

MARÍLIA BUENO SANTIAGO

*AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS SLC23A2-05 E
KRAS-LCS6 ENTRE PORTADORES DE CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO*

CAMPINAS

2011

MARÍLIA BUENO SANTIAGO

***AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS SLC23A2-05 E
KRAS-LCS6 ENTRE PORTADORES DE CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO***

*Dissertação de mestrado apresentada à Pós Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do
título de Mestre em Ciências Médicas, área de
concentração em Ciências Biomédicas.*

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo.

CAMPINAS

Unicamp

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Sa59a Santiago, Marília Bueno, 1986 -
Avaliação dos polimorfismos *SLC23A2-05* e *KRAS-LCS6* entre portadores de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. / Marília Bueno Santiago. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Carmen Silvia Bertuzzo
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Oncogenes. 2. Estadiamento de neoplasias. 3. Oncologia. 4. Genética. I. Bertuzzo, Carmen Silvia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Assessment of *SLC23A2-05* and *KRAS-LCS6* polymorphisms between patients with head and neck squamous cell carcinoma

Palavra-chave em inglês:

Oncogenes
Cancer staging
Oncology
Genetic

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Andrea Trevas Maciel Guerra
Marilda de Souza Gonçalves
Fátima Aparecida Bottcher Luiz

Data da defesa: 19-08-2011

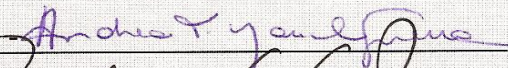
Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

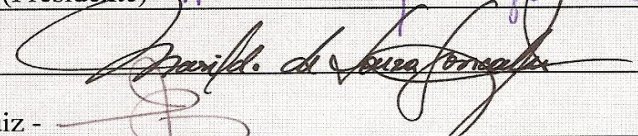
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Marília Bueno Santiago

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

Membros:

1. Profa. Dra. Andrea Trevas Maciel Guerra (Presidente) - 

2. Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves - 

3. Profa. Dra. Fátima Aparecida Bottcher Luiz - 

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 19/08/2011

Dedico este trabalho a pessoas que tenho extremo amor e orgulho, aos meu pais, Rose e André, que durante toda minha existência zelaram por mim e em momento algum me abandonaram. Jamais me permitiram fracassar ou abandonar os meus ideais, acreditando sempre em mim. Me ensinaram o caminho da sabedoria e da vitória, mesmo que para isso fosse necessário antes passar por caminhos árduos. O valor da vida, os sonhos, todos os caminhos que trilhei e momentos que vivi até agora somente posso agradecer a vocês. Vocês são os responsáveis por tudo o que sou e tenho hoje...

Agradecimentos

A Carmen,

Que mais quem uma orientadora, foi uma amiga. Me mostrou o caminho da luz, me ensinou a arte de ser calma e controlar a ansiedade. Pela incansável paciência e infinitos momentos de conversa e descontração. Esteve presente em todos os momentos dessa dissertação, desde uma simples leitura a discussão e análise de um resultado complexo. Sempre atenta e disposta a acolher, foram delas as palavras de conforto e carinho nos momentos de desespero.

Aos meus pais, André e Rose,

Por tudo que fizeram. Pelo apoio, pelo carinho e pela paciência infinita que sempre tiveram comigo. Pelas palavras que me acalmaram mesmo quanto a distância era grande e somente a voz era capaz de me tranquilizar. Que me perdoem pelos momentos de braveza e de raiva, mas nessas horas o medo prevalecia e só vocês foram capazes de me entender e com um simples gesto resolver. Não posso esquecer, de todos os sorrisos e momentos de alegria e incentivo que partiram, sem dúvidas, sempre de vocês. Sem palavras para expressar o amor que tenho a esses dois, que merecem e sempre vão merecer todo o meu carinho e dedicação!!!

A Dra. Carmen Passos Lima,

Por ceder as amostras e permitir que meu trabalho fluísse. Também por disponibilizar seu tempo para correções e dúvidas, sempre com uma palavra de incentivo.

Ao Gustavo,

Pelos incansáveis emails trocados e pelo suporte sempre pacioso e atento a dúvidas.

Ao pessoal do laboratório de genética,

Que por infinitas vezes me apoiaram e me ajudaram, não só nos momentos críticos, mas em dias comuns onde um sorriso e um gesto faziam toda a diferença. Pela grande ajuda nas extrações, no preparo de géis e soluções, nas PCRs e digestões e também pelos momentos de espera no laboratório, onde vocês faziam sempre valer a pena!

Ao Rodrigo,

Pelas incansáveis vezes que me disse “Não! Não, posso te ajudar não!” e sempre com um sorriso no rosto puxava a cadeira e com toda a calma do mundo ouvia os problemas e os solucionava num instante. Obrigada pela interminável ajuda na análise estatística e outros pontos!

As minhas amigas,

Que mesmo de longe acompanharam essa trajetória e torceram para que tudo corresse bem e nos encontros faziam do desespero uma simples piada de fim de noite!

A Deus,

Pela força infinita e pela luz intensa que me permitiu chegar até aqui e encontrar um caminho iluminado para trilhar, que continue me mostrando até o fim um caminho digno, ético e sincero, fazendo de mim uma profissional de caráter e um ser humano de amor e

honestidade. Obrigada por permitir que além da felicidade eu pudesse encontrar algo que fizesse de parte de mim.

A todas as pessoas que dividiram comigo mais esta etapa da minha vida, algumas muito perto, outras nem tanto, mas todas com certeza deixaram sua marquinha! A todos vocês meu carinho e meu agradecimento!

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que elas acontecem, por isso existem
momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas
incomparáveis”.*

Fernando Pessoa

Resumo

O câncer é um dos problemas mais comuns da medicina atual, com cerca de 481.100 novos casos por ano, atingindo mais de um terço da população mundial. O câncer de cabeça e pescoço em sua maioria é representado por neoplasias epiteliais do tipo carcinoma de células escamosas (CEC) que acometem as vias superiores aéreo-digestivas. A grande maioria dos casos é representada por tumores esporádicos. Estudos têm associado o CEC a alguns polimorfismos como o Kras-LCS6, que reduz significativamente o tempo de vida em pacientes com tumores de cabeça e pescoço e sugere que esta variante pode alterar o fenótipo ou a resposta terapêutica da doença e o polimorfismo associado ao transporte sódio dependente de vitamina C, SLC23A2-05, que modifica o risco de câncer de cabeça e pescoço em indivíduos portadores do HPV16 Humano, HPV positivos têm risco aumentado, enquanto nos negativos este risco se reduz. O objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência dos polimorfismos Kras-LCS6 e SLC23A2-05 em uma amostra de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, verificando a importância desses polimorfismos no acometimento e na gravidade da doença, através de um estudo de associação. Foi utilizada a técnica de PCR associada a digestão enzimática. Foram avaliados 165 casos e 230 controles para cada polimorfismo. No polimorfismo Kras-LCS6 a frequência gênica dos alelos T e G encontradas foram de 0,91 e 0,09 na amostra do grupo caso e 0,90 e 0,10 na amostra controle. Para o polimorfismo SLC23A2-05 a frequência gênica dos alelos C e G foram de 0,47 e 0,53, respectivamente, tanto no grupo de caso quanto no grupo controle. Da análise do teste de regressão logística, nenhuma associação foi encontrada entre os polimorfismos analisados e o CEC, bem como com o estadiamento da doença.

Abstract

Cancer is one of the most common problems in medicine today, with approximately 481,100 new cases per year, reaching more than a third of the world population. Head and neck cancer is mostly represented by type of skin cancer squamous cell carcinoma affecting the upper aero-digestive pathways. The majority of cases is represented by sporadic tumors. Studies have associated some gene polymorphisms with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) as the Kras-LCS6, which reduces significantly the survival in patients with head and neck tumors and suggests that this variant may alter the phenotype of the disease or therapeutic response and polymorphisms associated with sodium-dependent vitamin C, SLC23A2-05, which modifies the risk of head and neck cancer in individuals with the Human HPV16, positive HPV have an increased risk, while in the negative this risk is reduced. The aim of this study was to evaluate the prevalence of polymorphisms Kras-LCS6 and SLC23A2-05 in a sample of patients with head and neck squamous cell carcinomas, verifying the importance of these polymorphisms in the onset and severity of the disease, through a study of association. We used the PCR method combined with PCR-RFLP. We evaluated 165 cases and 230 controls for each gene polymorphism. In Kras-LCS6 Polymorphism found the gene frequency of 0.91 and 0.09 T and G alleles in the sample of patients and 0.90 and 0.10 in the control sample. For the SLC23A2-05 polymorphism gene frequency of the C and G alleles were 0.47 and 0.53, respectively, both in the patient group and control group. In logistic regression test analysis, we don't found any association between two polymorphisms studied and HNSCC, as well as with the disease staging.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AS	Anti-sense
β	Coeficiente de regressão
C	Citosina
CCECP	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço
CEC	Carcinoma de células escamosas
CFC	Síndrome Cardiofasciocutânea
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
G	Guanina
HCl	Ácido clorídrico
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
HPV	Papiloma vírus humano
IC	Intervalo de confiança
LiCl	Cloreto de lítio
Max	Máximo
MG	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Min	Mínimo
miRNA	Micro RNA
mL	Mililitro
Mm	Mili molar
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
Pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogênico
Qsp	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico

RPM	Rotação por minuto
S	Sense
SDS	Sódio dodecil sulfato
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> – Polimorfismo de base única
T	Timina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização da amostra com relação a média de idade.....	39
Tabela 2: Caracterização dos 165 indivíduos do grupo caso e dos 199 do grupo controle com relação ao hábito de fumar e ingerir bebida alcoólica.....	39
Tabela 3: Concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR para os polimorfismos Kras-LCS6 e SLC23A2-05.....	41
Tabela 4: Descrição dos “primers” utilizados na PCR dos polimorfismos, temperatura de anelamento específica para cada reação e tamanho do fragmento esperado.....	42
Tabela 5: Descrição dos ciclos utilizados para cada polimorfismo.....	42
Tabela 6: Descrição das condições para realização da digestão enzimática.....	43
Tabela 7: Genótipo e frequência genotípica encontrada no polimorfismo Kras-LCS6 entre 165 indivíduos do grupo casos e 230 indivíduos do grupo controle.....	46
Tabela 8: Genótipo e frequência genotípica encontrada no polimorfismo SLC23A2-05 entre 165 indivíduos do grupo caso e 230 indivíduos do grupo controle.....	48
Tabela 9: Resultados da análise de regressão logística para os 165 indivíduos do grupo caso diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço.....	48
Tabela 10: Resultados da análise da regressão logística dos genótipos e alelos para 100 indivíduos do grupo caso diagnosticados com câncer de laringe.....	49
Tabela 11: Resultados da análise de regressão logística dos genótipos e alelos para 65 indivíduos do grupo casos diagnosticados com câncer de faringe e cavidade oral.....	49
Tabela 12: Correlação entre o estadiamento e os polimorfismos Kras-LCS6 e SLC23A2 -05 nos 165 indivíduos do grupo caso diagnosticados com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização do gene <i>Kras2</i> no cromossomo 12	28
Figura 2: Ativação da via de multiplicação celular do gene <i>Kras2</i>	29
Figura 3: Variante protéica resultante do <i>splicing</i> alternativo do gene <i>Kras</i>	31
Figura 4: Tipos de mutação no gene <i>Kras</i>	32
Figura 5: Localização do gene <i>SLC23A2</i> no cromossomo 20	32
Figura 6: Variante protéica resultante do <i>splicing</i> alternativo do gene <i>SLC23A2</i>	33
Figura 7: Produto resultante da PCR e digestão enzimática do polimorfismo <i>Kras</i> -LCS6 em gel de poliacrilamida 12%	45
Figura 8: Produto resultante da PCR e digestão enzimática do polimorfismo <i>SLC23A2</i> -05 em gel de poliacrilamida 12%.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Áreas acometidas pelo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.....17

Quadro 2: Interação miRNA let-7 e gene *Kras* como mecanismo de controle da via de multiplicação celular *KRAS*.....31

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE FIGURAS.....	XV
LISTA DE QUADROS.....	XVI
1 - INTRODUÇÃO	20
1.1 Epidemiologia.....	21
1.2 Aspectos Clínicos	22
1.3 Aspectos Ambientais.....	24
1.4 Aspectos Genéticos	25
1.4.1 Polimorfismo Kras-LCS6.....	27
1.4.2 Polimorfismo SLC23A2-05	32
2 - OBJETIVOS	35
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Casuística.....	38
3.2 Métodos.....	40
3.2.1 Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico.....	40
3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase.....	41
3.2.3 Digestão Enzimática	42
3.2.4 Análise de dados.....	43
4 - RESULTADOS.....	44
4.1 Análise dos Polimorfismos	45
4.1.1 Análise do Polimorfismo Kras-LCS6.....	45
4.1.2 Análise do Polimorfismo SLC23A2-05	46
5 - DISCUSSÃO	51

6 - CONCLUSÃO	55
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
8 - ANEXOS	66
8.1 Anexo 1: Estágio do Sistema TNM	67
8.2 Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	82
8.3 Anexo 3: Caracterização do grupo caso com relação a sexo, idade de diagnóstico, raça, localização primária do tumor, tabagismo e etilismo.....	83
8.4 Anexo 4: Caracterização do grupo controle com relação a sexo e idade...	87

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

O câncer é um dos problemas mais comum da medicina atual e as estatísticas mostram que atinge mais de um terço da população mundial, causando mais de 20% de mortes e nos países desenvolvidos, é responsável por cerca de 10% do custo total da assistência médica populacional¹.

O conceito de câncer como doença genética é relativamente recente e o nome não é dado a uma doença única e sim a uma grande variedade de tumores malignos que se formam a partir de células em crescimento descontrolado, resultando em uma proliferação celular que invade tecidos vizinhos e pode causar metástase¹. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida. As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais².

Os tumores de cabeça e pescoço têm alta morbidade e mortalidade em todo o mundo, incluindo o Brasil, onde normalmente o diagnóstico é tardio, e por isso são motivos de muita preocupação para a saúde mundial³.

A incidência da doença aumenta com a idade, sendo a maioria dos casos identificados em indivíduos com cerca de 50 anos, além de ser mais freqüente em indivíduos do sexo masculino do que do sexo feminino, com proporção de 5:2⁴. São relatados anualmente em todo o mundo cerca de 481.100 novos casos, sendo dois terços com ocorrência em países em desenvolvimento⁵.

No Brasil, de acordo o Instituto Nacional do Câncer - INCA, foram registrados 489.270 novos casos de câncer em 2010, sendo 236.240 em homens e 253.030 em mulheres. Com relação ao câncer da cavidade oral a incidência no ano de 2010 no estado de São Paulo foi de 15,19 casos para cada 100 mil homens e 4,02 casos para cada 100 mil mulheres. Para os indivíduos do sexo masculino, a maior incidência observada foi no estado do Rio de Janeiro com 18,89 casos para cada 100 mil e a menor no estado do Maranhão com 1,68 casos para cada 100 mil. Já para o sexo feminino a maior incidência de câncer da

cavidade oral foi no estado do Rio Grande do Norte com 5,37 em 100 mil e a menor no estado do Acre com apenas 0,97 casos para cada 100 mil mulheres².

Em nosso país a incidência deste tipo de câncer é considerada uma das mais altas do mundo, estando entre os 6 tipos mais comuns que acometem o sexo masculino e entre os 8 mais comuns que acometem o sexo feminino³.

No entanto, os dados epidemiológicos do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço não são totalmente conhecidos no Brasil.

1.2 Aspectos Clínicos

O câncer é considerado uma das maiores causas de morte no mundo e é definido como uma doença genômica, surgindo como consequência de alterações cumulativas no material genético (DNA) de células normais, as quais sofrem transformações até se tornarem malignas⁶.

As células humanas normais coexistem em estado harmônico de crescimento e função e são constituídas por três partes: a membrana celular, que é a parte mais externa; o citoplasma que é o corpo da célula; e o núcleo, que contém os cromossomos. Os cromossomos são compostos por genes, que são os “arquivos” do corpo, guardam e fornecem instruções para a organização das estruturas, formas e atividades celulares no organismo. Toda a informação genética encontra-se inscrita nos genes, numa espécie de "memória química", o chamado o ácido desoxirribonucleico (DNA). É através do DNA que os cromossomos passam as informações para o funcionamento celular⁷.

A neoplasia nada mais é do que um acúmulo anormal de células que ocorre devido a um desequilíbrio entre a proliferação e o desgaste celular. O desenvolvimento da célula cancerígena resulta de múltiplas etapas e pode envolver dezenas e até centenas de genes, por meio de mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, amplificações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos⁸.

Os principais grupos de genes envolvidos nesse processo são os proto-oncogenes que quando ativados se transformam em oncogenes e são responsáveis pela malignização das células normais, os genes supressores tumorais e os genes relacionados ao reparo do DNA, além da expressão alterada de genes que promovem a vascularização e disseminação tumoral através da invasão local ou a distância^{1,8}.

A identificação dos genes envolvidos no câncer proporciona uma melhor compreensão acerca da doença, além de contribuir para novas formas de diagnóstico precoce, facilitando assim o seu tratamento⁹.

