prev.** 1995; 19: 79-81.
210. Wal, R; Sato, D; Oliveira, CC; Lopes, L; Oliveira, SM; Dibernardi, RP; Gehrke, S; Palauro, FR; Buchi, DF. Immunomodulation in Sarcoma-180 Bearing Mice. **Cell and Molecular Biology of Cancer** 2003; p34.
211. Walker, CL. Cancer susceptibility genes and molecular carcinogenesis. **Mol. Med. Today** 1996; 2: 364-365.
212. Walker, DM; Boey, G; McDonald, LA. The pathology of oral cancer. **Pathology** 2003; 35(5):376-83.
213. Ward, PH; Hanson, DG. Reflux as an etiological factor of carcinoma of the laryngopharynx. **Laryngoscope** 1988; 98(11):1195-9.

214. Watters, JW; Kloss, EF; Link, DC; Graubert, TA; McLeod, HL A mouse-based strategy for cyclophosphamide pharmacogenomic discovery. **J. Appl. Physiol.** 2003; 95: 1352-1360.
215. Weinberg, RA. The integrations of molecular genetics into cancer management. **Cancer** 1992; 70: 1653-1658.
216. Werck-Reichhar, D; Feyereisen, R. Cytochromes P450: a success story. **Genome Biol** 2000; 1:1-9.
217. Whitlock, JP. Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin action. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 1990; 30: p. 251.
218. Widersten, M & Mannervik, B. Glutathione transferase with novel active sites isolated by phase display from a library of random mutants. **Journal Molecular Biological** 1995; 250: 115-122.
219. Wogan, G.N. Molecular epidemiology in cancer risk assessment and prevention: recent progress and avenues for future research. **Environ. Health Perspect.** 1992; 98: 167-178.
220. Wormhoudt, LW; Commandeur, JNM; Vermeulen, NPE. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. **Crit. Rev. Toxicol.** 1999; 29: 59-124.
221. Wünsch Filho, V & Zago, MA. Modern cancer epidemiological research: genetic polymorphism and environment. **Rev. Saúde Pública** 2005; 39(3): 490-7.
222. Wunsch Filho, V. The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil. **São Paulo Medical Journal** 2004; 112(5): 188-94.
223. Xu, S; Wang, Y; Roe, B & Pearson, WR. Characterization of human class mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. **Journal Biological Chemistry** 1998; 273: 3517-3527.
224. Yuspa, SH. Overview of carcinogenesis: past, present and future. **Carcinogenesis** 2000; 21: 341-344.

Dissertação: IMPLICAÇÕES DO POLIMORFISMO GENÉTICO DE *CYP1A1*, *GSTM1* E *GSTT1* NA SUSCETIBILIDADE DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LARINGE
Mestre: Raimundo Lima da Silva Júnior

Resumo

A laringe é um órgão tubular do trato aerodigestivo cuja principal função é a produção da voz, além de funções relacionadas com a proteção das vias aéreas inferiores e deglutição alimentar. O carcinoma de células escamosas (CEC) de laringe apresenta-se como uma doença multifatorial e epigenética sendo influenciada por fatores ambientais, comportamentais e inerentes ao indivíduo. Vários genes polimórficos que codificam enzimas envolvidas na biotransformação de carcinógenos têm sido associados ao desenvolvimento de câncer, sobretudo no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Os genes *CYP1A1m1*, *GSTM1* e *GSTT1* são fundamentais no processo de detoxificação de Poli-Hidrocarbonetos Aromáticos (PHA) e de diversas moléculas endógenas, facilitando o seu metabolismo e excreção. Os objetivos do presente estudo foram de avaliar os dados epidemiológicos de pacientes diagnosticados com CEC da laringe do Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia (RCBP) da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), analisando os dados de 63 prontuários acompanhados num período de 6 anos; estabelecer os perfis alélicos dos genes *CYP1A1m1*, *GSTM1* e *GSTT1* em grupos caso-controle investigando os graus de suscetibilidade dos pacientes diagnosticados com CEC de laringe, segundo hábitos tabagistas e etilistas. Ao total foram avaliadas 112 amostras, sendo 63 provenientes de pacientes com CEC da laringe e 49 de pacientes do grupo controle. O CEC da laringe se mostrou cerca de 3,5 vezes mais freqüente em homens que em mulheres. A taxa de sobrevida relativa geral foi de aproximadamente 66% para 6 anos. Os hábitos tabagista e etilista concomitantes apresentam uma sobrevida consideravelmente menor. Foram encontradas freqüências alélicas para *CYP1A1m1* de 52,4% (34/62) e 63,3% (31/49) para o alelo selvagem T e 44,4% (28/62) e 34,7% (18/49) para o alelo mutante C. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas das variantes alélicas e genotípicas *CYP1A1m1* para o CEC da laringe. Quanto aos genes *GSTM1* e *GSTT1* foram observadas freqüências genotípicas positivas para os genes *GSTM1* e *GSTT1* de 41,3% (26/63) e 54,0% (34/63) para os pacientes com carcinomas laríngeos, e de 49,0% (24/49) e 51,0% (25/49) para o grupo controle, respectivamente. Para a avaliação do genótipo *GSTM1* (nulo) e *GSTT1* (nulo), os pacientes do grupo caso apresentaram 58,7% (37/63) e 46,0% (29/63) de genótipos nulos para *GSTM1* e *GSTT1*, enquanto que os pacientes do grupo controle apresentaram 51,0% (25/49) e 40,8% (20/49). Não foram encontradas associações estatisticamente significativas das variantes genotípicas *GSTM1* (nulo) e *GSTT1* (nulo) para o CEC da laringe. Neste contexto, foi realizado um estudo experimental no intuito de avaliar o papel dos genes *Cyp* e *Gst* no metabolismo da ciclofosfamida. Tal estudo abordou avaliações toxicológicas da Ciclofosfamida e a análise do polimorfismo dos genes *Cyp2a29* e *Gstp1* em camundongos *BALB/c* e correlacionando-os com a toxicidade da droga através da avaliação dos órgãos comumente afetados. A DL50 da droga observada em 40 camundongos foi de 474mg/Kg. Posteriormente, outros 40 camundongos foram utilizados na avaliação do polimorfismo genético dos genes *Cyp2a29* e *Gstp1*. Quanto à toxicidade, a ciclofosfamida ocasionou redução da massa corporal nos rins, baço, fígado, coração e pulmões. A avaliação da toxicidade demonstrou alterações de diferentes graus de congestão observados no baço, fígado e coração. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as freqüências alélicas e genotípicas de *Cyp2a29* e *Gstp1* nos grupos dos animais estudados. Estudos que preconizam a utilização de testes toxicológicos combinados à avaliação anatomopatológica e investigação da variabilidade genética permitem a padronização de protocolos de tratamento de diversos quimioterápicos.

