Isabela Barbosa Firigato

**Variabilidade do número de cópias de *GSTM1* e de *GSTT1* no
câncer oral: risco e evolução**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Dra. Fernanda de Toledo
Gonçalves

São Paulo

2021

Isabela Barbosa Firigato

**Variabilidade do número de cópias de *GSTM1* e de *GSTT1* no
câncer oral: risco e evolução**

Versão Corrigida

(Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-
Graduação e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Dra. Fernanda de Toledo
Gonçalves

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Firigato, Isabela Barbosa

Variabilidade do número de cópias de GSTM1 e de
GSTT1 no câncer oral : risco e evolução / Isabela
Barbosa Firigato. -- São Paulo, 2021.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientadora: Fernanda de Toledo Gonçalves.

Descritores: 1.Variações do número de cópias de
DNA 2.GSTM1 3.GSTT1 4.Neoplasias bucais
5.Susceptibilidade à doenças 6.Progressão da doença
7.Recidiva 8.Prognóstico 9.Análise de sobrevida

USP/FM/DBD-184/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Madalena e Ronaldo, de quem sempre veio o incentivo ao estudo.

Às minhas irmãs, Fernanda e Mariana, que são as melhores amigas que tenho na vida.

A todos os pacientes oncológicos, especialmente àqueles que são atendidos pelo SUS, e lutam bravamente a cada dia.

A todos os pesquisadores que, mesmo com tantos atentados à Ciência Brasileira, perseveraram para manter suas linhas de pesquisa e continuar contribuindo com o desenvolvimento e benfeitoria de nossa sociedade.

AGRADECIMENTOS

Graças dou a Deus que, por sua grande misericórdia, abriu-me todas as portas incluindo as da Universidade e do Grupo de pesquisa ao qual pertenço, proveu-me mais que o necessário e me trouxe até aqui.

À minha família, que sempre me ampara desde os aspectos básicos até os mais avançados, em que nunca me faltou o carinho, o amor, o cuidado, a preocupação, orações, a boa educação, os excelentes conselhos e as lições de vida que me são imprescindíveis para aperfeiçoar a pessoa e a profissional que sou. A gratidão é imensa que me faltam palavras para agradecer todo o bem.

À Dra. Fernanda de Toledo Gonçalves por ter me abraçado desde o primeiro momento que cheguei ao laboratório compartilhando do seu conhecimento notório, me ensinando a não só reproduzir mecanismos experimentais, mas raciocinar no que se esteja fazendo e pensar criticamente nos resultados obtidos. Além de orientadora, é uma amiga, companheira, em quem tenho inspiração e admiração tanto na vida acadêmica quanto na vida pessoal.

Ao Dr. Otávio Alberto Curioni, cirurgião e pesquisador do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis (São Paulo), pela parceria com nosso grupo de pesquisa disponibilizando materiais e informações, bem como a orientação sobre os aspectos clínicos dos pacientes oncológicos.

À Profa Dra Gilka Jorge Fígaro Gattás, por ter me dado oportunidade de fazer parte deste grupo de pesquisa e que contribuiu para minha formação e crescimento acadêmico, também me ensinando a fazer Ciência de forma crítica e intelectual. Todos os seus ensinamentos e requerimentos me são de proveito até os dias atuais.

Às companheiras e amigas Juliana De Antonio e Mariana Rocha Silva, por toda a ajuda nos experimentos, na confecção dos materiais, pelas maravilhosas risadas e momentos agradabilíssimos que deixaram a jornada mais leve e proveitosa.

A Liliane Paiva, nossa queridíssima técnica de laboratório que nos provê todo o suporte necessário para que consigamos conduzir nossos experimentos, nos organizar em nosso laboratório e atingir nossos objetivos.

Aos professores doutores Luisa Lina Villa e Marcos Brasilino de Carvalho, por terem sido nominados, em tempos distintos, como meus orientadores acadêmicos devido à impossibilidade de oficialização de minha orientora naquele momento.

À Dra. Rossana V.M. López por ter se disponibilizado a nos auxiliar na orientação e na execução das análises estatísticas empregadas nessa Dissertação.

A Débora Sousa, Luciane Cardoso e Raquel Hessel, funcionárias do Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela realização eficiente e excelente de suas funções nos ajudando com toda dedicação e simpatia.

A Dirce, secretária do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho da FMUSP, por toda dedicação, simpatia, e disposição em atender nossos pedidos.

Ao grupo CCBUSP, fazendo notório o subgrupo de seus administradores, que muito me ajudou a manter o equilíbrio durante essa jornada acadêmica, principalmente num momento que era para ser de choro e angústia, mas foi passado em leveza, fé e alegria. Deus abençoe a todos pelas orações, pelo companheirismo, pelas risadas, pela excelente comunhão.

Aos pacientes do Hospital Heliópolis que compuseram a população amostral, sem a qual o estudo não poderia ser realizado.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento financeiro e tecnológico ao Projeto de Pesquisa Regular (Processo: 2014/16092-4).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de minha bolsa de Mestrado, provendo, desta forma, meu suporte financeiro.

Ao Laboratório de Investigação Médica 40 (LIM-40) do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho da FMUSP que proveu parte do financiamento de material para a realização do estudo.

Ao serviço de Biblioteca e Documentação da FMUSP.

“O homem tem ciência das cousas da terra, mas a sabedoria é dom de Deus”

Jó; 28

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com a seguinte norma em vigor no momento desta publicação: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

SUMÁRIO

Lista de Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Carcinoma espinocelular oral	1
1.2 Epidemiologia do carcinoma espinocelular oral	6
1.3 Fatores de risco do desenvolvimento do carcinoma espinocelular oral	8
1.4 Variabilidade do número de cópias	17
1.4.1 Variabilidade do Número de Cópias de <i>GSTM1</i> e de <i>GSTT1</i>	23
1.5 Glutathione S-Transferases (GSTs)	27
1.5.1 Glutathione S-Transferases citosólicas	31
1.5.2 Glutathione S-Transferase μ 1 e Glutathione S-Transferase θ 1	33
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
3 MÉTODOS	38
3.1 Casuística	38
3.2 Extração de DNA	42

3.3 Determinação da Variabilidade do Número de Cópias de <i>GSTM1</i> e de <i>GSTT1</i>	44
3.4 Análise estatística.....	46
3.4.1 Risco do desenvolvimento do carcinoma espinocelular oral	46
3.4.2 Progressão do carcinoma espinocelular oral	48
3.4.3 Sobrevida dos pacientes	49
4 RESULTADOS	51
4.1 Caracterização da população amostral e risco do desenvolvimento tumoral	51
4.2 Determinação e análise da variabilidade do número de cópias de <i>GSTM1</i> e de <i>GSTT1</i>	60
4.3 Análise de regressão logística multivariada	62
4.4 Progressão do carcinoma espinocelular oral	65
4.5 Análise de sobrevida global	72
4.6 Análise de sobrevida livre de progressão	76
5 DISCUSSÃO	80
5.1 Característica da população amostral, consumo de cigarros e álcool, características de CECO	80
5.2 Variabilidade do número de cópias de <i>GSTM1</i> no risco de desenvolvimento de CECO	91
5.3 Variabilidade do número de cópias de <i>GSTM1</i> na progressão de CECO e sobrevida dos pacientes	95
5.4 Variabilidade do número de cópias de <i>GSTT1</i> no risco e progressão de CECO e sobrevida dos pacientes	99
6 CONCLUSÃO	101
7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	103
8 ANEXOS	104
Anexo A	104
Anexo B	111