O câncer de cabeça e pescoço usualmente se apresenta como um conjunto de sinais e sintomas que incluem lesão de cavidade oral, aumento de volume da região cervical, dificuldade de ingestão de alimentos, rouquidão, sangramento e dor em alguns casos^{10,11}.

A incidência do câncer de cabeça e pescoço aumenta com a idade, à semelhança do que ocorre com as demais neoplasias^{4,12}. Acomete indivíduos com idade superior a 40 anos, sendo que a maioria dos casos é identificada em indivíduos com idade maior que 50 anos^{4,12,13}. Acomete mais frequentemente indivíduos do sexo masculino do que do sexo feminino, que guardam entre si uma relação de 5:2^{11,14}.

O tipo histopatológico mais comum é o carcinoma de células escamosas (CEC), identificado em cerca de 90-95% dos casos da doença¹⁴. O CEC de cabeça e pescoço é considerado um problema de saúde pública mundial, uma vez que seus dois principais fatores de risco, o tabaco e o consumo de álcool, possuem alta prevalência. Mais de 400 mil novos casos são anualmente diagnosticados no mundo, ocupando o sexto lugar entre as neoplasias mais comuns.

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CEC) pode se manifestar em três áreas do corpo humano: cavidade oral, faringe e laringe. Na cavidade oral, as áreas mais frequentemente acometidas são em ordem: língua, assoalho de boca, gengiva, palato duro, bochecha, lábio e trígono retromolar¹⁵.

Para melhor compreensão temos as áreas com suas respectivas divisões no quadro 1, de acordo com Maluf FC(2008)¹⁵.

Quadro1: Áreas acometidas pelo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.

Cavidade Oral	
Faringe	Orofaringe Hipofaringe
Laringe	Supraglote Glote Subglote

O CEC também é usualmente classificado de acordo com o grau de diferenciação celular em indiferenciado, pouco diferenciado, moderadamente diferenciado e bem diferenciado¹⁶. O grau de diferenciação do tumor é um parâmetro para se predizer o prognóstico dos pacientes com CEC¹⁷. Outro fator com valor prognóstico para pacientes com CEC é o estágio do sistema TNM (Anexo1). O sistema TNM considera a extensão de acometimento local do tumor (T), a identificação da presença ou ausência de metástases para linfonodos (N) e metástases para regiões à distância (M)². Cinco grupos de pacientes podem ser identificados por este sistema (estádios 0, I, II, III e IV), sendo que as maiores probabilidades de sobrevivência são observadas naqueles com doença localizada e as menores probabilidades de sobrevivência naqueles com a doença avançada^{16,17}.

De fato, quando o diagnóstico é feito precocemente, o tratamento cirúrgico radical ou a radioterapia oferecerem sobrevida de cinco anos para cerca de 60-80% dos pacientes^{18,19}. Entretanto, a maioria deles chega aos hospitais de referência com a doença avançada, o que torna o prognóstico reservado, ou seja, a taxa de sobrevivência de cinco anos livre da doença no caso do câncer oral é 76% em pacientes de CEC de cabeça e pescoço nos estágios I e II e cai para 41% quando existe comprometimento dos linfonodos cervicais e para 9%, quando há metástase abaixo da clavícula, mesmo quando adequadamente tratados^{20,21}.

1.3 Aspectos Ambientais

Os aspectos ambientais são de grande importância para a origem da doença. Entende-se por ambiente o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (indústrias químicas e afins), o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos) e o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida). Dessa forma, as mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, os hábitos e o estilo de vida adotado pelas pessoas, podem determinar diferentes tipos de câncer².

É bastante conhecido o fato de que indivíduos com o hábito de fumar ou de ingerir bebidas alcoólicas têm maior probabilidade de desenvolver carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço^{14,22,23,24}.

O tabagismo e o etilismo parecem agir sinergicamente para o aumento do risco de desenvolvimento ao CEC, podendo ser as principais causas desses tumores. É difícil avaliar o efeito individual destes agentes na etiologia do CEC de cabeça e pescoço, pois os indivíduos fumantes tendem a ser os mesmos a consumir álcool e vice-versa^{25,26}.

O padrão da dieta parece contribuir também para a ocorrência da doença, sendo o risco associado ao CEC de cabeça e pescoço inversamente proporcional à ingestão de vegetais e frutas frescas. Na dieta carente em ferro, especialmente na forma grave e crônica conhecida como síndrome de Plummer-Vinson há elevação do risco associado ao CEC de faringe e área posterior da boca, pois pessoas com deficiência de ferro na dieta tendem a ter uma redução da imunidade mediada por célula, sendo o ferro essencial para o funcionamento normal das células epiteliais do trato digestivo superior²⁰. Além disso, o alto consumo de carnes cozidas a elevadas temperaturas pode levar a produção dos HPAs (hidrocarboneto policíclico aromático), sendo assim, fatores de risco ao CEC de cabeça e pescoço^{14,27}.

O envelhecimento também traz mudanças nas células, que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna. Isso, somado ao fato das células de pessoas idosas terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco para câncer, explica em parte o porquê de o câncer ser mais freqüente nesses indivíduos. Os fatores de risco ambientais de câncer são denominados cancerígenos ou carcinógenos. Esses fatores atuam alterando a estrutura genética (DNA) das células².

O surgimento do câncer depende da intensidade e duração da exposição das células aos agentes cancerígenos. Por exemplo, o risco de uma pessoa desenvolver câncer de pulmão é diretamente proporcional ao número de cigarros fumados por dia e ao número de anos que ela vem fumando².

1.4 Aspectos Genéticos

O câncer de cabeça e pescoço, em sua maioria, é representado por neoplasias epiteliais do tipo carcinoma de células escamosas (CEC) que acometem as vias superiores aéreo-digestivas, identificado em cerca de 95% dos casos²⁸. Trata-se de uma das doenças neoplásicas mais freqüentes no Brasil. O comportamento desses tumores merece destaque, pois é bastante agressivo, apresentando metástase cervical precoce²⁹.

Aproximadamente 5% a 10% dos cânceres parecem seguir um padrão de herança hereditária, devido a diferenças individuais geradas por polimorfismos gênicos relacionados a mecanismos da carcinogênese, porém na grande maioria dos casos são esporádicos, ou seja, tumores adquiridos.

Como mencionado anteriormente o câncer de cabeça e pescoço é determinado tanto por fatores ambientais quanto por fatores genéticos. Os principais fatores de risco

reconhecidos são o álcool e o fumo, que são metabolizados de forma variável por genes polimórficos como o do sistema do citocromo P450 *CYP1A1* e do sistema da glutathione S-transferase, *GSTM1* e *GSTT1*^{29,30}. Seguidos pelo Papiloma vírus humano (HPV), predisposição genética, hábito alimentar com grande ingestão de gorduras e pouca ingestão de frutas e vegetais que contêm vitaminas A, C e beta carotenos, que são sugestivamente consideradas protetores em relação ao desenvolvimento de neoplasias^{31,32}, trauma crônico, ingestão de mate e exposição ocupacional, entre outros^{33,34}. Alguns estudos já encontram relação entre câncer de cabeça e pescoço e determinadas ocupações como agricultor, açougueiro, pedreiro, condutor de veículos a motor, pescador, entre outros, além de exposições a certas substâncias químicas como o formaldeído, dioxinas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)³⁵.

A alta incidência da doença e o índice de sobrevivência global de cinco anos para 65% dos pacientes com CEC de cabeça e pescoço nos estágios iniciais (I e II) e de menos de 30% para aqueles com tumores de estágios mais avançados (III e IV)¹⁰ justificam a busca de maior conhecimento sobre a sua etiologia e fisiopatologia em diferentes grupos étnicos.

O principal agravante deste tipo de tumor é o fato de ele ser oligossintomático no início, seja devido ao padrão de inervação sensitiva ou devido à superfície irregular da mucosa, em especial as tonsilas palatinas, onde um pequeno carcinoma pode ficar oculto ao exame clínico, ou ainda pelo padrão de inspeção do paciente que pode nem sempre estar atento aos sinais dados pelo organismo³⁶.

Os cânceres de cabeça e pescoço são tumores de tecido mole que surgem predominantemente nas superfícies mucosas dos lábios, cavidade oral, faringe, laringe e esôfago cervical¹⁰. As queixas mais frequentes por parte dos pacientes são a dor no local, a otalgia, a disfagia, o trismo e o aumento do volume dos linfonódos cervicais²⁸.

Sabe-se que mutações em oncogenes, como o ciclina D1, em genes supressores tumorais, como o TP16 e o P53 e a instabilidade de micro-satélites apresentam ligação com a ocorrência de cânceres de cabeça e pescoço²⁹.

Além disso, podemos associar também alguns polimorfismos de base única (*SNPs*) em genes diversos como, por exemplo, os genes codificadores de enzimas envolvidas na detoxificação de carcinógenos como as glutathione S-transferases (*GSTs*) e na ativação dos mesmos, como o sistema dos citocromos (*CYPs*), que parecem influenciar neste mecanismo³⁷. O gene *XRCC1*, que é um gene de reparo de DNA³⁸. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que é responsável pela angiogênese, processo pelo qual os

novos vasos sanguíneos se desenvolvem a partir do endotélio preexistente³⁹, que desempenha um dos fatores mais importantes e críticos na angiogênese, pois ele se liga especificamente a dois receptores *VEGF* transmembrana tirosina quinases sobre células endoteliais e dá início a um sinal de tradução intracelular que controla a angiogênese e permeabilidade vascular⁴⁰. Sendo assim, o *VEGF* forma os novos vasos sanguíneos que irrigam o tumor, fornecendo nutrientes e oxigênio e promovendo assim o crescimento e invasão das outras células⁴¹. O gene *VEGF* está localizado na região cromossômica 6p21.3 e tem 8 éxons⁴². Outro polimorfismo importante é o *FGFR4 Arg388*, pois está ligado aos fatores de crescimento do fibroblasto⁴³.

Temos também, a proteína β -catenina que se encontra geralmente na célula normal, sendo um dos componentes do complexo de proteínas na membrana plasmática e é responsável pela junção entre as células. Além disso, também está presente no citoplasma, mediante ação do sistema de sinalização celular, onde é responsável pela transcrição dos genes no núcleo. Pesquisas mostraram a relação desta proteína na carcinogênese, principalmente quando ela está associada a adesão celular, pois a β -catenina pode se degradar e reduzir sua expressão na membrana, o que indica a invasão e metástase no CEC^{44,45}.

Para finalizar, temos outros dois polimorfismos, o *Kras-LCS6* e o *SLC23A2-05*, que são temas desta dissertação.

1.4.1 Polimorfismo Kras-LCS6

O polimorfismo *Kras-LCS6*, localizado no gene *Kras2* (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), está associado a uma significativa redução no tempo de vida de pacientes com tumores de cabeça e pescoço e a presença desta variante sugere uma possível alteração do fenótipo ou resposta terapêutica desta doença⁴⁶.

Segundo Chang et al.⁴⁷, foram identificadas duas isoformas do gene *Kras*, o *Kras1* e *Kras2*. O oncogene *Kras2* foi amplificado em várias linhagens de células tumorais⁴⁸. McGrath et al.⁴⁹, clonaram os genes *Kras1* e *Kras2* e verificaram que o gene *Kras1* é um pseudogene, onde diversas seqüências foram deletadas. No gene *Kras 2*, devido ao *splicing* alternativo, verifica-se a existência de duas variantes, isoformas A e B, que diferem entre si na região C-terminal⁵⁰.

O gene *Kras2* se localiza no cromossomo 12, mais especificamente em 12p12.1⁵¹ (Figura 1) e o pseudogene *Kras1* se localiza no cromossomo 6, 6p12-p11 e seu símbolo oficial foi mudado para *KRAS1P*⁵².

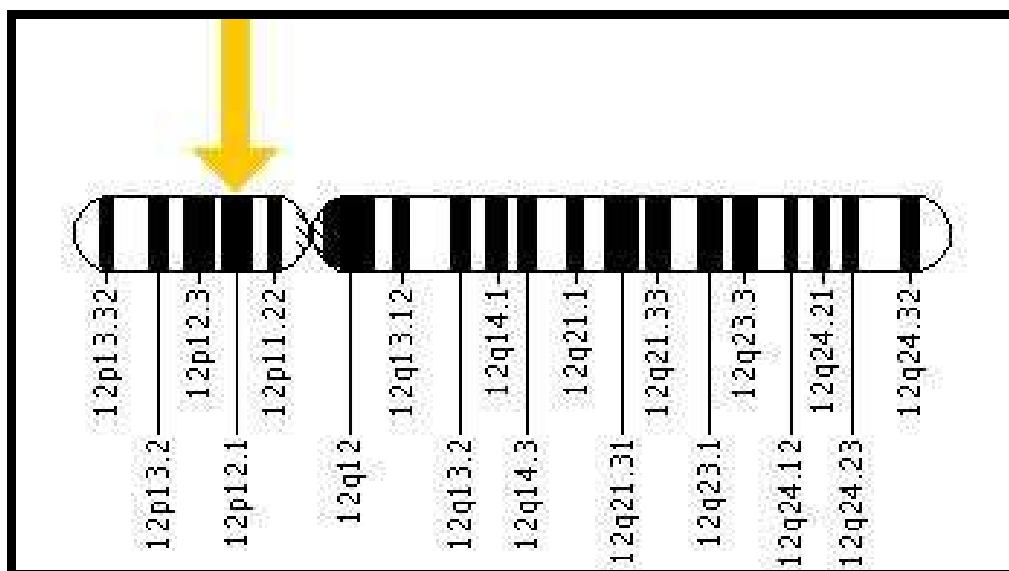


Figura1: Localização do gene *Kras2* no cromossomo 12⁵³.

O gene *Kras2* tem um total de 6 éxons. Os éxons 2, 3 e 4 não sofrem variação, já o éxon 5 sofre *splicing* alternativo resultando na isoforma B (*KrasB*). Na isoforma A (*KrasA*), o éxon 6 codifica a região 3'UTR e na B (*KrasB*), o éxon 6 codifica a região C-terminal⁵⁰. O polimorfismo *Kras-LCS6*, encontrado neste gene possui a variante G/T.

O gene *KRAS* codifica uma proteína chamada K-Ras, que está envolvida principalmente na regulação da divisão celular. Através de um processo conhecido como transdução de sinais, a proteína retransmite os sinais provenientes do exterior da célula para o núcleo. Estes sinais instruem a célula a crescer e a se dividir ou amadurecer e assumir funções especializadas (diferenciação). A proteína K-Ras é uma GTPase, o que significa que ela converte uma molécula de GTP em GDP. A proteína K-Ras age como um interruptor, e é ligado e desligado pelas moléculas de GTP e GDP. Para transmitir sinais, a proteína K-Ras deve ser ativada através da ligação com GTP. A proteína K-Ras está desativada (inativada), quando converte o GTP em GDP. Quando a proteína está ligada ao GDP, não retransmite sinais para o núcleo da célula⁵⁴.

O gene *KRAS* é da família dos oncogenes *Ras*, que também inclui dois outros genes: *HRAS* e *NRAS*. As proteínas produzidas a partir destes três genes são GTPases. Estas

proteínas desempenham um papel importante na divisão celular, diferenciação celular, e na auto-destruição das células (apoptose).

A via de multiplicação celular do *KRAS* é ativada mediante ligação de fatores de crescimento no receptor de membrana. Após essa ligação uma cascata de reações de tirosina quinase é ativada, onde atua a proteína K-ras. Essa cascata finaliza na ativação de fatores transcripcionais no núcleo, que irão induzir a expressão de vários genes responsáveis pela multiplicação celular. O gene *KRAS* faz parte da família *RAS*, junto com os genes *HRAS* e *NRAS*, que também atuam nessa cascata de sinalização. Já foram descritas mutações no gene *HRAS* como responsáveis pela Síndrome de Costello. Já no gene *Kras*, mutações foram associadas ao fenótipo da Síndrome de Noonan 3, uma síndrome autossômica dominante, onde o indivíduo afetado apresenta baixa estatura, dismorfismos faciais e mal-formações cardíacas e com a Síndrome Cardiofasciocutânea, onde os indivíduos afetados apresentam alterações ectodérmicas, defeitos cardíacos e retardo mental. O *KRAS* é um dos quatro genes relacionados a essa síndrome, no entanto, não se conhece ainda o mecanismo pelo qual as mutações levam a quadros sindrômicos ou a quadros oncológicos^{54,55,56,57} (Figura 2).