Palavras-chave: CEC da laringe, suscetibilidade, *CYP1A1m1*, *GSTM1*, *GSTT1* e farmacogenética.

Abstract

The larynx is a tubular organ of the aerodigestive tract whose main function is the production of voice, in addition to tasks related to the protection of the lower airways and swallowing food. The squamous cell carcinoma presents itself as a multifactorial disease and epigenetic being influenced by environmental factors, behavioural and relate to the individual. Several polymorphic genes that encode enzymes involved in the biotransformation of the carcinogens have been associated to the development of cancer, especially in squamous cell carcinoma of head and neck. The CYP1A1m, GSTM1 and GSTT1 genes which catalyzes the oxidation of PAHs in phenolic and epoxides products. The purpose of this study was to evaluate the epidemiological data of patients diagnosed with squamous cell carcinoma of the larynx from the Cancer Registry of Population basis of Goiânia and from Association of Cancer Combat in Goiânia, analyzing data from 63 medical records followed in a period of 6 year; establish the allelic profiles of the gene CYP1A1m, GSTM1 and GSTT1 in case-control groups investigating the degrees of suscetibility of patients diagnosed with squamous cell carcinoma (SCC) of the larynx, according to smoking and alcoholism habits. In total 112 samples were evaluated, 63 from patients with SCC of the larynx and 49 patients in the control group. The CEC of the larynx was about 3,5 times more frequent in men than in women. The rate of survival on general was approximately 66% to 6 years. The smoking and ethilic habits associated have a significantly lower survival. No significant differences were found in the staging analysis and treatment of patients. Were found allelic frequencies of CYP1A1m1 of 52,4% (34/62) and 63,3% (31/49) for the wild allele T and 44,4% (28/62) and 34,7% (18/49) for the mutant allele C. There were no statistically significant associations between allelic variants and genotypic CYP1A1m1 with squamous cell carcinoma of the larynx. Positive genotypic frequencies were observed for the genes GSTM1 and GSTT1 of 41.3% (26/63) and 54.0% (34/63) to the patients with laryngeal cancer, and 49,0% (24/49) and 51,0% (25/49) for the control group, respectively. For the assessment of genotype GSTM1 (null) and GSTT1 (null), the patients if the case group had 58,7% (37/63) and 46,0% (29/63) of genotypes for GSTM1 null and GSTT1, while the patients in the control group showed 51,0% (25/49) and 40,8% (20/49). There was no statistically significance in associations of genotypic variants GSTM1 (null) and GSTT1 (null) with the larynx squamous cell carcinoma. In this context, an experimental study was accomplished in the intention of evaluating the function of the genes Cyp and Gst in the metabolism of the Cyclophosphamide. This study addressed the Cyclophosphamide toxicological evaluation and analysis of the polymorphism of Cyp2a29 and Gstp1 BALB/c genes in mice, correlating them with the toxicity of drugs through the assessment of organs commonly affected. It was determinated the DL50 of the 474mg/kg. Subsequently, another 40 mice were used on the assessment of the genetic polymorphism of genes Cyp2a29 and Gstp1. As for toxicity, cyclophosphamide caused reduction in body weight at different doses and kidneys, spleen, liver, heart and lungs. The animals that received a dose of 500mg/Kg died in 24 hours, three animals with a dose of 250mg/Kg died the end of one week. The evaluation of toxicity showed changes of varying degrees of congestion observed in the spleen, liver and heart. There were not found statistically significant differences between the frequencies of allelic and genotypic to Cyp2a29 and Gstp1 in groups of animals studied. This observation should be probably the characteristic line BALB/c are isogenic. Studies that make the use se of tests of genetic suscetibility, epidemic evaluation, combined to the evaluation anatomopathological they allow the study of the interaction genetic atmosphere and a possible standardization of various chemotherapy protocols for treatment.

Keywords: CEC of larinx, suscetibility, CYP1A1m1, GSTM1, GSTT1 and Pharmacogenetics.