Anexo C	116
9 REFERÊNCIAS	124

LISTA DE SIGLAS

6-FAM-MGB	<i>6-carboxyfluoresceine minor groove binder</i>
8-oxodG	<i>8-oxo-7-hydrodeoxyguanosine</i>
A	adenina
a.C.	antes de Cristo
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
ALDH2	aldeído desidrogenase 2
<i>AMY1</i>	<i>amilase 1</i>
ASK1	<i>apoptosis signal-regulating kiase 1</i>
B[a]P	benzo[α]pireno
C	citossina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<i>CDKN2A</i>	<i>inibidor da quinase dependente de ciclina 2A</i>
CECO	carcinoma espinocelular oral
CLIC-5	canal intracelular de cloreto 5
CNV	<i>copy number variation</i>
Ct	<i>threshold cycle</i>
<i>CYP1A1*2^a</i>	<i>família citocromo P450 1 subfamília A membro 1*2A</i>
CYPs	citocromo P450
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<i>EGFR</i>	<i>receptor para o fator de crescimento epidermal</i>
EPHs	epóxido hidrolases
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EUA	Estados Unidos da América
F	<i>foward</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<i>FGFR1</i>	<i>receptor para o fator de crescimento de fibroblasto 1</i>

FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FoSTeS	<i>fork stalling and template switching</i>
G	guanina
GSH	glutathiona
GSTA	Glutathione S-Transferase α
GSTM1	Glutathione S-Transferase μ 1
GSTO	Glutathione S-Transferase ω
GSTP	Glutathione S-Transferase π
GSTS	Glutathione S-Transferase σ
GSTs	Glutathione S-Transferases
GSTT1	Glutathione S-Transferase θ 1
GSTT2	Glutathione S-Transferase θ 2
GSTZ	Glutathione S-Transferase ζ
HAPs	hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HPV	papilomavírus humano
HR	<i>hazard ratio</i>
HRAS	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	interval de confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
LCR	<i>low-copy repeat</i>
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
MOAS	morte não associada à doença
MOCA	morte pelo câncer
mRNA	RNA mensageiro
MRP	proteína de resistência à múltiplasdrogas
mTOR	alvo mamífero da rapamicina
N	número absoluto de indivíduos
NAHR	<i>nonallelic homologous recombination</i>

NATs	N-acetil transferases
NHEJ	<i>nonhomologous end-joining</i>
NO	óxido nítrico
NQOs	NAD(P)H:quinona oxirredutases
OR	<i>odds ratio</i>
p	<i>p-value</i>
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
<i>PI3KCA</i>	<i>subunidade catalítica α da fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase</i>
pRB	proteína associada ao retinoblastoma
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome ten</i>
qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo-real
R	<i>reverse</i>
RB1	<i>RB transcriptional corepressor 1</i>
<i>RNaseP</i>	<i>ribonuclease P</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	rotação por minuto
SD	<i>segmental duplication</i>
SDS	sódio dodecilssulfato
<i>SMAD4</i>	<i>SMAD family member 4</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SULTs	Sulfotransferases
SUS	Sistema Único de Saúde
T	timina
TE	Tris-EDTA
TEM	Tris-EDTA-NaCl
TNM	<i>tumor-node-metastasis</i>
<i>TP53</i>	<i>tumor protein p53</i>
UGTs	UDP-glucoronosiltransferases
VCD	vivo com doença
VOUS	variants of uncertain significance

VSD

vivo sem doença

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor que
=	igual a
>	maior que
≤	igual ou menor que
≥	igual ou maior que
°C	graus Celsius
·NH ₂	grupo amina
·OH	grupo hidroxila
·SH	grupo tiol
g	grama
II	segundo
kDa	quiloDalton
M	molar
mL	mililitro
mM	milimolar
N	nitrogênio
ng	nanograma
nm	nanômetro
O	oxigênio
S	enxofre
XIX	19
XVI	16
XVII	17
XX	20
XXI	21

α	alfa
β	beta
δ	delta
ζ	zeta
θ	teta
μ	mu
μg	micrograma
μL	microlitro
π	pi
σ	sigma
τ	tau
φ	phi
ω	ômega

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas, educacional e consumo de cigarro e álcool dos pacientes acometidos pelo CECO, assim como os dados clínicos	53
Tabela 2 - Características demográficas, educacional e consumo de cigarro e álcool dos pacientes sem quaisquer diagnósticos tumorais que compuseram o grupo de controles	58
Tabela 3 - Associação das características demográficas, de educação, consumo de cigarros e álcool, bem como as quantidades de seus consumos com o risco de desenvolvimento de CECO	60
Tabela 4 - Distribuição das frequências de cada cópia de <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> entre os controles e os pacientes com CECO, bem como os testes de associação com o risco de desenvolvimento tumoral	62
Tabela 5 - Análise de regressão logística múltipla com a inclusão das variáveis escolaridade, consumo de cigarro e de álcool e a variabilidade do número de cópias de <i>GSTM1</i> e de <i>GSTT1</i>	63
Tabela 6 – Distribuição do CNV de <i>GSTM1</i> e de <i>GSTT1</i> de acordo com o estadiamento clínico de CECO	64