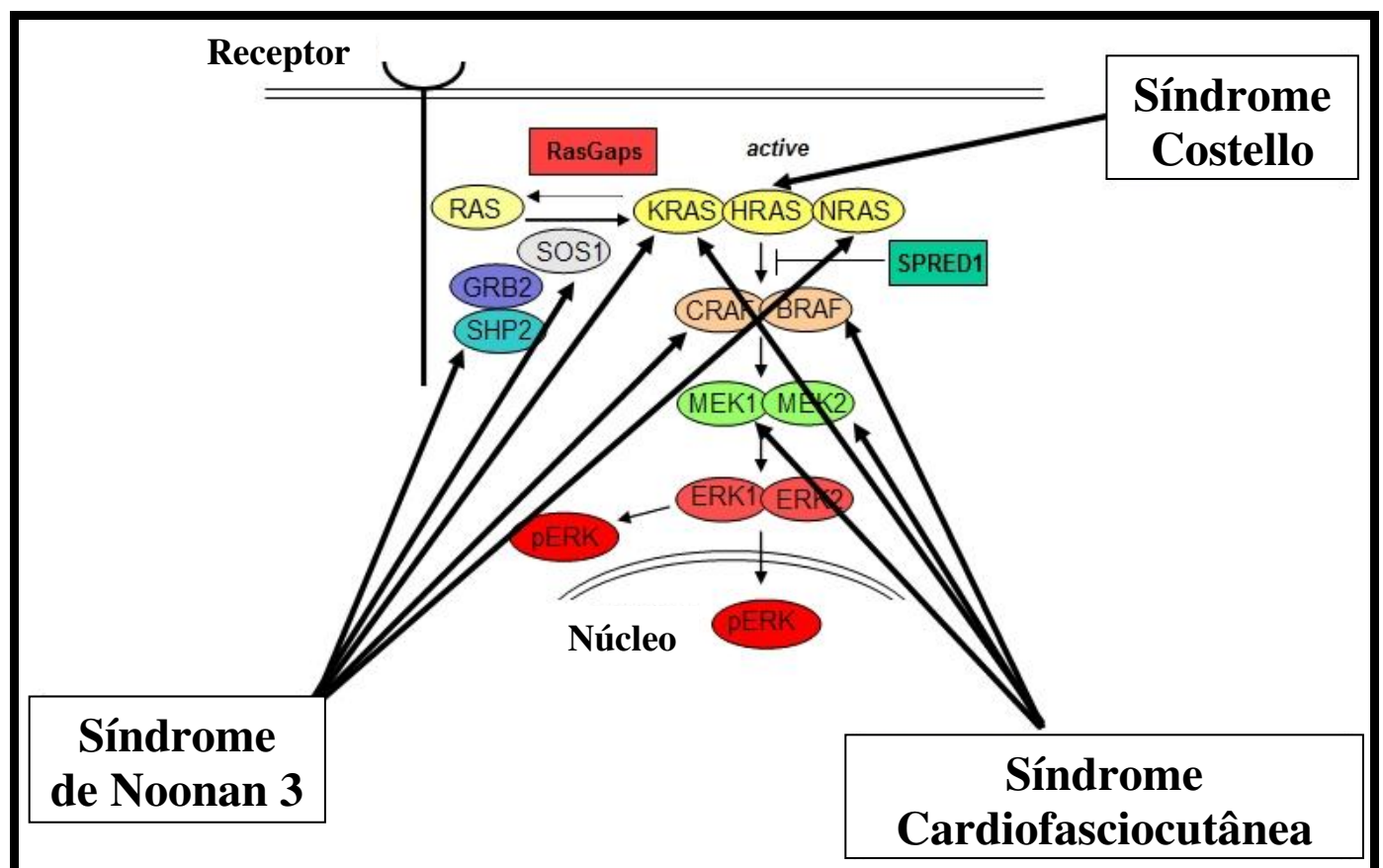


Figura 2: Ativação da via de multiplicação celular do gene *Kras2*⁵⁷.

O *Kras* é conhecido por ser um dos mais ativados oncogenes, cerca de 17 a 25% de todos os tumores humanos são ativados por meio de mutação do gene *Kras*⁵⁵. Cerca de 16 mutações foram descritas no gene, ligadas as síndromes de Costello, Noonan 3 e Cardiofasciocutânea (CFC) e outras 86 mutações oncogênicas⁵⁶. A grande maioria das mutações oncogênicas ocorre nos códons 12, 13 ou 61. Estas não são as mesmas mutações encontradas na síndrome de Noonan 3 ou síndrome de CFC. As mutações pontuais no gene *KRAS* representam cerca de 85% das mutações da família *Ras*⁵⁷.

Em 2005, Johnson et al.⁵⁸, encontrou três genes *RAS*: *HRAS*, *KRAS*, e *NRAS* complementares na região 3'UTRs que permitem ao miRNA let-7 regular sua expressão. A expressão do miRNA let-7 foi menor em tumores no tecido pulmonar do que em tecido normal do pulmão, no entanto a expressão da proteína RAS foi significativamente maior em tumores pulmonares, sugerindo um possível mecanismo de ação do miRNA let-7 no câncer⁴⁸.

MiRNAs são pequenos RNAs não-codificantes que impedem a tradução de genes alvo através da ligação com a região 3'UTR de mRNAs⁵⁹. Os miRNAs desempenham papel crítico na regulação gênica e alteram a expressão de miRNAs em tumores humanos, o que tem sido bem documentado⁶⁰.

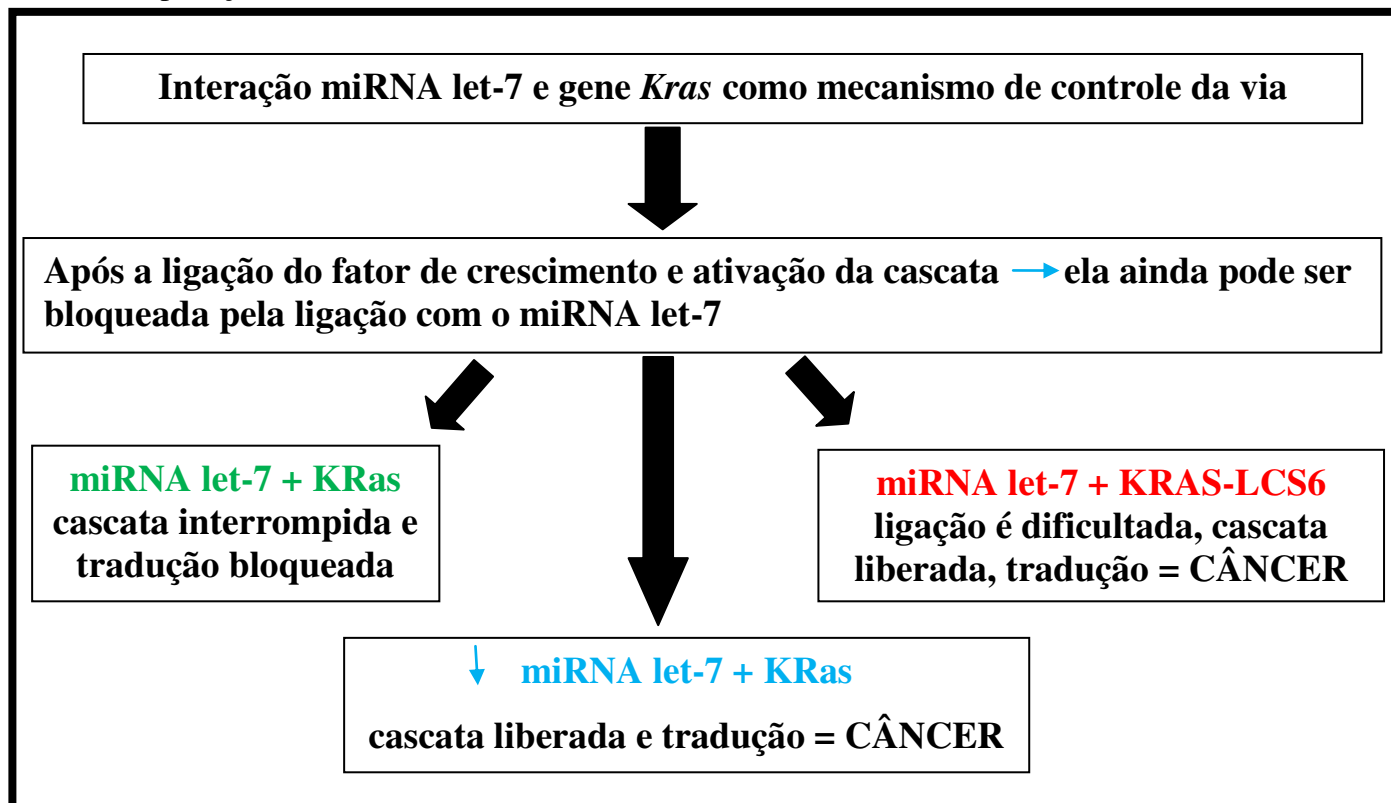
Um exemplo de miRNA que tem demonstrado alterar o risco da doença é o let-7 complementar ao SNP na região 3'UTR do *Kras*⁶¹. A família let-7 demonstrou atuar na regulação do gene *Kras*⁵⁸. *Kras* é um gene ativado por mutação somática, em muitos tipos de câncer humano. Pertence a família dos oncogenes *RAS* que estão bem caracterizados pelas GTPases⁶².

Um recente estudo de células do câncer do pulmão (CPNPC) indicou que os indivíduos tabagistas a mais de 40 anos e que possuem a variante do *KRAS* let-7 (*KRAS*-LCS6) tiveram um aumento significativo do risco de doença. Além disso, esses autores caracterizaram a função de *Kras*-LCS6, determinando que a variante do alelo está associada ao aumento da expressão de *Kras* e diminuição dos níveis de let-7⁶¹.

Foi descrito a interação entre o miRNA let-7 e o gene *Kras* como mecanismo de controle da via *Kras*. Assim, após a ligação do fator de crescimento e ativação da cascata, ela ainda pode ser bloqueada pela ligação com o miRNA let-7. Assim, quando ocorre a ligação do gene *Kras* com o miRNA let -7, a cascata é interrompida e se mantêm o bloqueio da tradução de genes responsáveis pela multiplicação celular. Quando a concentração de miRNA let-7 diminui, a cascata é liberada e a tradução ocorre. No entanto, alguns autores descrevem que no caso do alelo *Kras*-LCS6, a ligação com o

miRNA let-7 é dificultada e portanto, a cascata é liberada e a tradução dos genes responsáveis pela multiplicação celular ocorre (Quadro 2).

Quadro 2: Interação miRNA let-7 e gene *Kras* como mecanismo de controle da via de multiplicação celular do *KRAS*



Indivíduos com câncer oral e qualquer variante deste alelo têm sobrevida significativamente reduzida⁴⁶. Outros trabalhos mostram que os baixos níveis de let-7a-2 se correlacionam com baixa sobrevida no adenocarcinoma pulmonar⁶³ (Figura 3 e 4).

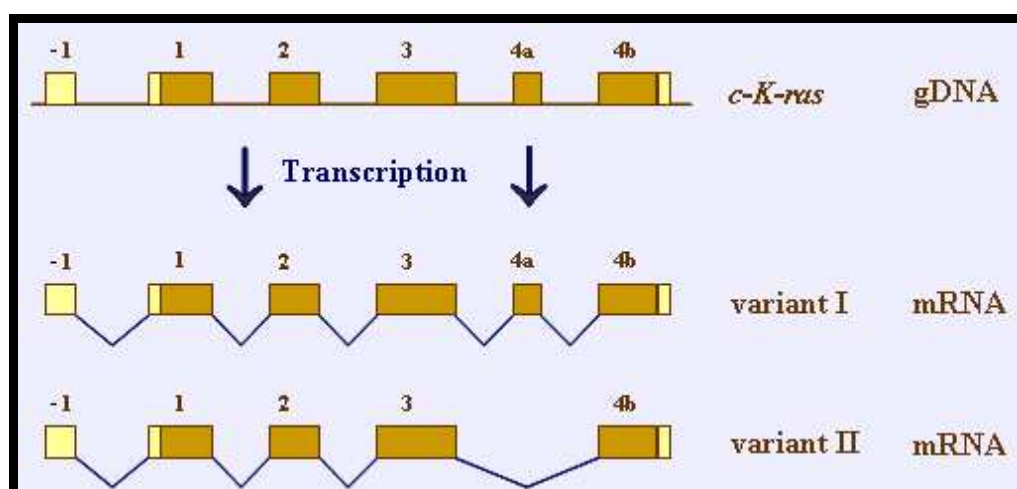


Figura 3: Variante protéica resultante do *splicing* alternativo do gene *Kras*.

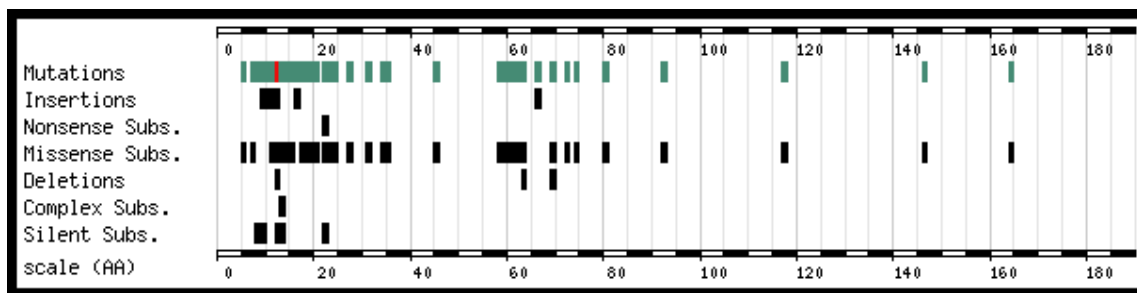


Figura 4: Tipos de mutação no gene *Kras*.

1.4.2 Polimorfismo SLC23A2-05

O outro polimorfismo associado ao câncer de cabeça e pescoço é o polimorfismo SLC23A2-05 no gene transportador sódio dependente de vitamina C, o gene *SLC23A2*, que codifica proteínas encontradas em frutas cítricas, e modifica o risco de câncer de cabeça e pescoço em indivíduos portadores do HPV16 Humano⁶⁵. Indivíduos HPV positivos têm um risco aumentado, enquanto nos indivíduos HPV negativos este risco se reduz⁶⁶.

O gene *SLC23A2* está localizado no cromossomo 20, mais precisamente na região 20p13-p12 e é responsável pelo transporte da vitamina C no organismo⁶⁷(Figura 5). Possui 17 éxons e nove mRNA variantes resultantes de processamento alternativo. Foram descritas cerca de 623 variantes, entre SNPs, inserções e deleções⁶⁸.

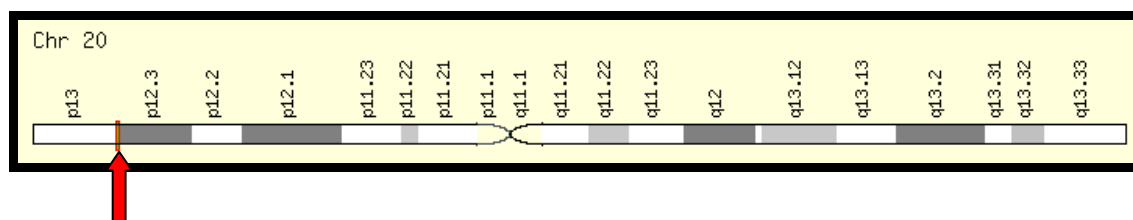


Figura 5: Localização do gene *SLC23A2* no cromossomo 20.

O metabolismo da vitamina C, manifestado por uma alteração no transporte, modifica a probabilidade ou as consequências da infecção por HPV16 e subsequente desenvolvimento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço⁶⁵. A concentração de vitamina C (ascorbato) no meio intracelular ocorre por meio de difusão passiva e facilitada, bem como pelo transporte ativo sódio – dependente de ascorbato através de transportadores de vitamina C. As proteínas que facilitam este transporte ativo são denominadas SVCT1 e SVCT2, e são codificadas pelos genes *SLC23A1* e *SLC23A2*, respectivamente. A proteína SVCT1 é responsável pelo transporte ativo de L-ascorbato de

superfície luminal do trato gastrointestinal e renal^{69,70}. E a proteína SVCT2, que se expressa na maioria dos tecidos humanos, com exceção do pulmão e músculo esquelético, é responsável por regular os níveis intracelulares de ácido ascórbico para proteção celular do estresse oxidativo, além de promover a maturação de células de colágeno tipo I^{65,71}. Os níveis intracelulares de vitamina C são rigorosamente controlados através de regulamentação dos transportadores que, por sua vez, são regulados pela concentração de ascorbato, por citocinas inflamatórias locais e sistêmicas, pela presença de uma isoforma negativa da proteína SVCT2, por hormônios e pela proteína de sinalização quinase C⁷² (Figura 6). A infecção por HPV16 inicialmente resulta em dano epitelial, seguido pela exposição e invasão viral da epiderme, finalizando na expressão de genes que regulam a transcrição viral, alterações na transcrição do fator de regulação e alteração em oncogenes virais que alteram a progressão do ciclo celular⁷³.

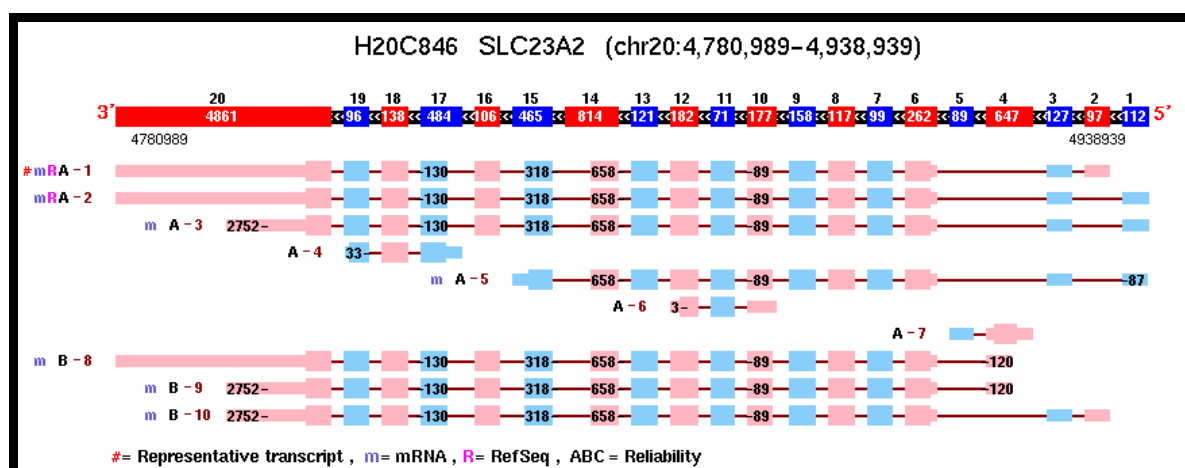


Figura 6: Variante protéica resultante do *splicing* alternativo do gene *SLC23A2*.

Uma variação C/G no íntron 8 (posição 48263), denominada SLC23A2-05, tem sido estudada e associada ao carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP). Estudos mostraram que a variação genética SLC23A2-05 associada a indivíduos HPV positivos, alteram o risco de CCECP. Recentemente, foi relatada uma interação significativa entre sorologia positiva para HPV16 e a ingestão de citrinos por pacientes portadores de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço⁶⁶.

Nos dias de hoje a infecção por HPV representa cerca de 25% das causas de câncer de cabeça e pescoço, sendo encontrado principalmente em tumores de orofaringe⁷⁴.

As principais formas de tratamento do carcinoma de células escamosas de cabeças e pescoço envolvem a remoção cirúrgica do tumor, a quimioterapia e radioterapia, porém

uma parcela considerável dos pacientes evolui para o óbito devido às complicações da doença em um período menor de cinco anos após o diagnóstico de confirmação do tumor²⁹. O diagnóstico imediato e tratamento intensivo são vitais para uma pessoa com câncer¹.

Na população brasileira não temos nenhum estudo relacionando os polimorfismos SLC23A2-05 e KRAS-LCS6 em portadores de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.

2 - OBJETIVO

Avaliar a prevalência dos polimorfismos Kras-LCS6 e SLC23A2-05 em uma amostra de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço verificando a importância desses polimorfismos no acometimento e na gravidade da doença, através de estudos de associação.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP sob o parecer 873/2007 (Anexo 2).

3.1 Casuística

Trata-se de um estudo de associação, do tipo caso-controle. Este tipo de estudo é eficaz para detecção de fatores de predisposição⁷⁶ embora também determine maior possibilidade de aparecimento de resultados falso-positivos relacionados a escolha incorreta do grupo controle, que deve representar o perfil do grupo caso em questão^{77,78}. O grupo controle foi selecionado de acordo com as variáveis de sexo e idade do grupo caso.

A pesquisa foi realizada com comparação entre o grupo caso e controle, onde inicialmente o grupo caso era composto por 187 indivíduos e o grupo controle por 230 indivíduos.

O grupo caso, composto inicialmente tinha 187 indivíduos, sendo 22 indivíduos do sexo feminino e 165 indivíduos do sexo masculino. Pelo fator de o número de indivíduos do sexo feminino ser pequeno e a literatura relatar que a doença em questão atinge mais indivíduos do sexo masculino do que feminino, 5:2, optou-se por trabalhar apenas com indivíduos do sexo masculino. Foram avaliados, então, os 165 pacientes do sexo masculino, diagnosticados com CEC de cabeça e pescoço atendidos no ambulatório de Oncologia Clínica e de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP com material biológico armazenado no Laboratório de Genética do Câncer.

Esses 165 indivíduos do sexo masculino possuem média de idade de 58,53 e desvio padrão de 9,82, diagnosticados com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, sendo 100 casos de CEC de laringe e 65 de CEC de faringe e laringe, foi analisado também do hábito de fumar e ingerir álcool. 76,97% dos casos foram classificados como tabagistas, 1,81% como não tabagistas e 21,21% como ex-tabagistas.

Com relação ao etilismo, 55,76% foram classificados como etilistas, 13,33% como não etilistas e 30,91% como ex-etilistas. Foram considerados tabagistas aqueles que fumavam até o momento do diagnóstico, ex-tabagista aqueles que pararam de fumar antes do diagnóstico e não tabagista, aqueles que nunca fumaram. Foram considerados etilistas aqueles que faziam uso de bebida alcoólica até o momento do diagnóstico, ex-etilistas aqueles que pararam antes do diagnóstico e não etilista, aqueles que não faziam uso de bebida alcoólica.

O grupo controle, constituído de 230 indivíduos do sexo masculino, saudáveis e sem histórico pessoal de câncer, apresentaram média de idade de 57,12 e desvio padrão de 10,27, também foi avaliado o hábito de fumar e ingerir bebida alcoólica em 100 dos controles. Com relação ao tabagismo 21,61% foram classificados como tabagistas, 36,68% como não tabagistas e 41,71% como ex-tabagistas. Quanto ao hábito de ingerir bebida alcoólica, 9,55% foram classificados como etilistas, 62,81% como não etilistas e 27,64% como ex-etilistas.

Para o grupo controle foram considerados tabagistas aqueles que fumavam até o momento da última consulta, ex-tabagista aqueles que pararam de fumar antes da última consulta e não tabagista aqueles que nunca fumaram. Foram considerados etilistas, aqueles que faziam uso de bebida alcoólica até o momento da última consulta, ex-etilistas aqueles que pararam antes da última consulta e não etilista aqueles que não faziam uso de bebida alcoólica.

Nas a tabela 1, temos a caracterização da amostra com relação a média de idade de ambos os grupos, na tabela 2 encontra-se a caracterização dos indivíduos com relação aos hábitos de fumar e ingerir bebida alcoólica. Os anexos 3 e 4, descrevem o grupo caso e controle avaliados.

Tabela 1: Caracterização da amostra com relação a média de idade.

Grupo	Tamanho amostral	Média	Desvio Padrão
Caso	165	58,53	9,82
Controle	230	57,12	10,27

Tabela 2: Caracterização dos 165 indivíduos do grupo caso e dos 199 do grupo controle com relação ao hábito de fumar e ingerir bebida alcoólica.

		Grupo Caso		Grupo Controle	
	Hábitos	Indivíduos	Porcentagem	Indivíduos	Porcentagem
Tabagismo	Tabagista	127	76,97%	43	21,60%
	Não tabagista	3	1,81%	73	36,68%
	Ex-tabagista	35	21,21%	83	41,70%
Etilismo	Etilista	92	55,76%	19	9,55%
	Não etilista	22	13,33%	125	62,81%
	Ex-etilista	51	30,90%	55	27,64%

Participaram do estudo aqueles indivíduos que aceitaram e assinaram o TCLE.

3.2 Métodos

Após o consentimento dos participantes, foi coletado uma alíquota de sangue periférico em tubo vacunteiner contendo 54µL de EDTA a 15% para impedir a coagulação sanguínea. A amostra foi levada para o laboratório de Genética Molecular onde foi realizada a extração de DNA e posterior análise molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR) e digestão com enzimas de restrição específicas para cada polimorfismo.

3.2.1 Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico

Procedemos à extração de DNA de leucócitos do sangue periférico conforme o método descrito em 1986 por Woodhead et al.⁷⁹, com algumas modificações.

A amostra de sangue obtida foi centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm em temperatura ambiente para a separação do plasma, que foi retirado e descartado. Em seguida, um alíquota de 500µL do sedimento foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5mL. Adicionou-se 1,0mL de tampão de lise celular (Sacarose 320mM, Tris-HCl pH7,5 2mM, MgCl₂ 1mM, Triton 100X 1%). A solução foi homogeneizada no vortex por 15 segundos e centrifugada a 8000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado com cuidado por inversão do tubo e o processo foi repetido novamente. Em seguida foram adicionados 395µL de tampão de digestão (Tris-HCl pH7,5 2mM, EDTA 0,5mM, NaCl 5mM e SDS 20%) e 5µL de proteinase K 20mg/ml. A reação foi homogeneizada e incubada em banho-maria à temperatura de 55°C por 2 horas. Em seguida foram adicionados 200µL de LiCl 7,5M em cada amostra e as soluções foram levadas a temperatura de -20°C por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 13000 rpm para a formação do pellet de proteínas e outros contaminantes, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo eppendorf devidamente identificado e o volume completado com etanol absoluto gelado. O tubo foi agitado por inversão para que o DNA precipitasse e foi levado ao freezer over night. As amostras foram então centrifugadas a 13000 rpm por 8 minutos, o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo e ao precipitado foi adicionado 1mL de etanol 70% e realizada outra centrifugação (13000rpm/5 minutos). O sobrenadante foi novamente desprezado e o DNA obtido foi

deixado em temperatura ambiente para a evaporação do etanol restante e ressuspendido em água estéril. A eficiência da extração foi avaliada em gel de agarose 0,8%.

3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase

As análises dos polimorfismos Kras-LCS6 e SLC23A2-05 foram realizadas pela técnica da PCR. (Reação em Cadeia da Polimerase - do inglês, *Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica descrita por Saiki et al. em 1971⁸⁰, possibilita a amplificação de uma pequena sequência de DNA através do uso de dois iniciadores – *primers* que flanqueiam a região do DNA a ser amplificada, onde se hibridizam devido a complementariedade de bases. A reação é colocada em um aparelho termociclador onde repetidos ciclos de desnaturação térmica do DNA, anelamento dos iniciadores em temperaturas adequadas e a extensão dos iniciadores promovida pela enzima Taq DNA polimerase, levam ao acúmulo exponencial da sequência de DNA alvo. A reação de PCR, os iniciadores e os tamanhos dos fragmentos esperados para cada polimorfismo estão descritos, respectivamente, nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR para os polimorfismos Kras-LCS6 e SLC23A2-05.

Reagentes	Polimorfismo	
	Kras-LCS6	SLC23A2-05
DNA (µL)	1.0	1.0
MgCl ₂ (1.0mM)	4.0	4.0
Tris-HCl pH 8,4 (10.0 mM)	2.0	2.0
dNTP (0.025 mM-cada)	1.0	1.0
<i>primers</i> (0.2 pMoles-cada)	1.0	1.0
Taq polimerase (5 Unidades)	1.5	1.5
Água qsp (µL)	50.0	50.0

Tabela 4: Descrição dos “primers” utilizados na PCR dos polimorfismos, temperatura de anelamento específica para cada reação e tamanho do fragmento esperado.

Polimorfismo		Sequência 5' - 3'	Tamanho do fragmento (pb)
Kras-LCS6	S	GGTGTCTCAGAGTCTCGCTCTT	420
	AS	GGGTCGTATACCAAAGGCCTTAG	
SLC23A2-05	S	AAATGCTCTGGGCAACCTTA	385
	AS	CCCCCAGGACATCGACAA	

S: Sense, AS: Anti-sense

O volume final da PCR ficou estabelecido em 50µl. Após a adição dos reagentes a reação foi levada a um termociclador Eppendorf, onde ocorreu a etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 64,6°C e 64,9°C por 1 minuto para o polimorfismo Kras-LCS e SLC23A2-05, respectivamente e 72°C por 2 minutos, finalizando com 7 minutos de incubação final a 72°C, como descrito na tabela 5.

Tabela 5: Descrição dos ciclos utilizados para cada polimorfismo

	Polimorfismo	
	Kras-LCS6	SLC23A2-05
Programas	94°C / 5 minutos	94°C / 5 minutos
	94°C / 1 minuto	94°C / 1 minuto
	64,6°C / 1 minuto	64,9°C / 1 minuto
	72°C / 2 minutos	72°C / 2 minutos
	72°C / 7 minutos	72°C / 7 minutos
Nº de ciclos	35	35

3.2.3 Digestão Enzimática

Para os polimorfismos Kras-LCS6 e SLC23A2-05, após a PCR, foi realizada a digestão enzimática específica, segundo orientações do fabricante.

As reações de digestão ficaram incubadas por 16 horas e as concentrações das enzimas, temperatura de incubação e tamanhos dos fragmentos esperados para a análise de cada polimorfismo estão na tabela 6.

Tabela 6: Descrição das condições para realização da digestão enzimática.

Polimorfismo	Enzimade Restrição	Temperatura ótima (°C)	Alelo	Tamanho do Fragmento (pb)
Kras-LCS6	<i>Hinf I</i>	37	T	8/80/135/197
			G	8/80/332
SLC23A2	<i>Tai I</i>	37	C	385
			G	128/270

Para a análise do polimorfismo Kras-LCS6, após a PCR, a digestão foi realizada com a enzima *Hinf I*. Essa enzima reconhece um sítio de restrição específico e cliva a PCR em fragmentos de 8, 80, 135 e 197pb para o alelo T e 8, 80 e 332pb para o alelo G. Em indivíduos heterozigotos encontram-se presentes os fragmentos de 8, 80, 135, 197 e 332pb.

A análise do polimorfismo SLC23A2 utilizou digestão com a enzima *Tai I* após a PCR. O fragmento de 385pb produzido pela PCR permanece na ausência do sítio de restrição indicando a presença do alelo G, e é digerido em fragmentos de 128pb e 270pb no caso da presença do alelo G. Sendo o indivíduo heterozigoto observa-se a presença dos três fragmentos: 128, 270 e 385bp.

3.2.4 Análise de dados

As diferenças nas médias das idades entre casos e controles foram avaliadas pelo teste t de *Student* em ambiente R⁸¹. O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para os genótipos foi avaliado pelo programa HAPLOVIEW⁸², onde foi o utilizado $p < 0,01$. Os cálculos de associação genotípica e alélica foram realizados por meio de regressão logística usando a função *logistf* em ambiente R⁸¹. O poder estatístico da amostra em detectar associação entre o fenótipo e os polimorfismos foi estimado utilizando o programa GPOWER⁸³.

4 - RESULTADOS

4.1 Análise dos Polimorfismos

4.1.1 Análise do Polimorfismo Kras-LCS6

Para analisar o polimorfismo Kras-LCS6, após a PCR onde foi encontrado um fragmento de 420pb, foi realizada a digestão enzimática com a enzima *Hinf I*, onde observou-se os alelos.

Na figura 7, observa-se na coluna 1 o PCR referente ao polimorfismo, com um fragmento de 420pb. Na coluna 2 temos um marcador de peso molecular de 100pb, seguidos pela coluna 3 e 4 onde observa-se a digestão enzimática com fragmentos de 80,135, 197pb, mostrando indivíduos homozigotos TT. Na coluna 5, encontra-se a digestão enzimática com fragmentos de 80 e 332pb, indicando um indivíduo heterozigoto TG e na coluna 6, a digestão enzimática com fragmentos de 80,135, 197 e 332pb, indicando um indivíduo homozigoto GG.

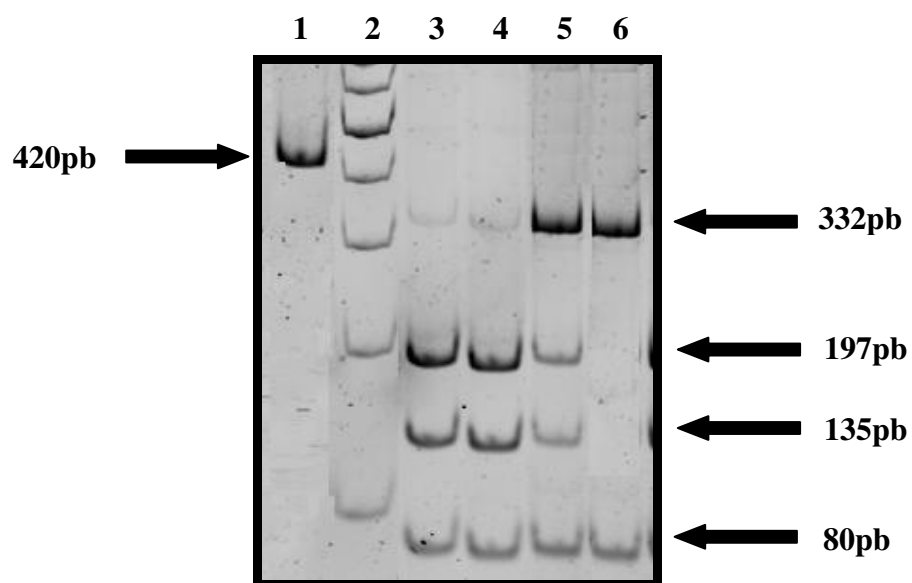


Figura 7: Produto resultante da PCR e digestão enzimática do polimorfismo Kras-LCS6 em gel de poliacrilamida 12%. Na coluna 1 encontra-se a PCR com fragmento de 420pb, na coluna 2 encontra-se o marcador de peso molecular de 100pb, as colunas 3 e 4 representam a digestão enzimática de indivíduos homozigotos TT, na coluna 5 encontra-se um indivíduo heterozigoto TG e na coluna 6 um indivíduos homozigoto GG.