Tabela 7 - Distribuição das características demográficas e educacional

dos pacientes oncológicos com e sem eventos de progressão ----- 66

Tabela 8 – *Status* tabágico e ético, bem como a quantificação do consumo de

cigarros e álcool dos pacientes oncológicos sem progressão tumoral, com

recorrências, com segundo tumores primários e com metástases à distância, além

das análises de associação com as chances de ocorrências dos eventos

secundários ----- 68

Tabela 9 - Distribuição das frequências dos números de cópias de *GSTM1* e de

GSTT1 para os pacientes sem eventos de progressão tumoral, com recorrências,

com segundo tumores primários e com metástases à distância ----- 70

Tabela 10 - Análise de associação do CNV de *GSTM1* e de *GSTT1* com as chances

de recorrências do carcinoma espinocelular oral ----- 71

Tabela 11 - Análise de associação do CNV de *GSTM1* e de *GSTT1* com as chances

de segundo tumores primários do carcinoma espinocelular oral ----- 71

Tabela 12 - Análise de associação do CNV de *GSTM1* e de *GSTT1* com as chances

de metástases à distância do carcinoma espinocelular oral ----- 72

Tabela 13 - Desfechos observados após o fim do período de seguimento dos

pacientes acometidos por CECO ----- 72

Tabela 14 - Regressão de Cox univariada para a sobrevida global dos pacientes

com CECO, considerando-se o CNV dos genes *GSTM1* e *GSTT1* 75

Tabela 15 - Regressão de Cox univariada para a sobrevida livre de progressão

dos pacientes acometidos por CECO, considerando-se o CNV dos genes *GSTM1*

e *GSTT1* 79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma da composição dos casos	51
Figura 2 – Fluxograma da composição do grupo de controles	56
Figura 3 – Curva de sobrevida global dos pacientes com diagnóstico de OSCC	73
Figura 4 – Curvas de sobrevida dos pacientes com diagnóstico de tumor, de acordo com os números de cópias de <i>GSTM1</i>	74
Figura 5 – Curvas de sobrevida dos pacientes com diagnóstico de tumor, de acordo com os números de cópias de <i>GSTT1</i>	75
Figura 6 – Curva de sobrevida livre de progressão dos pacientes acometidos por OSCC	76
Figura 7 – Curvas de sobrevida livre de progressão dos pacientes de acordo com o número de cópias de <i>GSTM1</i>	77
Figura 8 - Curvas de sobrevida livre de progressão dos pacientes de acordo com o número de cópias de <i>GSTT1</i>	78

RESUMO

Firigato IB. *Variabilidade do número de cópias de GSTM1 e de GSTT1 no câncer oral: risco e evolução* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

O carcinoma espinocelular oral (CECO) é a neoplasia mais comum entre os cânceres de cabeça e pescoço, sendo considerado um problema de saúde pública mundial devido às altas taxas de morbidade e mortalidade que a doença apresenta. Os principais fatores de risco associados ao CECO são o consumo de cigarro e álcool, compostos que apresentam carcinógenos que contribuem tanto para o desenvolvimento quanto à progressão da doença. A inativação dos carcinógenos do cigarro ocorre durante a fase II do processo de biotransformação, impedindo seus efeitos genotóxicos. As enzimas de detoxificação são codificadas pelos genes *GSTM1* e *GSTT1*, respectivamente, os quais apresentam variabilidade do número de cópias (CNV), sendo zero cópias a deleção gênica completa e o subsequente comprometimento da detoxificação dos carcinógenos, o que tem sido associado com o aumento da susceptibilidade de diversas doenças, incluindo CECO. Entretanto, a contribuição individual de uma e mais cópias gênicas para a fase II da biotransformação ainda não está compreendida. Desta forma, o presente estudo determinou o CNV de *GSTM1* e *GSTT1* e investigou sua possível associação com o risco de desenvolvimento do carcinoma espinocelular oral, com as chances de ocorrência dos eventos de progressão tumoral (recorrências, segundo tumores primários e metástases à distância) e com a

sobrevida (global e livre de progressão) dos pacientes com diagnóstico de câncer. Foi avaliada uma população caso-controle, proveniente do Hospital Heliópolis (São Paulo), composta por 234 pacientes com CECO e 422 pacientes sem o diagnóstico tumoral. A determinação do CNV de *GSTM1* e de *GSTT1* foi realizada a partir da técnica de PCR em Tempo-Real (qPCR) utilizando-se o ensaio *TaqMan Gene Copy Number Assay*, em que as reações de amplificação foram analisadas pelo método (Ct) $2^{-\Delta\Delta Ct}$, e o cálculo do número de cópias foi determinado pelo *software CopyCaller* (versão 2.1). Os resultados mostraram variação de zero a duas cópias para *GSTM1* e de zero a três cópias para *GSTT1*, em que duas cópias de *GSTM1* foram associadas com a diminuição do desenvolvimento de CECO em 53% (OR 0,47; IC 95% 0,24-0,92). Em relação à progressão tumoral, uma cópia de *GSTM1* foi associada com a diminuição das chances de recorrências de CECO (OR 0,47; IC 95% 0,26-0,85), bem com o risco diminuído de morte (HR 0,63; IC 95% 0,44-0,91) e de progressão da doença (HR 0,50; IC 95% 0,33-0,75), sendo observado aumento da sobrevida desses pacientes em relação àqueles que apresentaram zero cópias de *GSTM1*. Em relação ao CNV de *GSTT1*, nenhuma das cópias gênicas foi estatisticamente associada com o CECO: risco de desenvolvimento tumoral e chances de progressão e sobrevida dos pacientes. Os resultados sugerem que o CNV de *GSTM1* está associado com a diminuição do risco de estabelecimento de CECO, bem como sua progressão, além de favorecer a sobrevivência dos pacientes tumorais, se mostrando uma ferramenta para detecção precoce do câncer e um fator prognóstico promissor. Já o CNV de *GSTT1* não foi associado ao risco e à progressão dessa neoplasia.

Descritores: Variações do número de cópias de DNA; *GSTM1*; *GSTT1*; Neoplasias bucais; Susceptibilidade a doenças; Progressão da doença; Recidiva; Prognóstico; Análise de sobrevida.

ABSTRACT

Firigato IB. *Copy number variation of GSTM1 and GSTT1 and the oral cancer: tumor risk and progression* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common tumor in the head and neck region. The disease has been considered a public health concern worldwide due to high morbidity and mortality rates. The main OSCC risk factors are the consumption of tobacco and alcohol, whose carcinogenic compounds contribute to the development of this disease and its progression. Furthermore, the inactivation of cigarette smoking carcinogens is catalyzed by GSTM1 and GSTT1 enzymes, which prevents the genetic mutations and the subsequent carcinogenesis steps. These enzymes are codified by the genes *GSTM1* and *GSTT1* that present the copy number variation (CNV) in range from zero to two copies. Zero copies of the genes promote the lack of enzymatic activity and the accumulation of electrophilic compounds inside the cells and this effect is associated with the susceptibility of several diseases, such as OSCC. However, the individual contribution of one and more copies of these genes to the detoxification process is not fully understood yet. The present study aimed to determine the CNV of *GSTM1* and *GSTT1* and investigate its possible association with the CECO development risk, the chances of the occurrence of the tumor progression (recurrences, second primary tumors, and distant metastases) and the survival of the oncologic patients (global and progression-free survival). Then, a total of 234 OSCC patients and

422 patients without any cancer diagnosis were recruited, at the same time, from the Heliopolis Hospital (São Paulo). The determination of CNV of *GSTM1* and *GSTT1* was carried out through the Real-Time PCR (qPCR) technique, using TaqMan Gene Copy Number Assay, wherein the amplification reactions were analyzed by the (Ct) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ methodology and the number of copies were calculated by the CopyCaller software (version 2.1). In the results, it was determined a range from zero to two copies for *GSTM1* and from zero to three copies for *GSTT1*. Two copies of *GSTM1* were associated with the diminished risk of OSCC in 53% (OR 0.47; CI 95% 0.24-0.92). Regarding the tumor progression, one copy of *GSTM1* was associated with the reduced chances of OSCC recurrences (OR 0.47; CI 95% 0.26-0.85) and with a low risk of death (HR 0.63; CI 95% 0.44-0.91) and the OSCC progression (0.50; CI 95% 0.33-0.75), wherein the tumor patients presented longer survival than the patients who carried zero copies of *GSTM1*. About the CNV of *GSTT1*, none copy of the gene was statistically associated with the OSCC development, tumor progression, or survival of patients. The findings suggest that the CNV of *GSTM1* was associated with the reduced risk of OSCC and its progression, which improves the survival of patients. Then, the determination of the number of copies of *GSTM1* might be used for the early detection of the cancer and seems to be a promising prognostic factor. Otherwise, the CNV of *GSTT1* was not associated with the OSCC risk and progression.