Na análise do polimorfismo Kras-LCS6 foram encontrados no grupo caso 135 indivíduos com genótipo TT, equivalendo a 81,81% da amostra, 29 indivíduos com genótipo TG, 17,57% da amostra e 1 indivíduo com genótipo GG equivalente a 0,61% da amostra. No grupo controle foram encontrados 187 indivíduos com genótipo TT correspondente a 81,30% da amostra, 41 indivíduos com genótipo TG, 17,839% da amostra e 2 indivíduos com genótipo GG, equivalente a 0,87% da amostra (Tabela 7). Na amostra do grupo caso a frequência do alelo T foi de 0,91 e do alelo G 0,09 e na amostra do grupo controle a frequência do alelo T foi de 0,90 e do alelo G 0,10.

Esse polimorfismo encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto na grupo caso como no grupo controle ($p=0,9899$, $p=0,9999$ respectivamente). Para o equilíbrio de Hardy-Weinberg considerou-se em equilíbrio $P>0,01$.

Tabela 7: Genótipo e frequência genotípica encontrada no polimorfismo Kras-LCS6 entre 165 indivíduos do grupo casos e 230 indivíduos do grupo controle.

		Frequência	
		Genótipos	Indivíduos
		Genotípica	
GRUPO CASO	TT	135	81,81%
	TG	29	17,57%
	GG	1	0,61%
	Total	165	100%
GRUPO CONTROLE	TT	187	81,30%
	TG	41	17,83%
	GG	2	0,87%
	Total	230	100%

4.1.2 Análise do Polimorfismo SLC23A2-05

Para analisar o polimorfismo SLC23A2-05, após a PCR onde foi encontrado um fragmento de 385pb, foi realizada a digestão enzimática com a enzima *Tai I*, onde observou-se os alelos.

Na figura 8, observa-se na coluna 1 o PCR referente ao polimorfismo, com um fragmento de 385pb. Na coluna 2 temos um marcador de peso molecular de 100pb, seguidos pela coluna 3 e 4 onde observa-se a digestão enzimática com fragmento de 385pb,

mostrando indivíduos homozigotos CC. Na coluna 5, encontra-se a digestão enzimática com fragmentos de 128, 280 e 385pb, indicando um indivíduo heterozigoto CG e na coluna 6, a digestão enzimática com fragmentos de 128 e 280pb, indicando um indivíduo homozigoto GG.

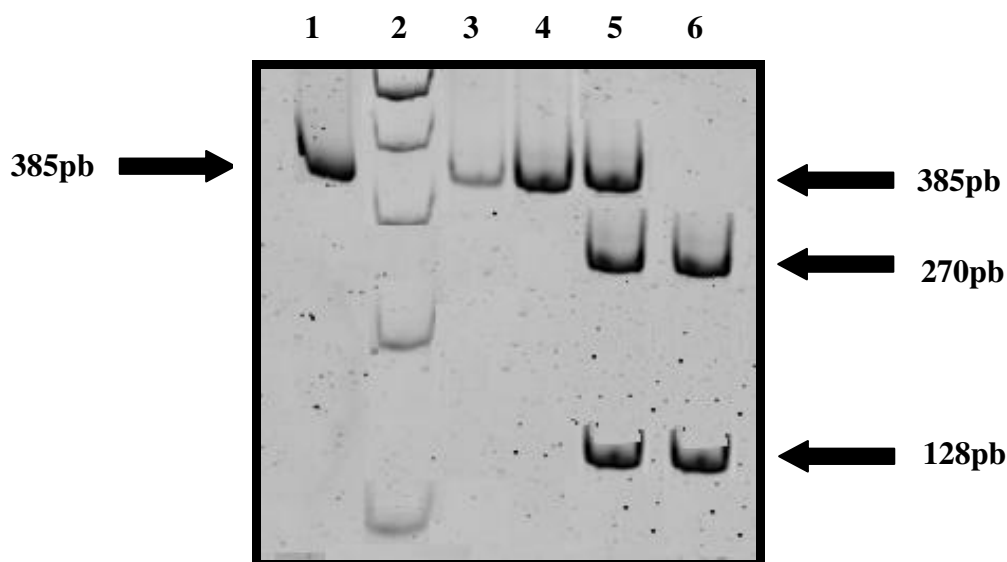


Figura 8: Produto resultante da PCR e digestão enzimática do polimorfismo SLC23A2-05 em gel de poliacrilamida 12%. Na coluna 1 encontra-se a PCR com fragmento de 385pb, na coluna 2 encontra-se o marcador de peso molecular de 100pb, as colunas 3 e 4 representam a digestão enzimática de indivíduos homozigotos CC, na coluna 5 encontra-se um indivíduo heterozigoto CG e na coluna 6 um indivíduos homozigoto GG.

Para o polimorfismo SLC23A2-05 foram encontrados no grupo caso 35 indivíduos com genótipo CC equivalente a 21,21% da amostra, 84 indivíduos com genótipo CG, 50,90% da amostra e 46 indivíduos com genótipo GG, correspondente a 27,88% da amostra e no grupo controle 43 indivíduos com genótipo CC, 18,69% da amostra, 132 indivíduos com genótipo CG, 57,39% da amostra e 55 indivíduos com genótipo GG, equivalente a 23,91% da amostra (tabela 8). Na amostra do grupo caso e do grupo controle a frequência do alelo C foi de 0,47 e do alelo G 0,53. Este polimorfismo encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto no grupo caso quanto grupo controle ($p=0,9232$, $p=0,0332$ respectivamente). Para o equilíbrio de Hardy-Weinberg considerou-se em equilíbrio $P>0,01$.

Tabela 8: Genótipo e frequência genotípica encontrada no polimorfismo SLC23A2-05 entre 165 indivíduos do grupo caso e 230 indivíduos do grupo controle.

			Frequência	
		Genótipos	Indivíduos	Genotípica
GRUPO CASO		CC	35	21,21%
		CG	84	50,90%
		GG	46	27,88%
			165	100%
GRUPO CONTROLE		CC	43	18,69%
		CG	132	57,39%
		GG	55	23,91%
			230	100%

As tabelas 9, 10 e 11 mostram respectivamente os resultados da regressão logística dos genótipos e alelos para os 165 casos de paciente com câncer de cabeça e pescoço, dos genótipos e alelos para 100 casos de pacientes com câncer de laringe e dos genótipos e alelos para 65 casos de pacientes com câncer de faringe e cavidade oral. Nenhuma correlação foi encontrada.

Tabela 9: Resultados da análise de regressão logística para os 165 indivíduos do grupo caso diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço.

Gene		β	p	OR	IC 95% Min.	IC 95% Max.
KRAS	Genótipo	GG	-0,1822	0,8597	0,83	0,08
		TG	-0,0132	0,9603	0,99	0,58
		TT	0,0302	0,9080	1,03	0,62
	Alelo	G	-0,0302	0,9080	0,97	0,58
		T	0,1822	0,8597	1,20	0,11
SLC23A2	Genótipo	CC	0,1592	0,5304	1,17	0,71
		CG	-0,2604	0,2026	0,77	0,52
		GG	0,2074	0,3711	1,23	0,78
	Alelo	C	-0,2074	0,3711	0,81	0,52
		G	-0,1592	0,5304	0,85	0,52

Notas: β = coeficiente de regressão; OR = *odds ratio*; IC = intervalo de confiança; Min. = mínimo; Max. = máximo.

Tabela 10: Resultados da análise da regressão logística dos genótipos e alelos para 100 indivíduos do grupo caso diagnosticados com câncer de laringe.

Gene			β	p	OR	IC 95% Min.	IC 95% Max.
KRAS	Genótipo	GG	-0,7881	0,5822	0,45	0,01	18,88
		TG	-0,1147	0,7178	0,89	0,47	1,67
		TT	0,1724	0,5840	1,19	0,63	2,22
	Alelo	G	-0,1724	0,5840	0,84	0,45	1,58
		T	0,7881	0,5822	2,20	0,05	91,31
SLC23A2	Genótipo	CC	-0,1724	0,5840	0,84	0,45	1,58
		CG	-0,0578	0,8103	0,94	0,59	1,51
		GG	0,2176	0,4220	1,24	0,73	2,11
	Alelo	C	-0,2176	0,4220	0,80	0,47	1,37
		G	0,1724	0,5840	1,19	0,63	2,22

Notas: β = coeficiente de regressão; OR = *odds ratio*; IC = intervalo de confiança; Min. = mínimo; Max. = máximo.

Tabela 11: Resultados da análise de regressão logística dos genótipos e alelos para 65 indivíduos do grupo casos diagnosticados com câncer de faringe e cavidade oral.

Gene			β	p	OR	IC 95% Min.	IC 95% Max.
KRAS	Genótipo	GG	0,7540	0,4868	2,13	0,20	22,37
		TG	0,1606	0,6492	1,17	0,59	2,34
		TT	-0,1936	0,5746	0,82	0,42	1,62
	Alelo	G	0,1936	0,5746	1,21	0,62	2,38
		T	-0,7540	0,4868	0,47	0,04	4,95
SLC23A2	Genótipo	CC	0,5920	0,0679	1,81	0,97	3,38
		CG	-0,5710	0,0417	0,56	0,32	0,98
		GG	0,2083	0,5111	1,23	0,66	2,29
	Alelo	C	-0,2083	0,5111	0,81	0,44	1,51
		G	-0,5920	0,0679	0,55	0,30	1,04

Notas: β = coeficiente de regressão; OR = *odds ratio*; IC = intervalo de confiança; Min. = mínimo; Max. = máximo.

Com relação a associação com o estadiamento, os resultados encontram-se sumarizados na tabela 12.

Tabela 12: Correlação entre o estadiamento e os polimorfismos Kras-LCS6 e SLC23A2-05 nos 165 indivíduos do grupo caso diagnosticados com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.

Gene			Estádio I		Estádio II		Estádio III		Estádio IV	
			P	OR (IC)	p	OR (IC)	P	OR (IC)	p	OR (IC)
KRAS	Genótipo	GG	0,7263	1,79 (0,04 – 75,55)	0,5613	2,77 (0,06 – 118,05)	0,9512	1,10 (0,03 – 46,06)	0,6419	1,64 (0,16 – 17,23)
		TG	0,2017	1,85 (0,74 – 4,65)	0,4044	1,64 (0,53 – 5,13)	0,2259	0,55 (0,19 – 1,56)	0,9559	1,02 (0,53 – 1,95)
		TT	0,2445	0,57 (0,23 – 1,43)	0,4586	0,64 (0,21 – 2,01)	0,1810	1,93 (0,68 – 5,48)	0,9073	0,96 (0,51 – 1,82)
	Alelo	G	0,2445	1,75 (0,70 – 4,37)	0,4586	1,55 (0,50 – 4,83)	0,1810	0,52 (0,18 – 1,47)	0,9073	1,04 (0,55 – 1,96)
		T	0,7263	0,56 (0,01 – 23,52)	0,5613	0,36 (0,01 – 15,39)	0,9512	0,91 (0,02 – 37,98)	0,6419	0,61 (0,06 – 6,39)
SLC23A2	Genótipo	CC	0,0627	0,26 (0,05 – 1,44)	0,8598	1,12 (0,33 – 3,83)	0,3675	1,44 (0,66 – 3,13)	0,2147	1,46 (0,81 – 2,64)
		CG	0,5475	1,29 (0,56 – 3,00)	0,9055	0,94 (0,35 – 2,55)	0,6492	0,86 (0,44 – 1,66)	0,0566	0,62 (0,37 – 1,02)
		GG	0,3456	1,54 (0,64 – 3,70)	0,8220	1,14 (0,37 – 3,51)	0,8431	0,92 (0,42 – 2,03)	0,2859	1,36 (0,78 – 2,36)
	Alelo	C	0,3456	0,65 (0,27 – 1,57)	0,8220	0,88 (0,28 – 2,71)	0,8431	1,08 (0,49 – 2,38)	0,2859	0,74 (0,42 – 1,29)
		G	0,0627	3,79 (0,69 – 20,73)	0,8598	0,89 (0,26 – 3,07)	0,3675	0,70 (0,32 – 1,52)	0,2147	0,69 (0,38 – 1,24)

Notas: OR = *odds ratio*; IC = intervalo de confiança.

Não foram encontradas associações entre os polimorfismos SLC23A2 e Kras-LCS6 e Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço. Pode-se afirmar tal fato com um poder estatístico de 86,6%.

5 – DISCUSSÃO

Com relação ao polimorfismo Kras-LCS6 do gene Kras, em nosso estudo encontramos a frequência gênica de 0,91 e 0,09 dos alelos T e G na amostra do grupo caso e 0,90 e 0,10 na amostra do grupo controle. Tanto grupo caso quanto no grupo controle, as amostras estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Grupo caso $p=0,9899$, Grupo controle $p=0,9999$).

Foi levantada a hipótese de que a ativação da via KRAS pode ocorrer em carcinomas espinocelulares através de uma ação da variante normal do polimorfismo Kras-LCS6 e, assim, estar associado com a susceptibilidade e com a evolução do paciente⁴⁶. Os resultados desse estudo mostraram não existir uma associação com o risco geral de CCECP (HNSCC), mas os casos com o alelo G mostraram uma significativa redução na sobrevida [hazard ratio (HR), 1,6; intervalo de confiança de 95% (CI), 1,0-2,5]. Esse risco foi maior nos casos de carcinoma de cavidade oral (HR, 2,7, 95% CI, 1,4-5,3). Portanto, o alelo G poderia alterar o fenótipo da doença⁴⁶.

Não foi possível comparar as frequências alélicas encontradas por Christensen em 2009, uma vez que nesse estudo, único de avaliação desse polimorfismo em câncer de cabeça e pescoço, foi avaliado tecido tumoral.

Em nosso estudo o alelo G ocorreu em baixa frequência e similar a encontrada no grupo controle sugerindo que em nossa população parece que esse alelo não levaria a uma maior susceptibilidade a doença. Por outro lado, na associação com o estadiamento da doença, nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada, indicando não ter importância também na evolução da doença. No entanto, devemos ressaltar que a análise desse polimorfismo ocorreu em tecido normal dos pacientes acometidos pelo tumor. Não podemos afastar a hipótese de que esse polimorfismo poderia ter alguma importância na evolução tumoral. Para isso seria necessário avaliar esse polimorfismo no tecido tumoral.

Com relação ao polimorfismo SLC23A2-05, no presente estudo, a frequência gênica dos alelos C e G foram de 0,47 e 0,53, respectivamente, tanto no grupo caso quanto no grupo controle. Em estudos anteriores envolvendo esse polimorfismo, os alelos C e G tiveram em uma população afro-americana a frequência de 0,80 e 0,20 respectivamente, no entanto, em população caucasóide as frequências encontradas foram de 0,42 e 0,58⁸⁴. Em estudo realizado por Chen AA et al em 2009⁶⁵, as frequências encontradas em pacientes com câncer foi de 0,59 para o alelo G e 0,41 para o alelo C e no grupo controle 0,57 e 0,43, sendo que nos dois grupos havia um predomínio de indivíduos caucasóides (92 e 93%).

Nossos dados se aproximam das frequências encontradas em populações caucasóides, haja vista um predomínio em nossa amostra de indivíduos de cor de pele branca.

Em estudo desenvolvido por Meyer MS et al em 2008⁶⁶, foi investigado se a associação entre o consumo de frutas e o risco de HNSCC foi modificado pela exposição ao HPV-16, uma vez que o HPV 16 é um fator de risco para CCECP bem descrito⁸⁵. Foram estudados 270 pacientes e 493 controles com informação sobre o consumo de frutas e o status dos anticorpos HPV16. Os indivíduos soro negativos tinham um significativo baixo risco de CCECP com o aumento de consumo de frutas [odds ratio (OR 0.60; 95% intervalo de confiança (95% CI), 0.38-0.95; OR 0.57; 95% CI, 0.35-0.95] e especificamente com o aumento do consumo de frutas cítricas (OR 0.61; 95% CI, 0.39-0.97; OR 0.59; 95% CI, 0.37-0.96). Entretanto, entre os indivíduos soro positivos, o risco aumentou com o consumo de frutas (OR 2.27; 95% CI, 0.92-5.58; OR, 1.40; 95% CI, 0.55-3.59) e consumo de frutas cítricas (OR 3.35; 95% CI, 1.36, 8.24; OR 3.15; 95% CI, 1.23-8.08). Esta interação foi estatisticamente significativa ($P < 0.05$), mostrando que o consumo de frutas seria associado com uma redução do risco de HNSCC entre indivíduos soro negativos HPV16, mas aumentado em indivíduos soro positivos HPV16. Frente a esse estudo Chen AA et al em 2009⁶⁵, avaliou 319 pacientes com HNSCC e 495 indivíduos controles frente as variáveis sorologia de HPV16, consumo de citrus e SNPs do painel SNP500Cancer. Identificaram um polimorfismo no gene de SLC23A2 (SLC23A2-05) que modifica o risco de HNSCC quando associado a infecção por HPV16. Entre aqueles com um alelo de tipo selvagem (G) em SLC23A2, o risco do câncer associado com sorologia positiva HPV16 foi de 5,0 (intervalo de confiança de 95% (IC) = 3,2-7,8). No entanto, entre aqueles com genótipo homozigoto variante (CC), o risco de câncer associado HPV16 foi atenuada [odds ratio (OR) = 2,8 IC95% = 1,2-6,2]. Além disso, quando testaram se o genótipo modifica a interação entre consumo de citrus, HPV16, e câncer, encontraram um risco significativamente aumentado de câncer nos indivíduos que possuíam um alelo SLC23A2-5 do tipo selvagem (G), HPV16 sorologia positiva e alto consumo de citros (OR = 7,4; IC 95% = 3,6-15,1). Portanto, para iniciar o estudo desse polimorfismo em nossos pacientes, verificamos se haveria uma associação entre o câncer e os genótipos do polimorfismos SLC32A2-05, mas não encontramos nenhuma associação.