Descriptors: DNA copy number variations; *GSTM1*; *GSTT1*; Mouth neoplasms; Disease susceptibility; Disease progression; Recurrence; Prognosis; Survival analysis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma espinocelular oral

A cavidade oral é a estrutura anatômica que é porta de entrada para o interior do organismo e apresenta funções fisiológicas essenciais para a sobrevivência da espécie, funções essas que incluem a alimentação, a respiração, a percepção e a exploração do ambiente e a interação social (Guimarães et al, 2013). Anatomicamente, esta região é delimitada por lábios, bochechas, palato duro, soalho bucal e o arco palatoglossos (Caldeira et al., 2018), além de incluir língua, trígono retromolar, gengivas, ou rebordo alveolar (quando há ausência de dentes) e região jugal (Kowalski; Alves, 2016; Wong e Wiesenfeld, 2018; Kim e Li, 2019). Todas as estruturas da cavidade oral são revestidas e protegidas pela membrana oral, membrana mucosa constituída por uma camada de tecido epitelial e uma camada de tecido conjuntivo (lâmina própria). Ao longo de sua extensão, a membrana oral sofre algumas alterações originando três regiões histológicas distintas relacionadas com as funções das estruturas revestidas (Winning e Townsend, 2000; Nanci, 2019).

O tecido epitelial presente na mucosa oral é do tipo escamoso estratificado, tipo histológico onde se desenvolve o carcinoma espinocelular oral (CECO), a principal neoplasia que acomete a cavidade oral correspondendo a 95% dos casos do câncer de boca. Os tumores de glândulas salivares menores, os sarcomas, os linfomas, as leucemias e o melanoma representam, em conjunto, os 5% dos casos remanescentes (Kowalski; Alves, 2016).

O CECO pode se originar em todas as estruturas revestidas pela mucosa oral, mas a língua, o soalho bucal e o lábio inferior são as estruturas mais afetadas pelo câncer (Kowalski; Alves, 2016). A doença desenvolve-se em regiões epiteliais que apresentam células displásicas sem alterações macroscópicas da morfologia do tecido acometido (Rivera et al., 2015; Leemans et al., 2018). A displasia é caracterizada por um padrão proliferativo desordenado, mas não neoplásico, em que as células são altamente pleomórficas com núcleos hipercromáticos e anormalmente grandes (Kumar, 2018). As alterações displásicas podem ser classificadas em discretas, moderadas e severas, de acordo com a proporção das modificações ao longo do epitélio (Rivera, 2015; Kumar, 2018). Desta forma, quando as alterações limitam-se aos queratinócitos presentes na membrana basal, a displasia é discreta. Havendo anormalidades citológicas aproximadamente até ao meio do epitélio, denomina-se de displasia moderada e se tais modificações alcançam toda a extensão do tecido epitelial, diz-se tratar de displasia severa (Rivera, 2015). Embora a displasia não seja sinônimo de câncer, sua ocorrência está relacionada com o desenvolvimento tumoral, em que displasias severas aumentam o risco da formação de neoplasias, incluindo as orais (Kumar, 2018), tanto que em 1953, Slaughter e colaboradores definiram como campo de cancerização, a concentração de células displásicas ao longo do epitélio escamoso estratificado (Slaughter et al., 1953), regiões essas que contribuem tanto para a formação de CECO quanto para a ocorrência de recorrências dessa doença e o desenvolvimento de segundo tumores primários (Leemans et al., 2018).

A displasia também pode ser encontrada em lesões macroscópicas potencialmente malignas, as quais podem ser suscetíveis à transformação em lesões neoplásicas dependendo de seu estado displásico (Rivera et al., 2015; Leemans et al.,

2018). Essas lesões potencialmente malignas apresentam ocorrência heterogênea e nem sempre são perceptíveis (Speight et al., 2018). Algumas lesões podem ser esbranquiçadas, devido à grande quantidade de leucócitos presentes na região, sendo denominadas leucopláquias cuja ocorrência é mais frequente entre os indivíduos. Também já foram caracterizadas lesões avermelhadas por causa da vascularização, as quais são chamadas de eritropláquias que são menos frequentes, porém apresentam maior probabilidade de progredirem para o CECO. Há vezes, ainda, que as lesões esbranquiçadas se apresentam com focos avermelhados e, desta forma, denominam-se eritroleucopláquias (Speight et al., 2018).

Uma vez estabelecido o carcinoma espinocelular oral, os tumores em estádios iniciais geralmente se manifestam como lesões ulceradas discretas que podem ser esbranquiçadas, avermelhadas ou esbranquiçadas entremeadas por áreas avermelhadas, de aspecto verrucoide ou proliferativo (Kowalski; Alves, 2016) e que frequentemente são indolores (López-López et al., 2015; Kowalski; Alves, 2016). Todavia, o crescimento e a progressão neoplásica ocorrem de maneira acelerada, em que as manifestações iniciais evoluem, comumente, para lesões infiltrativas ulcerovegetantes de bordas arredondadas e elevadas, com contornos irregulares e superfície rugosa endurecida à apalpação, em que podem ocorrer sangramentos espontâneos ou provocados pelo toque da lesão (López-López et al., 2015). O crescimento dos tumores avançados ocorre de forma exofítica, o que resulta no aspecto endurecido da região favorecendo a manifestação de dores, que são os principais sintomas desses casos, seguida de mobilidade dos dentes, trismo, persistências de mau odor e linfadenopatia cervical, sintomas esses que favorecem a acentuada perda da massa corpórea dos pacientes oncológicos (Kowalski; Alves, 2016).

A neoplasia apresenta crescimento invasivo característico com invasão perineural e invasão para a região do pescoço através da corrente linfática ou sanguínea, o que contribui para a progressão tumoral em forma de metástases locorregionais e regionais (López-López et al., 2015). Há, ainda, a ocorrência de metástases à distância por meio da invasão das células tumorais à microcirculação, linfática ou sanguínea, e sua migração ao interstício de outros órgãos para iniciar sua proliferação na nova região anatômica (Aires et al., 2017). Assim, a taxa de metástase à distância entre os pacientes acometidos pelo CECO varia entre 2% a 15% (Aires et al., 2017), em que os pulmões e o fígado são os órgãos mais acometidos (López-López et al., 2015). Além dos eventos de metástases, a progressão tumoral também se dá pelo desenvolvimento de segundos tumores primários, os quais são relatados desde 1869 por Billroth e podem ocorrer síncrona ou metacronicamente, ou seja, após seis meses do estabelecimento do tumor inicial (van der Waal e de Bree, 2010). No estudo de revisão científica conduzido por van der Waal e de Bree (2010) os segundos tumores primários de CECO apresentam taxa de prevalência em torno de 18% dos pacientes com diagnóstico tumoral e esses eventos secundários são detectados na região das vias aerodigestivas superiores que apresentam mucosa estratificada que, preferencialmente, foram submetidas à radiação ou à cirurgia, mas também podem acometer o esôfago e o pulmão (van der Waal e de Bree, 2010).