Com relação ao estadiamento da doença (I a IV), nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada com os genótipos do polimorfismo SLC32A2-05, demonstrando que provavelmente esses polimorfismos não seriam moduladores de

gravidade da doença. Para esse polimorfismo, da mesma forma que no polimorfismo Kras-LCS6, temos que fazer a ressalva de que analisamos tecido normal.

6 – CONCLUSÃO

Concluimos com esse estudo que a frequência dos alelos T e G encontradas no polimorfismo Kras-LCS6 foram de aproximadamente 0,90 e 0,10 e que em nossa amostra, esse polimorfismo não está associado com o câncer de cabeça e pescoço.

Com relação ao polimorfismo SLC23A2-05 a frequência dos alelos C e G em nossa amostra foram de 0,47 e 0,53, respectivamente. Em nossa amostra, os genótipos do polimorfismo SLC23A2-05 não estão associados com o câncer de cabeça e pescoço.

Os polimorfismos Kras-LCS6 e SLC23A2-05 parecem não serem moduladores de gravidade do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nussbaum RI, McInnes RR, Willard HF. Genômica e Genética do Câncer. Nussbaum RI, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson. Genética Médica. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda. 2008; 389-416.
2. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Ministério da Saúde, Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br> - acessado em 26 de março de 2011.
3. Dedevits RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Clinic and epidemiologic characteristics in the with squamous cell carcinoma of the mouth and oropharynx. Rev Bras Otorrinolaringol. 2004; 70(1): 35-40.
4. Mendhall WM, Riggs Jr CE, Cassini NJ. Cancer of the head and neck: treatment of head and neck cancers. In: Devita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer Principles & Practice of Oncology. 7ª ed. Lippincott Williams & Wilks. 2005.
5. Walker DM, Boye G, McDonald L. The pathology of oral cancer. Pathology. 2003; 35: 376-383.
6. Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. Genética Médica. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.
7. Júnior JR. Oncogenese. Oncologia Clínica. 2ª ed. São Paulo: Sarvier Editora de livros médicos. 1984; 3-21.
8. Rocha JCC, Silva SN. Oncogenética. In: Coelho FRG, Kowalski LP. Bases da Oncologia. 2. ed. São Paulo:TECMEDD. 2003; 423-432.
9. Garnis C, Buys TPH, Lam WL. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. Mol cancer. 2004; 3(9): 3-9.
10. Holland JF, Frei E, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RCJ et al. Cancer Medicine. 6º ed. Hamilton, Ontario: BC Decker Inc. 2003.
11. Sidransky D. Molecular Biology of Head and Neck Tumors. In: De Vita JVT, Hellman S, Rosenberg AS. Cancer: Principles & Practice of Oncology. 7ª ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2005; 653-662.
12. Bernardi D, Barzan L, Franchin G, Cinelli R, Balestreri L, Tirelli U. Treatment of head and neck cancer in elderly patients: state of the art and guidelines. Crit Rev Oncol Hematol. 2005; 53 (1): 71-80.
13. Mehrota R, Singh M, Kumar D, Pandey AN, Gupta RK, Sinha US. Age specific incidence rate and pathological spectrum of oral cancer in Allahabad. Indian J Med Sci. 2003; 57 (9): 400-4.

14. Brennan P, Lewis S, Hashibe M, Bell DA, Boffetta P, Bouchardy C et al. Pooled analysis of alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: a huGE review. *Am J Epidemiol.* 2004; 159 (1): 1-16.
15. Maluf FC, Guimarães JLM, Rosa DD. Tumores da Cavidade Oral. Guimarães JLM, Rosa DD. *Rotinas em Oncologia. Artmed.* 2008; 133-140.
16. Mori S, Nose M, Morikawa H, Sato A, Saito T, Song ST et al. A novel evaluation system of metastatic potencial of oral squamous cell carcinoma according to the histopathological and histochemical grading. *Oral Oncol.* 1998; 34 (6): 549-57.
17. Costa LLA, Júnior FAR, Ramos CFC. Correlação entre a classificação clínica TNM e as características histológicas de malignidade do carcinoma epidermóide oral. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2005; 71(2): 181-7.
18. Lang K, Menzin J, Earle CC, Jacobson JMA, Hsu MA. The economic cost of squamous cell cancer of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 130 (11): 1269-1275.
19. Yukako I, Nobukazu F, Minoru K, Takeshi K, Kazuhisa F, Hiroyuki T, et al. Treatment results of stage I oral tongue cancer with definitive radiotherapy. *Oral Oncol.* 2005; 41 (5): 520-525.
20. Neville BD, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial.* Ed. Guanabara Koogan S.A. 1998.
21. O'Sullivan EM. Oral and pharyngeal cancer in Ireland. *Ir Med J.* 2005; 98 (4): 102-105.
22. Wunsch FV. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol.* 2002; 38: 737-746.
23. Hashibe M, Boffetta P, Zridze D, Shangina O, Dabrowska NS, Mates D et al. Contribution of tobacco and alcohol to the high rates of squamous cell carcinoma of the supraglottis and glottis in central Europe. *Am J Epidemiol.* 2007; 165: 814-820.
24. Golas SM. Trends in palatine tonsillar cancer incidence and mortality rates in the United States. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007; 35: 98-108.
25. Abbas A, Delvinquiére K, Lechevrel M, Lebailey P, Gauduchon P, Launoy G et al. *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *CYP1A1* genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a french population: different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2004; 10 (23): 3389-3393.
26. Durazzo MD, Araújo CEN, Brandão Neto JS, Potenza AS, Costa P, Takeda F et al. Clinical and epidemiological features of oral câncer in a medical school teaching hospital

from 1994 to 2002: incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastase. *Clinics*. 2005; 60 (4): 293-298.

27. Ray A. Cancer preventive role of selected dietary factors. *Indian J Cancer*. 2005; 42 (1): 15-24.

28. Lin DT, Cohen SM, Coppit GL, Burkey BB. Squamous cell carcinoma of the oropharynx and hypopharynx. *Otolaryngol Clin N Am*. 2005; 38: 59-74.

29. Lima CSP, Costa FF, Lourença GJ, Khater L, Chone CT, Crespo AN. Identificação de Genes de Susceptibilidade para o Carcinoma de Células Escamosas de Orofaringe. Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, 2007.

30. Furniss CS, McClean MD, Smith JF, Bryan J, Nelson HH, Peters ES et.al. Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*. 2007; 120: 2386–2392.

31. Vecchia CL, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology of Oral Cancer. *Oral Oncol*. 1997; 33 (5): 302-312.

32. Maserejian NN, Giovannucci E, Rosner B, Joshipura K. Prospective study of vitamins C, E and A and carotenoids and risk of oral premalignant lesions in men. *Int J Cancer*. 2006; 120: 970-977.

33. Marsit CJ, Marsit CJ, Black CC, Posner MR, Kelsey KT. A genotype-phenotype examination of cyclin D1 on risk and outcome of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Cancer Res*. 2008; 14: 2371–2377.

34. Hopkins J, Cescon DW, Tse D, Bradbury P, Xu W, Ma C et al. Genetic polymorphisms and head and neck cancer outcomes: a review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2008; 17: 490–499.

35. Becher H, Flesh-Janys D, Kauppinen T, Kogevinas M, Steindorf K, Manz A. Cancer mortality in German ale workers exposed to phenoxy herbicides and dioxins. *Cancer Cause Control*. 1996; 7: 312-21.

36. Dedivitis RA, Guimarães AV, Souza Jr. JAL. Manual de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Frôntis Editorial, São Paulo. 1999; 64.

37. Curioni OA. Polimorfismos genéticos no câncer de cabeça e pescoço: análise de risco e evolução clínica. [Tese – Doutorado]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2008.

38. Kowalski M, Przybyłowska K, Rusin P, Olszewski J, Morawiec-Sztandera A, Bielecka-Kowalska A et al. Genetic polymorphisms in DNA base excision repair gene

- XRCC1* and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009; 28(1): 37.
39. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol.*2001; 19:1207-1225.
 40. Ferrara N. VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 795-803.
 41. Lim SC. Expression of c-erbB receptors, MMPs and VEGF in head and neck squamous cell carcinoma. *Biomed Pharmacot.* 2009; 59:S366-S369.
 42. Mohammadi M, Ollier WE, Hutchinson IV. A functional association study of VEGF gene promoter polymorphisms with VEGF expression by stimulated pbm cells. *Hum Immunol.* 2003; 64: S125.
 43. Andrade VCC, Parise Jr. O, Hors CP, Martins PCM, Ferreira ECC, Silva A.P et al. The Arg388 FGFR4 polymorphism impact in head and neck cancer prognostic. *Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço.* 2004; 33(2): 55-61.
 44. Lopez GJS, Cristerna SJ, Vazquez MME, Jimenez OG, Aguilar CD. Localization and level of expression of B-catenin in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Otorrhinolaryngology-head and neck surgery.* 2004; 130(1): 89-93.
 45. Wang L, Liu T, Wang Y, Cao L, Nishioka M, Aguiere RL et al. Altered expression of desmocollin 3, desmoglein 3 and B-catenin oral squamous cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and cell proliferation. *Virchows Archiv.*2007; 451(5): 959-966.
 46. Christensen BC, Moyer BJ, Avissar M, Ouellet LG, Plaza SL, McClean MD et al. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Oxford Journals – Carcinogenesis.* 2009; 30(6): 1003-1007.
 47. Chang EH, Gonda MA, Ellis RW, Scolnick EM, Lowy D.R. Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc. Nat. Acad. Sci.*1982; 79: 4848-4852.
 48. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> - Acessado em 27 de maio 2011.
 49. McGrath JP, Capon DJ, Smith DH, Chen EY, Seeburg PH, Goeddel DV et al. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature.*1983; 304: 501-506.

50. Carta C, Pantaleoni F, Bocchinfuso G, Stella L, Vasta I, Sarkozy A et al. Germline missense mutations affecting KRAS isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *Am J Hum Genet.* 2006; 79: 129-135.
51. O'Connell P, Leppert M, Hoff M, Kumlin E, Thomas W, Cai G et al. A linkage map for human chromosome 12. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 1985; 37:169.
52. O'Brien SJ, Nash WG, Goodwin JL, Lowry DR, Chang EH. Dispersion of the ras family of transforming genes to four different chromosomes in man. *Nature.* 1983; 302: 839-842.
53. NCBI – National Center of Biotechnology Information. Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/KRAS.jpeg> - Acessado em 25 de Maio de 2011.
54. NCBI – National Center of Biotechnology Information. Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=KRAS> – Acessado em 25 de Maio de 2011.
55. Kranenburg, O. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005; 1756: 81-82.
56. Disponível em <http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic?action=bygene&ln=KRAS&start=1&end=189&coords=AA:AA> – Acessado em 28 de Maio de 2011.
57. NCBI – National Center of Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1186/figure/cfc.F2/?report=objectonly> – Acessado em 25 de Maio de 2011.
58. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005; 120(5): 635–647.
59. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116: 281–297.
60. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2006; 6(4): 259–269.
61. Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I et al. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res.* 2008; 68(20): 8535–8540.
62. Rodenhuis S, Slebos RJ. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res.* 1992; 52: 2665s–2669s

63. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006; 9(3):189–198.
64. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Disponível em <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/KRASID91.html> - Acessado em 28 de Maio de 2011.
65. Chen AA, Marsit CJ, Christensen BC, Houseman EA, McClean MD, Smith JF et al. Genetic variation in the vitamin C transporter, SLC23A2, modifies the risk of HPV16-associated head and neck cancer. *Oxford Journals – Carcinogenesis*. 2009; 30(6): 977-981.
66. Meyer MS, Applebaum KM, Furniss CS, Peters ES, Luckett BG, Smith JF et.al. Human papillomavirus-16 modifies the association between fruit consumption and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2008; 17(12): 3419–3426.
67. Faaland CA, Race JE, Ricken G, Warner FJ, Williams WJ, Holtzman EJ. Molecular characterization of two novel transporters from human and mouse kidney and from LLC-PK1 cells reveals a novel conserved family that is homologous to bacterial and *Aspergillus* nucleobase transporters. *Biochim. Biophys. Acta*. 1998; 1442: 353-360.
68. Ensembl Genome Browser. Disponível em http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Variation_Gene/Table?g=ENSG00000089057;r=20:4833002-4990939#ALL – Acessado em 24 de Maio de 2011
69. Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B, Berger UV, Chen XZ, Wang Y et.al. A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*. 1999; 399(6731): 70–75.
70. Boyer JC, Campbell CE, Sigurdson WJ, Kuo SM. Polarized localization of vitamin C transporters, SVCT1 and SVCT2, in epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2005; 334(1): 150–156.
71. Qiao H, Bell J, Juliao S, Li L, May JM. Ascorbic acid uptake and regulation of type I collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Vasc. Res*. 2009; 46: 15–24.
72. Biondi C, Pavan B, Dalpiaz A, Medici S, Lunghi L, Vesce F. Expression and characterization of vitamin C transporter in the human trophoblast cell line HTR-8/SVneo: effect of steroids, flavonoids and NSAIDs. *Mol. Hum. Reprod*. 2007; 13(1): 77–83.

73. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol.* 2004; 78(21): 11451–11460.
74. Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, Romanitan M, Dahlgren LO, Joneberg J et al. Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int. J. Cancer.* 2006; 119(11): 2620–2623.
75. Lab of Bioinformatics. Disponível em <http://genome.ewha.ac.kr/cgi-bin/ECquery.py?query=H20C846&organism=human&confidence=B> – Acessado em 20 de Maio de 2011.
76. Strachan T, Read AP. Mapeamento genético de caracteres complexos. In: Strachan T, Read AP. *Genética Molecular Humana*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora. 2002b; 283-294.
77. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science.* 1994; 256: 2037-2048.
78. Anderson E, Berkovik S, Dulac O, Gardiner M, Jain S, Laue-Friis et al. ILAE genetics commission conference report: molecular analysis of complex genetic epilepsies. *Epilepsia.* 2002; 43(10); 1262-1267.
79. Woodhead NE, Long WF, Williamson FB. Binding of zinc ions to heparin. Analysis by equilibrium dialysis suggests the occurrence of two, entropy-driven, processes. *Biochem J.* 1986; 237: 281-284.
80. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higushi R, Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239:487-491.
81. R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. 2.12.2 ed. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2011.
82. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005 Jan 15;21(2):263-5.
83. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods.* 2007 May;39(2):175-91.
84. Erichsen HC, Engel SA, Eck PK, Welch R, Yeager M, Levine M et al. Genetic variation in the sodium-dependent vitamin C transporters, SLC23A1, and SLC23A2 and risk for preterm delivery. *Am J Epidemiol.* 2006 Feb 1;163(3):245-254.
85. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus

types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:467 – 475.