Em relação ao estadiamento da doença, em torno de 90% dos pacientes oriundos de países em desenvolvimento e metade dos pacientes dos países desenvolvidos apresentam a doença avançada no momento do diagnóstico, ou seja, o tumor é classificado nos estadios III/IV de acordo com sistema de classificação TNM (*tumor-node-metastasis* - Kowalski; Alves, 2016; El-Bayoumy et al., 2017). O diagnóstico

tumoral tardio está relacionado à falta de informação dos pacientes, em que a maior parte apresenta condições socioeconômicas limitadas, e a baixa capacitação dos profissionais das áreas médicas e odontológicas que apresentam dificuldade em detectar os sinais iniciais da doença. Assim, a realização dos diagnósticos tardios e, conseqüentemente, a alta frequência dos tumores em estadios avançados favorecem a ocorrência de eventos secundários relacionados com a progressão tumoral como recorrências precoces, segundo tumores primários e metástases em linfonodos regionais cervicais e à distância. Nota-se ainda que metade dos pacientes com tumores avançados já apresentam metástases no momento do diagnóstico da doença (Li et al., 2018). Tais fatores contribuem para o prognóstico desfavorável, a dificuldade no tratamento antitumoral e a redução das taxas de sobrevida dos pacientes, em torno de 50% (van der Waal e de Bree, 2010; Yanamoto et al., 2012; Kowalski; Alves, 2016; Aires et al., 2018).

O tratamento do paciente acometido por CECO envolve a atuação de uma equipe multidisciplinar, da qual fazem parte o cirurgião de cabeça e pescoço, o cirurgião plástico, o radioterapeuta, o oncologista clínico, o patologista, o cirurgião dentista, o nutricionista, o fonoaudiólogo e o psicólogo (Kowalski; Alves, 2016). Os tipos de estratégias terapêuticas disponíveis para a maior parte dos pacientes são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Kim e Li, 2019), em que a escolha do tratamento adequado a ser oferecido pela equipe multidisciplinar é baseada no estadio do câncer (El-Bayoumy et al., 2017; Carnielli et al., 2018), em que tumores com classificações TNM I/II podem ser tratados com a aplicação exclusiva de cirurgia ou radioterapia com intenção de cura, embora a cirurgia seja preferencialmente escolhida para estes casos. Já para os tumores avançados (TNM III/IV), há a realização da cirurgia com subsequente

aplicação da radioterapia adjuvante havendo, por vezes, casos em que há a necessidade da quimioterapia (Kowalski; Alves, 2016; Kim e Li, 2019). Frequentemente, o tratamento inicial torna-se ineficaz, o que também é um fator para o aumento das chances de progressão tumoral, em que 45% dos pacientes com CECO que receberam tratamentos antitumorais com intenção de cura, desenvolvem recorrências, segundo tumores primários ou metástases à distância (Mucke et al., 2009; Rogers et al., 2009), dentre estes eventos secundários, a recorrência tumoral é a mais frequente com taxas de até 76% entre os pacientes com diagnóstico de CECO que foram submetidos aos tratamentos-padrão (Carnielli et al, 2018).

A morbidade da doença é elevada e pode ser ocasionada tanto pela progressão do tumor quanto pelas estratégias terapêuticas disponíveis, o que pode afetar as funções fisiológicas da cavidade oral e resultar na dificuldade de deglutição (disfagia), comprometimento do paladar (disgeusia), a perda dentária, o trismo e as deformidades na pele. Deve-se considerar também que tais disfunções podem desestabilizar o estado emocional do paciente e que todas essas complicações aumentam as chances do isolamento social do indivíduo. Além disso, o tratamento da doença demanda ampla disponibilidade de tempo por parte do paciente e, por conseguinte, o seu afastamento das atividades ocupacionais, podendo comprometer sua condição econômica (Kim e Li, 2019). Assim, o CECO vem sendo considerado um sério problema de saúde pública nos últimos anos (Jemal et al., 2011; Kowalski; Alves, 2016; Zhao et al., 2018; Panarese et al., 2019).

1.2 Epidemiologia do carcinoma espinocelular oral

O carcinoma espinocelular oral é a neoplasia mais comum entre os tumores que se desenvolvem na região da cabeça e pescoço (Rivera et al., 2017). Mundialmente, o

CECO é o 17º tipo tumoral de maior incidência anual com o registro de 377.713 novos casos diagnosticados durante o ano de 2020, representando 2% de todos os casos de cânceres mundiais (Ferlay et al., 2020). Entretanto, observa-se que a incidência da doença varia entre as regiões geográficas, onde 2/3 de todos os casos de CECO ocorrem entre os países em desenvolvimento (Ali et al., 2017). Segundo os dados do GLOBOCAN 2020, as maiores incidências deste tipo tumoral foram identificadas na Malásia, seguidas das taxas encontradas no centro-sul asiático, centro e leste europeus, Austrália e Nova Zelândia. A América do Sul ocupou a 13ª posição entre as maiores incidências mundiais de CECO (Ferlay et al., 2020). No Brasil, estima-se o diagnóstico de 15.190 novos casos para cada ano do triênio 2020 a 2022 (INCA - estimativa 2020-22).

Indivíduos do sexo masculino são os mais acometidos pela doença (Ferlay et al., 2015; Rivera, 2015; Hussein et al., 2017) apresentando a proporção de 3 homens para 1 mulher (Sanderson et al., 1997). Dados do GLOBOCAN 2018 mostraram que, mundialmente, o CECO foi a oitava neoplasia mais incidente entre os homens (Bray et al., 2018), se apresentando como o quinto tipo tumoral de maior incidência entre os brasileiros (INCA – estimativa 2020-22). Entre as mulheres, por outro lado, o carcinoma espinocelular oral não se encontra entre os tipos tumorais mais incidentes nesta população, tanto no mundo (Bray et al., 2018) quanto no Brasil (INCA – estimativa 2020-22). Em relação à faixa etária, os pacientes que são diagnosticados com CECO apresentam entre 50 a 70 anos de idade (Hussein et al., 2017), o que corresponde a 3/4 dos casos (International Agency for Research on Cancer em <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table>, acessado em 06/04/2021 às 15:29).

O diagnóstico tumoral em estádios avançados, juntamente com a frequente ocorrência de eventos secundários relacionados à progressão da doença, contribuem para as elevadas taxas de mortalidade desta neoplasia, em que foram registradas 177.757 mortes, devido ao CECO, durante o ano de 2020 (Ferlay et al., 2020). A distribuição das taxas de mortalidade da doença entre as regiões mundiais segue a mesma proporção das taxas de incidência (Ferlay et al., 2020). No Brasil, foram registradas 6.605 mortes pelo CECO ao longo do ano de 2019 (Sistema de informação sobre mortalidade - SIM – Ministério da Saúde: <http://www.datasus.gov.br>).

1.3 Fatores de risco do desenvolvimento do carcinoma espinocelular oral

A carcinogênese é o resultado do acúmulo de diferentes mutações genéticas, as quais podem se originar espontaneamente devido à deficiência do sistema de reparo do indivíduo, ou serem ocasionadas por fatores externos como exposição a produtos químicos, a agentes físicos ou a agentes biológicos (Rhodus et al., 2014). Essas mutações modificam a funcionalidade de proto-oncogenes e genes supressores de tumor ocasionando o subsequente descontrole das vias de sinalização que ativam a proliferação e sobrevivência celular e a redução do mecanismo de apoptose (Santosh et al., 2016; Ali et al., 2017).

Desta forma, o carcinoma espinocelular oral é uma doença complexa cuja etiologia abrange múltiplos fatores que são oriundos do estilo de vida do paciente, dos componentes ambientais, da infecção por agentes biológicos, da exposição ocupacional e da composição genética do indivíduo (Kumar et al., 2016). Dentre todos os fatores já descritos e associados ao CECO, o tabaco e o abuso no consumo do álcool são os principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença (Leemans et al., 2018). Pelo menos 80% dos casos de CECO são atribuídos à exposição do tabaco (Bose et al.,

2013), além de se observar efeito sinérgico no aumento do risco dessa neoplasia quando o consumo de tabaco e álcool tornam-se hábitos concomitantes (Rivera, 2015).

O tabaco é a planta da espécie *Nicotiana tabacum*, a qual apresenta, em sua composição, mais de 4.700 substâncias químicas (Taylaro e Fahs, 2015) e é encontrada em todo o mundo sendo consumida de diferentes formas incluindo a mascagem das folhas, a inalação, ou o fumo na forma de cigarros, charutos e cachimbos (D'souza e Addepalli, 2018; Tomar et al., 2019). Dentre estes tipos, a maneira mais comum de consumo do tabaco é pelo uso de cigarro cuja combustão resulta na formação das fases gasosa e particulada, as quais apresentam, de maneira geral, composições químicas distintas, uma vez que o cigarro é um produto caracterizado por ser uma mistura de compostos químicos, totalizando 7.000 substâncias, dentre as quais já foram identificados 69 carcinógenos. Além disso, durante a combustão do cigarro, há a formação de outros componentes tóxicos que são oxidantes como o óxido nítrico (*nitric oxide* - NO) e seus derivados, as hidroquinonas, e as espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species* - U.S. Department of Health and Human Services, 2010; Sardaro et al., 2019).

Em relação aos carcinógenos, o cigarro apresenta diferentes classes desses compostos, em que as principais, em humanos, são as nitrosaminas, as aminas aromáticas e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). As nitrosaminas são caracterizadas pelo grupo nitroso aderido ao átomo de nitrogênio da função amina. Na composição do tabaco, há a presença de aminas voláteis e não voláteis, ou seja, esta classe química é encontrada tanto na fase gasosa quanto na fase particulada do cigarro (U.S. Department of Health and Human Services, 2010). As aminas aromáticas são compostos ubíquos no ambiente que, além do tabaco, são amplamente empregadas na

indústria de tinturas, sendo consideradas a maior classe de carcinógenos em humanos (Wang et al., 2019). Estruturalmente, são compostas de um grupamento amina aderido ao anel carbocíclico ou heterocíclico (Freeman, 2013). Já os HAPs são compostos orgânicos constituídos de dois ou mais anéis aromáticos homocíclicos, os quais são formados a partir da combustão incompleta da matéria orgânica como madeira, tabaco, petróleo, o que os tornam amplamente presentes no ambiente. Essa classe de carcinógenos abrange grande quantidade de compostos químicos, sendo que no cigarro já foram identificados pelo menos 539 HAPs distintos, os quais encontram-se na fase particulada do cigarro, em que o benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) é o tipo mais conhecido e estudado entre os HAPs, sendo considerado o carcinógeno mais potente dentre os demais presentes no cigarro (*U.S. Department of Health and Human Services*, 2010).

Assim, tem sido estabelecido e amplamente aceito a associação entre o uso de cigarros com o desenvolvimento de diferentes doenças, dentre as quais se pode citar doenças cardiovasculares (Paffenbarger et al., 1986; Ambrose e Barua, 2004), doenças neurodegenerativas (Durazzo et al., 2014; Rosso e Chitnis, 2020), enfisema pulmonar, asma, doença pulmonar crônica (Yalcin e la Monte, 2016), além de diferentes tipos de câncer como o de pulmão, de laringe, de esôfago, de estômago, de pâncreas, de bexiga urinária e também o de cavidade oral (Tomar et al., 2019). Em relação ao CECO, reporta-se que fumantes apresentam 10 vezes mais chances de desenvolverem este tipo neoplásico em relação aos indivíduos não fumantes (Bose et al., 2013). Outrossim, segundo a Organização Mundial da Saúde, o uso de cigarro está relacionado com aproximadamente sete milhões de mortes mundiais por ano e a maior fração desses óbitos foram registrados em países em desenvolvimento (*World Health Organization*, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>).

Tais associações devem-se ao fato de que a exposição persistente aos compostos tóxicos do cigarro resulta na promoção do estresse oxidativo, em que há o desbalanço na relação dos níveis de compostos antioxidantes e compostos oxidantes com o consequente favorecimento deste grupo de compostos (Choudhari et al., 2014). Esses compostos oxidantes são caracterizados por apresentarem alta reatividade e seu acúmulo intracelular favorece sua reação com as macromoléculas, ou seja, lipídeos, lipoproteínas de baixa densidade, proteínas e ácidos nucleicos causando a desestabilização ou danificação desses componentes celulares, o que pode incitar efeitos citotóxicos, por meio da promoção de respostas inflamatórias, que podem ocasionar a disfunção celular e acionar mecanismos apoptóticos (Sardaro et al., 2019). Relata-se a detecção recorrente de focos inflamatórios na mucosa oral de pacientes acometidos por CECO (Rivera, 2015) e que a intensa atividade inflamatória está relacionada com a deterioração do tecido das gengivas e a retração do tecido ósseo adjacente (Sardaro et al., 2019).