8.1 Anexo 1: Estágio do Sistema TNM

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer da cavidade oral para a categoria T

Categorias	Descrições
Categoria T	Tumor
Tx	Informações insuficientes para a avaliação do tumor primário
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor se estende 2 cm ou menos na sua maior dimensão
T2	Tumor se estende mais que 2 cm, mas não mais que 4 cm na sua maior dimensão
T3	Tumor ultrapassa 4 cm em sua maior dimensão
T4a (lábio)	Tumor que invade estruturas adjacentes, como: cortical óssea, nervo alveolar inferior, soalho de boca, ou pele da face, como queixo ou nariz
T4a (cav oral)	Tumor que invade estruturas adjacentes, como cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seio maxilar e/ou pele da face
T4b (lábio e cav oral)	Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigóides, ou base do crânio e/ou envolve artéria carótida interna

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer da cavidade oral para as categorias N e M

Categoria N	Linfonodos Regionais
N _x	Informações insuficientes para a avaliação de linfonodos regionais
N ₀	Linfonodos sem metástases
N ₁	Metástase em um único linfonodo homolateral de 3 cm ou menos na sua maior dimensão
N ₂	Metástase em um único linfonodo homolateral de mais de 3 cm mas não mais de 6 cm na sua maior dimensão ou em múltiplos linfonodos homolaterais com não mais que 6 cm na sua maior dimensão ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais que 6 cm em sua maior dimensão
N _{2a}	Metástase em um único linfonodo homolateral com mais que 3 cm mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão
N _{2b}	Metástase em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão
N _{2c}	Metástases em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão
N ₃	Metástase em linfonodo com mais que 6 cm na sua maior dimensão
Categoria M	Metástase à distância
M _x	Informações insuficientes para a avaliação de metástases distantes
M ₀	Sem metástases distantes
M ₁	Metástases à distância

Grupos de estadiamento e características TNM do câncer da cavidade oral

Estádio	Código
Estádio 0	T _{is} , N0, M0
Estádio I	T1, N0, M0
Estádio II	T2, N0, M0
Estádio III	T3, N0, M0
	T1, N1, M0
	T2, N1, M0
	T3, N1, M0
	T4a, N0, M0
	T4a, N1, M0
Estádio IVA	T1, N2, M0
	T2, N2, M0
	T3, N2, M0
	T4a, N2, M0
	Qualquer T, N3, M0
Estádio IVB	T4a, qualquer N, M0
	Qualquer T, qualquer N, M1
Estádio IVC	

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer da orofaringe para a categoria T

Categoria T	Tumor
Tx	Informações insuficientes para a avaliação do tumor primário
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
<i>Tis</i>	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor com não mais de 2 cm na sua maior dimensão
T2	Tumor maior que 2cm e com não mais que 4 cm na sua maior dimensão
T3	Tumor maior que 4 cm na sua maior dimensão
T4a	Tumor que invade qualquer das seguintes estruturas: a laringe, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), pterigóide medial, palato duro e mandíbula
T4b	Tumor invadindo músculo pterigóide lateral, lâminas pterigóideas, nasofaringe lateral, ou base do crânio ou adjacentes a artéria carótida

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer da orofaringe para as categorias N e M

Categoria N	Linfonodos regionais
N _x	Informações insuficientes para a avaliação de linfonodos regionais
N ₀	Linfonodos sem metástases
N ₁	Metástase em um único linfonodo homolateral de 3 cm ou menos na sua maior dimensão
N ₂	Metástase em um único linfonodo homolateral de mais que 3 cm, mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão, ou em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles maior que 6 cm em sua maior dimensão
N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral maior que 3 cm mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão
N2b	Metástase em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm em sua maior dimensão
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão
N3	Metástase em um linfonodo maior que 6 cm na sua maior dimensão
Categoria M	Metástase à distância
M _x	Informações insuficientes para a avaliação de metástases distantes
M0	Sem metástases distantes
M1	Metástases à distância

Grupos de estadiamento e características TNM do câncer da orofaringe e hipofaringe

Estádio	Código
Estádio 0	T _{is} , N0, M0
Estádio I	T1, N0, M0
	T2, N0, M0
Estádio II	T3, N0, M0
Estádio III	T1, N1, M0
	T2, N1, M0
	T3, N1, M0
Estádio IVA	T4a, N0, M0
	T4a, N1, M0
	T1, N2, M0
	T2, N2, M0
	T3, N2, M0
	T4a, N2, M0
Estádio IVB	T4b, qualquer N, M0
	Qualquer T, N3, M0
Estádio IVC	Qualquer T, qualquer N, M1

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer da hipofaringe para a categoria T

Categoria T	Tumor
Tx	Informações insuficientes para a avaliação do tumor primário
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
<i>Tis</i>	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor limitado a uma sub-localização anatômica da hipofaringe e com não mais que 2 cm na sua maior dimensão
T2	Tumor invadindo mais que uma sub-localização anatômica da hipofaringe ou uma localização anatômica adjacente ou medindo mais que 2 cm mas não mais que 4 cm na sua maior dimensão, sem fixação da hemilaringe
T3	Tumor maior que 4 cm na sua maior dimensão ou com fixação da hemilaringe
T4a	Tumor invadindo qualquer das seguintes estruturas: cartilagem tireóide/cricóide , osso hióide, glândula tireóide, esôfago, ou compartimento central de partes moles*
T4b	Tumor invadindo fáscia pré-vertebral, envolvendo artéria carótida ou invadindo estruturas mediastinais

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer da hipofaringe para as categorias N e M

Categoria N	Linfonodos regionais
N _x	Informações insuficientes para a avaliação de linfonodos regionais
N ₀	Linfonodos sem metástases
N ₁	Metástase em um único linfonodo homolateral de 3 cm ou menos na sua maior dimensão
N ₂	Metástase em um único linfonodo homolateral de mais que 3 cm, mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão, ou em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão, ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles maior que 6 cm em sua maior dimensão
N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral maior que 3 cm mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão
N2b	Metástase em múltiplos linfonodos homolaterais com não mais que 6 cm em sua maior dimensão
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão
N3	Metástase em um linfonodo maior que 6 cm na sua maior dimensão
Categoria M	Metástase à distância
M _x	Informações insuficientes para a avaliação de metástases distantes
M0	Sem metástases distantes
M1	Metástases à distância

As partes moles do compartimento central incluem a alça muscular pré-laríngea (NT-omo-hióideo, esterno-tireo-hióideo e tireo-hióideo) e gordura subcutânea

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer da região supraglótica da laringe para a categoria T

Categoria T	Tumor
Tx	Informações insuficientes para a avaliação do tumor primário
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
<i>Tis</i>	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor limitado a uma sub-localização anatômica da supraglote com mobilidade normal da corda vocal
T2	Tumor invadindo a mucosa de mais de uma sub-localização anatômica adjacente da supraglote ou glote ou região externa à supraglote (por ex: mucosa da base da língua, a valécula, a parede medial do seio piriforme) sem fixação da laringe
T3	Tumor limitado à laringe com fixação da corda vocal e/ou invadindo qualquer uma das seguintes estruturas: área pós-cricoide, tecidos pré epiglóticos, espaço para-glótico, e/ou com erosão mínima da cartilagem tireóide(ex:córtex interna)
T4a	Tumor invadindo toda a cartilagem tireóide e/ou estendendo-se aos tecidos além da laringe(por ex: traquéia, partes moles do pescoço, incluindo músculos profundos/extrínsecos da língua, alça muscular, tireóide e esôfago)
T4b	Tumor invadindo espaço pré-vertebral ou estruturas mediastinais ou adjacentes a artéria carótida

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer da região supraglótica da laringe para as categorias N e M

Categoria N	Linfonodos regionais
N _x	Informações insuficientes para a avaliação de linfonodos regionais
N ₀	Linfonodos sem metástases
N ₁	Metástase em um único linfonodo homolateral de 3 cm ou menos na sua maior dimensão
N ₂	Metástase em um único linfonodo homolateral de mais que 3 cm, mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão, ou em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão, ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles maior que 6 cm em sua maior dimensão
N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral maior que 3 cm mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão
N2b	Metástase em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm em sua maior dimensão
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão
N3	Metástase em um linfonodo maior que 6 cm na sua maior dimensão
Categoria M	Metástase à distância
M _x	Informações insuficientes para a avaliação de metástases distantes
M0	Sem metástases distantes
M1	Metástases à distância

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer da região glótica da laringe para a categoria T

Categoria T	Tumor
Tx	Informações insuficientes para a avaliação do tumor primário
T ₀	Nenhuma evidência de tumor primário
T _{is}	Carcinoma <i>in situ</i>
T ₁	Tumor limitado à corda(s) vocal(ais) (pode envolver a comissura anterior ou posterior) com mobilidade normal da(s) corda(s)
T1a	Tumor limitado a uma corda vocal
T1b	Tumor envolve ambas as cordas vocais
T2	Tumor que se estende à supraglote e/ou subglote, e/ou com mobilidade diminuída da corda vocal
T3	Tumor limitado à laringe, com fixação da corda vocal e/ou que invade o espaço para-glótico, e/ou com erosão mínima da cartilagem tireóide(ex:córtex interna)
T4a	Tumor que invade completamente a cartilagem tireóide e/ou se estende aos tecidos além da laringe(ex:traquéia, tecidos moles do pescoço, etc)
T4b	Tumor invade espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacentes a artéria carótida

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para para as categorias N e M do câncer da região glótica da laringe

Categoria N	Linfonodos regionais
N _x	Informações insuficientes para a avaliação de linfonodos regionais
N ₀	Linfonodos sem metástases
N ₁	Metástase em um único linfonodo homolateral de 3 cm ou menos na sua maior dimensão
N ₂	Metástase em um único linfonodo homolateral de mais que 3 cm, mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão, ou em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão, ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles maior que 6 cm em sua maior dimensão
N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral maior que 3 cm mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão
N2b	Metástase em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm em sua maior dimensão
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão
N3	Metástase em um linfonodo maior que 6 cm na sua maior dimensão
Categoria M	Metástase à distância
M _x	Informações insuficientes para a avaliação de metástases distantes
M0	Sem metástases distantes
M1	Metástases à distância

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para para a categoria T do câncer da região subglótica da laringe

Categoria T	Tumor
T _x	Informações insuficientes para a avaliação do tumor primário
T ₀	Nenhuma evidência de tumor primário
T _{is}	Carcinoma <i>in situ</i>
T ₁	Tumor limitado à subglote
T ₂	Tumor que se estende à corda(s) vocal(ais) com mobilidade normal ou reduzida da mesma
T ₃	Tumor limitado à laringe com fixação da corda vocal
T _{4a}	Tumor que invade a cartilagem tireóide ou cricóide e/ou se estende a outros tecidos além da laringe(ex:traquéia, tecidos moles do pescoço,etc)
T _{4b}	Tumor invade espaço pré-vertebral, estruturas mediastinais ou adjacentes a artéria carótida

Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para para as categorias N e M do câncer da região subglótica da laringe

Categoria N	Linfonodos regionais
N _x	Informações insuficientes para a avaliação de linfonodos regionais
N ₀	Linfonodos sem metástases
N ₁	Metástase em um único linfonodo homolateral de 3 cm ou menos na sua maior dimensão
N ₂	Metástase em um único linfonodo homolateral de mais que 3 cm, mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão, ou em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão, ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles maior que 6 cm em sua maior dimensão
N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral maior que 3 cm mas não mais que 6 cm na sua maior dimensão
N2b	Metástase em múltiplos linfonodos homolaterais, nenhum deles com mais que 6 cm em sua maior dimensão
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais que 6 cm na sua maior dimensão
N3	Metástase em um linfonodo maior que 6 cm na sua maior dimensão
Categoria M	Metástase à distância
M _x	Informações insuficientes para a avaliação de metástases distantes
M0	Sem metástases distantes
M1	Metástases à distância

Grupos de estadiamento e características TNM do câncer de cabeça e pescoço, da laringe

Estádio	Código
Estádio 0	T _{is} , N0, M0
Estádio I	T1, N0, M0
	T2, N0, M0
Estádio II	T3, N0, M0
Estádio III	T1, N1, M0
	T2, N1, M0
	T3, N1, M0
Estádio IVA	T4a, N0, M0
	T4a, N1, M0
	T1, N2, M0
	T2, N2, M0
	T3, N2, M0
	T4a, N2, M0
Estádio IVB	T4b, Qualquer N, M0
	Qualquer T, N3, M0
Estádio IVC	Qualquer T, Qualquer N, M1

8.2 Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 25/08/09.
(PARECER CEP: Nº 873/2007)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “GENÉTICA E PROTEÔMICA DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carmen Sílvia Passos Lima

II - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui o projeto: “AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS SLC32A2 E KRAS-LCS6 ENTRE PORTADORES DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE”, com a finalidade de dissertação de mestrado da aluna Marília Bueno Santiago, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de agosto de 2009.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

8.3 Anexo 3: Caracterização dos 165 indivíduos do grupo caso com relação a sexo, cor da pele, idade de diagnóstico, localização primária do tumor, grau de diferenciação do tumor, TNM, estágio clínico, tabagismo e etilismo

Grupo Caso	Sexo	Cor da Pele	Idade Diagnostico	Localização Primária	Grau de Diferenciação	T	N	M	Estádio Clínico	Tabagismo	Etilismo
P1	M	Branca	73	Laringe	Moderadamente	3	2C	0	IV	S	N
P2	M	Branca	67	Laringe	Moderadamente	4A	0	0	IV	EX	EX
P3	M	Preta	47	Faringe	Bem	2	2A	X	IV	S	EX
P4	M	Branca	67	Faringe	Moderadamente	3	2B	X	IV	EX	EX
P5	M	Parda	45	Faringe	Moderadamente	4	3	0	IV	S	EX
P6	M	Branca	56	Faringe	Moderadamente	4	3	0	IV	S	S
P7	M	Branca	62	Faringe	Moderadamente	4A	3	0	IV	EX	EX
P8	M	Branca	70	Laringe	Pouco	2	2	0	IV	S	S
P9	M	Branca	66	Faringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	S
P10	M	Parda	60	Faringe	Pouco	2	2A	0	IV	EX	EX
P11	M	Branca	50	Laringe	Moderadamente	4	0	0	IV	S	S
P12	M	Branca	69	Faringe	Pouco	3	0	0	III	EX	EX
P13	M	Branca	57	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	EX	N
P14	M	Branca	51	Faringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	S
P15	M	Parda	52	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	EX	N
P16	M	Branca	64	Faringe	Metastático	2	2A	X	IV	EX	EX
P17	M	Branca	65	Laringe	Moderadamente	2	0	0	II	S	N
P18	M	Branca	38	Faringe	Não ceratinizante	2	3	X	IV	EX	N
P19	M	Branca	75	Laringe	Moderadamente	1	0	0	I	EX	N
P20	M	Branca	66	Laringe	Moderadamente	1	0	0	I	S	N
P21	M	Branca	61	Faringe	Moderadamente	3	1	0	III	S	S
P22	M	Branca	59	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	S
P23	M	Branca	50	Laringe	Bem	2	2C	0	IV	S	EX
P24	M	Branca	86	Laringe	Bem	1A	0	0	I	EX	N
P25	M	Branca	92	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	EX
P26	M	Branca	50	Faringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	S
P27	M	Branca	57	Faringe	Moderadamente	1	0	0	I	S	S
P28	M	Branca	68	Laringe	Moderadamente	4	3	0	IV	EX	S
P29	M	Branca	59	Laringe	Moderadamente	4A	0	0	IV	S	EX
P30	M	Branca	48	Faringe	Moderadamente	4	1	0	IV	S	S
P31	M	Branca	59	Laringe	Bem	1B	0	0	I	S	S
P32	M	Branca	72	Faringe	Moderadamente	2	0	0	II	S	S
P33	M	Branca	63	Laringe	Moderadamente	1B	0	0	I	S	EX
P34	M	Branca	53	Faringe	Moderadamente	3	2B	0	IV	S	EX
P35	M	Preta	67	Laringe	Pouco	1A	0	0	I	S	S
P36	M	Parda	76	Laringe	Moderadamente	1	0	0	I	EX	N
P37	M	Branca	68	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	EX
P38	M	Branca	47	Faringe	Moderadamente	2	0	0	II	S	S
P39	M	Branca	69	Laringe	Invasivo	2A	0	0	II	EX	EX
P40	M	Branca	64	Laringe	Moderadamente	3	2C	0	IV	S	N

P41	M	Branca	78	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	S
P42	M	Branca	61	Laringe	Moderadamente	3	2B	0	IV	S	S
P43	M	Branca	61	Faringe	Indiferenciado	3	2	0	IV	S	S
P44	M	Branca	60	Laringe	Moderadamente	4	1	0	IV	S	S
P45	M	Branca	67	Laringe	Bem	3	0	0	III	S	S
P46	M	Branca	48	Faringe	Moderadamente	2	0	X	II	S	S
P47	M	Branca	59	Faringe	Moderadamente	2	0	0	II	S	EX
P48	M	Branca	50	Faringe	Bem	3	3	0	IV	S	EX
P49	M	Branca	72	Laringe	Moderadamente	2	0	0	II	S	S
P50	M	Branca	48	Faringe	Moderadamente	3	2B	0	IV	S	EX
P51	M	Parda	60	Laringe	Moderadamente	4	2B	0	IV	S	S
P52	M	Branca	59	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	EX
P53	M	Branca	64	Laringe	Moderadamente	1A	0	0	I	S	EX
P54	M	Branca	49	Faringe	Moderadamente	4	3	0	IV	S	S
P55	M	Branca	68	Laringe	Moderadamente	4	2	0	IV	S	EX
P56	M	Branca	70	Faringe	Moderadamente	3	0	0	III	EX	S
P57	M	Branca	57	Laringe	Moderadamente	2	0	0	II	S	EX
P58	M	Parda	56	Faringe	Moderadamente	3	1	0	III	S	EX
P59	M	Preta	60	Laringe	Moderadamente	4	0	0	IV	S	S
P60	M	Branca	45	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	S
P61	M	Amarelo	72	Faringe	Moderadamente	4	3	0	IV	EX	S
P62	M	Branca	44	Laringe	Moderadamente	3	2	0	IV	S	N
P63	M	Branca	47	Faringe	Moderadamente	4A	2C	0	IV	S	S
P64	M	Branca	52	Faringe	Moderadamente	3	2	0	IV	S	EX
P65	M	Branca	45	Faringe	Moderadamente	3	3	0	IV	S	S
P66	M	Branca	51	Laringe	Moderadamente	3	1	0	III	EX	EX
P67	M	Branca	67	Laringe	Moderadamente	2	0	0	II	EX	EX
P68	M	Parda	63	Laringe	Moderadamente	2	2	0	IV	S	EX
P69	M	Branca	39	Faringe	Moderadamente	4A	0	0	IV	S	S
P70	M	Branca	52	Faringe	Ulcerado micro-invasivo	4	3	0	IV	EX	EX
P71	M	Parda	45	Faringe	Moderadamente	2	2	0	IV	S	S
P72	M	Branca	68	Faringe	Bem	3	2C	0	IV	S	EX
P73	M	Branca	73	Faringe	Moderadamente	3	0	0	III	EX	EX
P74	M	Branca	42	Laringe	Moderadamente	1	0	0	I	S	EX
P75	M	Branca	56	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	S
P76	M	Branca	71	Laringe	Moderado a pouco	3	2B	0	IV	S	S
P77	M	Branca	75	Laringe	Pouco	2	2	0	IV	S	S
P78	M	Branca	49	Laringe	Moderadamente	4	2C	0	IV	S	N
P79	M	Branca	60	Faringe	Moderadamente	4	3	0	IV	EX	S
P80	M	Branca	58	Laringe	Bem	1	0	0	I	EX	N
P81	M	Branca	67	Laringe	Moderadamente	1	0	0	I	EX	S
P82	M	Branca	72	Faringe	Moderadamente	4A	2A	0	IV	S	S
P83	M	Branca	50	Faringe	Bem	3	1	0	III	S	S
P84	M	Branca	50	Laringe	Moderadamente	4	0	0	IV	S	S
P85	M	Branca	66	Laringe	Moderadamente	2	0	0	II	S	S