Além dos efeitos citotóxicos, os oxidantes do cigarro também ocasionam efeitos genotóxicos incluindo a formação de micronúcleos, principalmente em linfócitos periféricos, troca de cromátides irmãs, alterações genômicas aberrantes, quebra das fitas de DNA (*U.S. Department of Health and Human Services*, 2010). A reação de ROS com ácidos nucleicos pode ocasionar mutações genéticas que, se mantidas na sequência de DNA, podem levar ao mau funcionamento celular e ativar desreguladamente funções proliferativas culminando no desencadeamento do processo carcinogênico (*U.S. Department of Health and Human Services*, 2010). ROS também pode atuar na etapa de promoção tumoral, uma vez que apresenta capacidade de ativar a expressão de genes relacionados à proliferação celular e inibir a expressão dos genes envolvidos no processo de apoptose, além de induzir vias de sinalizações intracelulares que ocasionam

a proliferação e sobrevivência das células, como as vias de ERK/MEC e de PI3K/AKT/mTOR (Choudhari et al., 2014). Na progressão tumoral, ROS contribui para a formação de novas mutações genéticas, aumento da produção de metaloproteinases de matriz extracelular, ativação da angiogênese e danificação de tecidos adjacentes (Choudhari et al., 2014).

Os compostos químicos pertencentes às classes dos HAPs, nitrosaminas e aminas são considerados pré-carcinógenos (Rivera, 2015), uma vez que necessitam ser submetidos a processos metabólicos que originam produtos eletrofílicos, geralmente epóxidos, os quais também apresentam alta afinidade por macromoléculas celulares. A ligação covalente entre o epóxido com o DNA leva à formação do aduto, molécula-chave no processo de carcinogênese, uma vez que a persistência de aduto de DNA contribui para a inserção errônea de bases nitrogenadas durante a replicação do material genético da célula e, desta forma, promover a ocorrência de mutações (*U.S. Department of Health and Human Services*, 2010). Análises dos efeitos genotóxicos ocasionados pelo uso do cigarro mostraram correlação entre os adutos de DNA com mutações genéticas específicas, como é o caso da mutação do tipo transversão CG → TA, que deriva da formação do aduto O⁶-metilguanina. As investigações identificaram que as regiões genômicas que apresentam este aduto são as mesmas regiões expostas aos epóxidos derivados dos HAPs; e que a mutação CG → TA foi identificada em alta frequência em amostras de câncer de pulmão, principalmente no gene *TP53* (*U.S. Department of Health and Human Services*, 2010). Além do desenvolvimento tumoral, os efeitos citotóxicos e genotóxicos do cigarro, oriundos de seus componentes oxidantes e carcinogênicos, também ocasionam a progressão tumoral, em que o uso contínuo do cigarro está relacionado às altas taxas de recorrência do carcinoma espinocelular oral

(Kim e Li, 2019) e que a exposição ininterrupta da mucosa estratificada, ao cigarro, propiciará a formação de segundo tumores primários (van der Waal e de Bree, 2010).

As bebidas alcoólicas são originadas a partir da fermentação de carboidratos contidos nas frutas ou do amido que compõe os grãos ou, ainda, da destilação de produtos fermentados (Reidy et al., 2011). Devido suas propriedades químicas, o álcool é considerado solvente de carcinógenos facilitando a entrada de tais compostos, principalmente produtos carcinogênicos derivados do cigarro, para o meio intracelular (Reidy et al., 2011; Pflaum et al., 2016). Além disso, o consumo ininterrupto do álcool pode promover a atrofia do epitélio e a depressão do sistema imune (Rivera, 2015). Outrossim, a metabolização oxidativa do álcool, processo catalisado pela enzima álcool desidrogenase (Reidy et al., 2011), produz o acetaldeído que é um composto carcinogênico capaz de se ligar covalentemente com o DNA (IARC, 2007) e interferir nos processos de replicação e reparo dessa molécula (Reidy et al., 2011) aumentando, desta forma, a susceptibilidade do desenvolvimento tumoral. O consumo do álcool *per se* pode aumentar em duas vezes o risco de CECO (Conway et al., 2018), sua contribuição na carcinogênese oral está altamente associada ao consumo de cigarro (El-Bayoumy et al., 2017).

Apesar do uso de cigarro e abuso na ingestão do álcool serem considerados os fatores de risco clássicos do CECO, há uma fração dos indivíduos expostos a essas substâncias que não desenvolvem a doença, o que indica a existência de outros fatores que modulam o risco do desenvolvimento tumoral (Hirvonen, 1995). Entre os demais fatores de risco para o CECO, incluem-se os hábitos alimentares do indivíduo, em que o grupo de trabalho da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC – *International Agency for Research on Cancer*) tem afirmado que dietas deficientes em

frutas e legumes e abundantes em carnes vermelhas e alimentos processados promovem o aumento do risco tumoral (IARC, 2003). Kumar e colaboradores (2017) demonstraram a presença de diferentes componentes antioxidantes não enzimáticos na constituição de frutas e legumes como as vitaminas A, C e E, o β -caroteno, o retinol, o potássio, o que diminuiria o risco do desenvolvimento de CECO. Além disso, a má higiene bucal e uma condição dentária ruim apresentam evidências de contribuírem para o desenvolvimento neoplásico, quando associados com algum fator de risco adicional (Kumar et al., 2017).

Infecções por micro-organismos também têm sido associadas ao desenvolvimento de CECO, dentre elas incluem-se infecções causadas pelo vírus Epstein-Barr e pela levedura *Candida albicans*, as quais podem contribuir para o estabelecimento de lesões potencialmente malignas na mucosa oral (Kumar et al., 2017). Além desses agentes biológicos, a infecção pelo papilomavirus humano (HPV), dos tipos de alto risco 16 e 18, tem sido estabelecida como um importante fator de risco no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço, principalmente para o carcinoma espinocelular de orofaringe, e parece estar associado à modificação da etiologia dessas neoplasias (Leemans et al., 2018). O genoma de HPV apresenta oncogenes codificadores das proteínas E6 e E7, as quais se ligam nos supressores tumorais da célula hospedeira, p53 e pRb, respectivamente, ocasionando a degradação de tais proteínas que participam, entre outros eventos, da regulação do ciclo celular. Desta forma, a infecção viral persistente promoverá lesões precursoras no epitélio infectado e contribuirá para a instabilidade genômica das células hospedeiras culminando no processo carcinogênico (Medrado, 2015; Leemans et al., 2018). Entretanto, o

desenvolvimento de CECO associado à infecção pelo HPV é pouco frequente e corresponde apenas a 3,9% dos casos (Leemans et al., 2018).

Os fatores genéticos têm se mostrado importantes determinantes no estabelecimento do tumor na cavidade oral. De fato, tem-se visto o aumento na exploração das investigações sobre as alterações genéticas associadas ao desenvolvimento do carcinoma espinocelular oral nas últimas décadas (D'Souza e Saranath, 2017), em que tais estudos mostraram que pacientes acometidos pela síndrome de Li-Fraumeni mostraram maior susceptibilidade à formação tumoral precoce (McBride et al., 2014) e a associação de tumores orais agressivos com a ocorrência da anemia de Fanconi em indivíduos jovens (Romick-Rosendale et al., 2013). Além disso, mutações somáticas têm sido reportadas e associadas à carcinogênese oral, o que inclui mutações pontuais, deleções, translocações, amplificações, perda de heterozigose (Sinevici e O'sullivan, 2016), alterações estas que foram identificadas em genes relacionados ao controle do ciclo celular, ao reparo de DNA, às vias de proliferação celular e apoptose e à adesão celular (D'Souza e Saranath, 2017).