P86	M	Preta	58	Laringe	Moderadamente	4A	0	0	IV	EX	S
P87	M	Branca	51	Cavidade Oral	Moderadamente	4	1	0	IV	S	S
P88	M	Parda	57	Laringe	Bem	4A	2C	0	IV	S	S
P89	M	Branca	58	Faringe	Moderadamente	4	1	X	IV	S	S
P90	M	Branca	59	Laringe	Moderadamente	4A	0	0	IV	S	EX
P91	M	Branca	48	Laringe	Moderadamente	3	0	0	II	N	S
P92	M	Branca	62	Laringe	Invasivo	2B	0	0	II	EX	EX
P93	M	Branca	49	Faringe	Pouco	X	3	X	IV	S	S
P94	M	Branca	60	Faringe	Moderadamente	4B	2C	0	IV	S	S
P95	M	Branca	55	Faringe	Moderadamente	4A	1	0	IV	S	S
P96	M	Branca	64	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	S
P97	M	Branca	66	Laringe	Bem	2	0	0	II	S	EX
P98	M	Branca	58	Laringe	Moderadamente	1	0	0	I	S	S
P99	M	Preta	59	Faringe	Moderadamente	4	2	0	IV	S	S
P100	M	Branca	67	Laringe	Moderadamente	1	0	0	I	S	S
P101	M	Branca	51	Laringe	Moderadamente	4	3	0	IV	S	S
P102	M	Branca	69	Laringe	Moderadamente	4	0	0	IV	S	S
P103	M	Branca	63	Faringe	Moderadamente	3	2	0	IV	EX	S
P104	M	Branca	51	Laringe	Moderadamente	3	1	0	III	S	S
P105	M	Branca	56	Laringe	Moderadamente	2	0	0	II	EX	S
P106	M	Branca	53	Laringe	Moderadamente	2	0	0	II	S	N
P107	M	Branca	47	Laringe	Moderadamente	4	2B	0	IV	S	S
P108	M	Branca	51	Faringe	Moderadamente	2	0	0	II	S	S
P109	M	Branca	61	Faringe	Micro-invasivo	2	2	0	IV	S	S
P110	M	Branca	56	Laringe	Moderadamente	2	1	0	III	S	S
P111	M	Branca	61	Laringe	Moderadamente	3	2A	0	IV	S	EX
P112	M	Branca	74	Laringe	Moderadamente	4	1	0	IV	EX	EX
P113	M	Branca	80	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	N
P114	M	Preta	57	Faringe	Moderadamente	4	0	0	IV	S	N
P115	M	Branca	39	Faringe	Moderadamente	3	0	0	III	N	EX
P116	M	Branca	50	Laringe	Moderadamente	4	0	0	IV	S	S
P117	M	Branca	59	Faringe	Pouco	1	0	0	I	S	S
P118	M	Branca	71	Laringe	Bem	1	0	0	I	S	S
P119	M	Branca	68	Laringe	Moderadamente	1	2	0	IV	S	S
P120	M	Parda	53	Laringe	Pouco	3	2	0	IV	EX	EX
P121	M	Branca	54	Laringe	Moderadamente	4	2C	0	IV	S	S
P122	M	Branca	52	Faringe	NA	4	2A	0	IV	S	EX
P123	M	Branca	45	Faringe	NA	4A	2	X	IV	S	EX
P124	M	Branca	48	Faringe	Moderadamente	4	3	0	IV	S	S
P125	M	Branca	44	Laringe	Moderadamente	1	0	0	I	S	N
P126	M	Branca	48	Laringe	Moderadamente	4	2C	0	IV	S	S
P127	M	Branca	57	Laringe	Bem	4	2C	0	IV	S	S
P128	M	Branca	66	Faringe	Moderadamente	3	0	0	III	EX	EX
P129	M	Branca	46	Laringe	Moderadamente	3	1	0	III	S	N
P130	M	Parda	55	Faringe	Bem	3	2A	0	IV	S	S
P131	M	Branca	52	Faringe	Moderadamente	4	3	0	IV	S	S

P132	M	Branca	73	Laringe	Moderadamente	1	0	0	I	EX	N
P133	M	Branca	55	Laringe	Moderadamente	2	0	0	II	S	S
P134	M	Parda	42	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	N
P135	M	Branca	59	Faringe	Bem	1	0	0	I	EX	EX
P136	M	Branca	71	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	S
P137	M	Branca	55	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	S
P138	M	Branca	50	Faringe	Moderadamente	4	3	X	IV	S	S
P139	M	Branca	64	Laringe	Moderadamente	1	0	0	I	S	EX
P140	M	Branca	60	Laringe	Bem	3	0	0	III	S	S
P141	M	Branca	58	Laringe	Moderadamente	1	3	0	IV	S	S
P142	M	Preta	61	Faringe	Moderadamente	2	2B	0	IV	EX	EX
P143	M	Branca	57	Laringe	Moderadamente	4	1	0	IV	S	S
P144	M	Branca	61	Faringe	Moderadamente	3	2A	X	IV	S	S
P145	M	Branca	78	Laringe	Bem	1A	0	0	I	S	EX
P146	M	Branca	59	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	S
P147	M	Branca	52	Faringe	Moderadamente	4	2	1	IV	S	S
P148	M	Branca	54	Laringe	Bem	4	1	0	IV	S	S
P149	M	Branca	59	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	S
P150	M	Branca	44	Laringe	Moderadamente	1	1	0	III	S	S
P151	M	Branca	54	Laringe	Moderadamente	3	1	0	III	S	EX
P152	M	Branca	59	Laringe	Pouco	3	1	0	III	S	EX
P153	M	Branca	59	Faringe	NA	4	1	0	IV	S	S
P154	M	Branca	63	Laringe	Moderadamente	1	0	0	I	S	S
P155	M	Branca	67	Laringe	Bem	1	0	0	I	S	S
P156	M	Parda	38	Faringe	Moderadamente	4A	2B	0	IV	S	S
P157	M	Branca	53	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	EX	N
P158	M	Branca	61	Laringe	Moderadamente	1	0	0	I	S	S
P159	M	Branca	63	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	N	EX
P160	M	Branca	47	Faringe	Moderadamente	4A	1	0	IV	S	EX
P161	M	Branca	45	Laringe	Bem	4	0	0	IV	S	EX
P162	M	Branca	67	Laringe	Moderadamente	3	0	0	III	S	N
P163	M	Branca	51	Faringe	Moderadamente	4	2B	0	IV	S	S
P164	M	Parda	46	Laringe	Pouco	1	0	0	I	EX	EX
P165	M	Branca	71	Laringe	Moderadamente	3	2B	0	IV	S	S

8.4 Anexo 4: Caracterização dos 230 indivíduos do grupo controle com relação a sexo, cor da pele, idade, tabagismo e etilismo.

Grupo Controle	Sexo	Cor da Pele	Idade	Tabagismo	Etilismo
C1	M	Branca	64	S	N
C2	M	Parda	66	S	N
C3	M	Parda	42	N	N
C4	M	Parda	57	EX	N
C5	M	Parda	45	N	S
C6	M	Branca	54	N	N
C7	M	Parda	47	N	N
C8	M	Branca	44	N	N
C9	M	Branca	41	EX	N
C10	M	Branca	43	N	N
C11	M	Branca	77	S	N
C12	M	Branca	69	N	N
C13	M	Amarela	59	EX	EX
C14	M	Preta	40	N	N
C15	M	Branca	38	EX	EX
C16	M	Branca	55	N	S
C17	M	Branca	46	EX	N
C18	M	Branca	43	N	EX
C19	M	Branca	71	N	N
C20	M	Parda	51	EX	N
C21	M	Branca	57	EX	EX
C22	M	Branca	54	N	N
C23	M	Branca	64	EX	EX
C24	M	Branca	75	---	---
C25	M	Branca	51	N	N
C26	M	Branca	65	EX	N
C27	M	Branca	57	EX	N
C28	M	Branca	57	N	N
C29	M	Branca	60	EX	EX
C30	M	Preta	64	EX	EX
C31	M	Branca	49	S	S
C32	M	Branca	67	N	N
C33	M	Branca	51	N	N
C34	M	Branca	44	S	EX
C35	M	Branca	59	N	N
C36	M	Branca	50	EX	EX
C37	M	Branca	56	N	N
C38	M	Branca	39	EX	N
C39	M	Branca	63	EX	N
C40	M	Branca	47	N	N

C41	M	Branca	49	S	S
C42	M	Branca	48	N	N
C43	M	Parda	48	N	N
C44	M	Parda	56	N	N
C45	M	Branca	63	EX	EX
C46	M	Parda	48	N	S
C47	M	Parda	57	---	---
C48	M	Preta	55	EX	EX
C49	M	Branca	57	---	---
C50	M	Branca	73	---	---
C51	M	Branca	63	EX	N
C52	M	Branca	69	S	N
C53	M	Branca	60	S	S
C54	M	Branca	59	EX	N
C55	M	Branca	66	S	S
C56	M	Branca	73	N	EX
C57	M	Branca	69	EX	N
C58	M	Branca	44	S	N
C59	M	Branca	44	N	N
C60	M	Branca	45	S	EX
C61	M	Branca	46	EX	N
C62	M	Branca	47	EX	EX
C63	M	Branca	47	N	N
C64	M	Branca	47	EX	N
C65	M	Branca	48	EX	EX
C66	M	Preta	52	EX	EX
C67	M	Branca	49	EX	EX
C68	M	Branca	49	---	---
C69	M	Branca	49	---	---
C70	M	Branca	50	N	N
C71	M	Branca	50	N	N
C72	M	Branca	50	S	N
C73	M	Branca	50	N	EX
C74	M	Branca	51	N	N
C75	M	Branca	51	N	EX
C76	M	Branca	51	N	N
C77	M	Branca	52	---	---
C78	M	Branca	53	S	EX
C79	M	Branca	53	S	N
C80	M	Branca	53	S	N
C81	M	Branca	54	---	---
C82	M	Branca	54	S	S
C83	M	Branca	55	---	---
C84	M	Branca	56	EX	N
C85	M	Branca	58	EX	S
C86	M	Branca	58	EX	N

C87	M	Branca	58	EX	EX
C88	M	Branca	58	EX	N
C89	M	Branca	59	S	EX
C90	M	Branca	59	---	---
C91	M	Branca	61	EX	EX
C92	M	Branca	61	EX	N
C93	M	Branca	61	S	EX
C94	M	Branca	62	EX	EX
C95	M	Branca	62	N	N
C96	M	Branca	63	S	N
C97	M	Branca	63	EX	N
C98	M	Branca	64	EX	EX
C99	M	Branca	67	EX	EX
C100	M	Branca	67	---	---
C101	M	Branca	68	N	EX
C102	M	Branca	69	EX	N
C103	M	Branca	72	EX	N
C104	M	Branca	73	EX	EX
C105	M	Branca	76	N	N
C106	M	Amarelo	72	N	N
C107	M	Preta	58	EX	EX
C108	M	Preta	68	EX	EX
C109	M	Parda	42	N	N
C110	M	Parda	53	---	---
C111	M	Parda	58	N	N
C112	M	Parda	76	N	EX
C113	M	Branca	64	EX	N
C114	M	Branca	55	EX	EX
C115	M	Branca	56	EX	EX
C116	M	Branca	52	EX	EX
C117	M	Branca	61	N	N
C118	M	Preta	67	EX	N
C119	M	Parda	53	N	EX
C120	M	Branca	44	S	N
C121	M	Branca	51	EX	N
C122	M	Branca	80	---	---
C123	M	Branca	52	N	N
C124	M	Branca	53	---	---
C125	M	Parda	65	EX	N
C126	M	Branca	66	N	EX
C127	M	Branca	64	EX	N
C128	M	Branca	57	N	N
C129	M	Branca	73	EX	EX
C130	M	Preta	53	S	N
C131	M	Parda	51	EX	N
C132	M	Branca	51	S	S

C133	M	Branca	53	S	S
C134	M	Branca	61	N	N
C135	M	Branca	63	N	N
C136	M	Branca	65	EX	N
C137	M	Branca	66	---	---
C138	M	Preta	56	EX	N
C139	M	Preta	56	N	N
C140	M	Preta	63	EX	N
C141	M	Parda	57	---	---
C142	M	Parda	57	EX	N
C143	M	Parda	54	S	EX
C144	M	Branca	43	N	N
C145	M	Branca	45	N	N
C146	M	Branca	50	EX	N
C147	M	Branca	50	---	---
C148	M	Branca	51	EX	N
C149	M	Branca	52	S	N
C150	M	Branca	52	N	N
C151	M	Branca	53	S	N
C152	M	Branca	54	S	N
C153	M	Branca	55	EX	N
C154	M	Branca	57	N	N
C155	M	Branca	57	EX	EX
C156	M	Branca	57	S	EX
C157	M	Branca	57	EX	EX
C158	M	Branca	57	EX	EX
C159	M	Branca	58	N	N
C160	M	Branca	58	EX	EX
C161	M	Branca	60	N	EX
C162	M	Branca	62	EX	EX
C163	M	Branca	62	S	S
C164	M	Branca	62	S	N
C165	M	Branca	63	N	EX
C166	M	Branca	64	N	N
C167	M	Branca	65	N	N
C168	M	Branca	66	S	N
C169	M	Branca	66	EX	N
C170	M	Branca	66	S	S
C171	M	Branca	68	N	N
C172	M	Branca	72	---	---
C173	M	Branca	64	---	---
C174	M	Branca	49	N	N
C175	M	Branca	56	---	---
C176	M	Branca	64	---	---
C177	M	Parda	38	S	N
C178	M	Branca	50	N	N

C179	M	Branca	53	S	S
C180	M	Branca	54	S	S
C181	M	Parda	57	---	---
C182	M	Branca	60	S	EX
C183	M	Branca	52	EX	N
C184	M	Branca	55	S	EX
C185	M	Branca	49	EX	N
C186	M	Branca	64	S	EX
C187	M	Parda	52	EX	N
C188	M	Branca	61	EX	N
C189	M	Branca	55	N	N
C190	M	Branca	51	N	N
C191	M	Parda	66	S	N
C192	M	Branca	67	---	---
C193	M	Branca	62	N	S
C194	M	Branca	58	S	N
C195	M	Branca	58	---	---
C196	M	Branca	55	EX	N
C197	M	Branca	68	---	---
C198	M	Parda	54	EX	N
C199	M	Parda	50	EX	EX
C200	M	Branca	85	EX	N
C201	M	Branca	43	N	N
C202	M	Parda	73	N	EX
C203	M	Parda	36	---	---
C204	M	Branca	85	EX	N
C205	M	Branca	93	EX	N
C206	M	Branca	78	EX	EX
C207	M	Branca	74	---	---
C208	M	Branca	69	N	N
C209	M	Branca	37	N	N
C210	M	Branca	69	EX	S
C211	M	Branca	47	EX	N
C212	M	Branca	44	N	N
C213	M	Branca	44	EX	N
C214	M	Branca	43	N	N
C215	M	Branca	73	---	---
C216	M	Branca	40	N	N
C217	M	Parda	44	S	N
C218	M	Parda	44	S	S
C219	M	Branca	44	N	N
C220	M	Branca	74	N	N
C221	M	Branca	70	EX	EX
C222	M	Branca	40	EX	EX
C223	M	Branca	76	EX	S
C224	M	Branca	86	EX	N

C225	M	Branca	74	---	---
C226	M	Branca	45	---	---
C227	M	Branca	43	S	N
C228	M	Branca	48	N	N
C229	M	Parda	41	N	N
C230	M	Preta	42	---	---