Dentre os diferentes genes envolvidos, há destaque para *TP53*, gene codificador da proteína p53 que participa do controle do ciclo celular, da mediação do reparo de DNA e até a indução da apoptose (Liu et al., 2019). O gene *TP53* apresenta mutações somáticas em torno de 70% dos pacientes acometidos por CECO (D'Souza e Saranath, 2017), alterações genéticas que resultam na perda de função da proteína p53 (Braakhuis et al., 2003). Além disso, *TP53* está localizado no cromossomo 17p13, *locus* frequentemente acometido pela perda de heterozigose, ou seja, perda do alelo contendo o gene selvagem e permanência do alelo que apresenta o gene com mutação. Desta

forma, as inativações de *TP53* se mostram presentes em 80% dos casos de CECO (Leemans et al., 2018) e parecem ser as primeiras modificações genéticas associadas ao desenvolvimento desta neoplasia, além de também contribuírem para a progressão deste tipo tumoral (Braakhuis et al., 2003; Leemans et al., 2018).

Além de *TP53*, os cromossomos 3p e 9p são frequentemente acometidos pela perda de heterozigose e nestes *loci* estão localizados genes que participam da regulação do ciclo celular, como o gene *CDKN2A* que se localiza no cromossomo 9p21 e codifica a proteína reguladora p16 (Leemans et al., 2018). Alterações em genes relacionados com vias de sinalização celulares também são comumente observadas nos casos de CECO, como por exemplo, mutações somáticas em *HRAS*, as quais são detectadas em torno de 33% a 55% e resultam na ativação constitutiva da expressão gênica promovendo a subsequente ativação de vias de proliferação celular (D'Souza e Saranath, 2017). Em relação à sinalização, também se inclui a amplificação de *EGFR* e mutações de *PI3KCA* (D'Souza e Saranath, 2017; Leemans et al., 2018).

O carcinoma espinocelular oral tem se mostrado altamente heterogêneo e seu processo não foi totalmente elucidado, sendo que outras alterações genéticas têm sido investigadas como os estudos das alterações do número de cópias genômicas, as quais se mostram contribuintes do mecanismo de carcinogênese, uma vez que vêm sendo detectadas amplamente em diferentes tipos tumorais, inclusive em amostras de CECO. Tais amostras apresentaram alteração no número de cópias de 30 genes, os quais são codificadores de proteínas envolvidas em diferentes vias de sinalização celular (Ali et al., 2017). Além disso, também se tem proposto que a alteração do número de cópias dos genes está envolvida com a progressão tumoral, uma vez que a análise genética de amostras de CECO indicou maior susceptibilidade da ocorrência de metástases quando

os tumores primários apresentam número de cópias alterados em genes relacionados com este evento (Yoshioka et al., 2013). A maior proporção dessas alterações é originada pela ocorrência de deleções ou duplicações, as quais são denominadas de variabilidade do número de cópias (Ali et al., 2017).

1.4 Variabilidade do número de cópias

As metodologias moleculares de alta resolução mais recentes permitiram o descobrimento da variabilidade do número de cópias (*copy number variation* – CNV – Zhang et al., 2009; Arlt et al., 2012; Mikhail, 2014; Aouiche, 2018) em regiões genômicas quando comparadas a um genoma referência (Zhang et al., 2009; Almal e Padh, 2012; Watson et al., 2014; Gamazon e Stranger, 2015; Aouiche, 2018). Assim, o CNV é uma alteração genética de escala intermediária que abrange segmentos de DNA que apresentam mais de um quilobase a megabases de comprimento, ou até mesmo envolver um cromossomo inteiro (He et al., 2011; Almal e Padh, 2012; Mikhail, 2014; Zarrei et al., 2015; Aouiche et al., 2018). As investigações mostram que as variações do número de cópias são caracterizadas, principalmente, por deleções ou duplicações do fragmento genômico (Conrad et al., 2010; He et al., 2011; Arlt et al., 2012; Haraksingh e Snyder, 2013; Aouiche et al., 2018), mas também podem se estabelecer pela ocorrência de duplicações segmentadas, inserções, inversões e translocações (He et al., 2011; Almal e Padh, 2012; Haraksingh e Snyder, 2013), eventos esses que ocasionam a modificação da sequência nucleotídica e também contribuem para a alteração estrutural do genoma, uma vez que o CNV é detectado tanto em regiões gênicas quanto em regiões não codificadoras (Haraksingh e Snyder, 2013; Aouiche et al., 2018), o que altera a dosagem gênica, interrompe a sequência do gene, ou modifica regiões

regulatórias com a consequente alteração dos níveis transcricionais (Zhang et al., 2009; Almal e Padh, 2012; Haraksingh e Syder, 2013; Aouiche et al., 2018).

O CNV tem ganhado destaque entre os pesquisadores, uma vez que a variabilidade do número de cópias se mostra amplamente distribuída ao longo do genoma humano (Zhang et al., 2009; He et al., 2011; Arlt et al., 2012; Mikhail, 2014; Aouiche et al., 2018) apresentando maior predominância do que os polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs) já catalogados (Zarrei et al., 2015; Aouiche et al., 2018), o que tem permitido propor que o CNV seja uma importante fonte de variabilidade genética entre as populações (Almal e Padh, 2012; Aouiche et al., 2018). A variação do número de cópias pode ser tanto herdada dos parentais dos indivíduos quanto ocorrer *de novo*, ou seja, espontaneamente ao longo da vida do indivíduo (Almal e Padh, 2012; Aouiche et al., 2018), sendo a origem relacionada pela presença de *loci* de pontos de quebra do DNA (Mikhail, 2014), os quais caracterizam dois grupos de CNVs distintos (Arlt et al., 2012; Mikhail, 2014). Um dos grupos é denominado de CNVs recorrentes que apresentam tamanhos similares e são originados de um grupo de pontos de quebra comum que geralmente se apresentam em *clusters* (Mikhail, 2014). Esta classe inclui tanto os CNVs comumente conhecidos como polimórficos, uma vez que apresentam frequência populacional >1%, quanto os CNVs *de novo* (Arlt et al., 2012).

A formação de CNVs recorrentes está relacionada com mecanismos de recombinação, sendo a recombinação homóloga não-alélica (*nonallelic homologous recombination* – NAHR – Zhang et al., 2009; Mikhail, 2014) o principal processo de origem dessa classe de CNVs (Mikhail, 2014). Este é um processo que pode ocorrer durante os eventos de replicação celular, a meiose e a mitose, em regiões do genoma

compostas de elementos de repetições como *low-copy repeats* (LCRs) e *segmental duplications* (SDs), os quais compartilham homologia de 95%-97% entre si e flanqueiam regiões genômicas de aproximadamente 10 kb de comprimento (Zhang et al., 2009). Assim, a origem do CNV é proveniente da formação de *crossing-over* desigual entre os LCRs ou SDs, em que estando presentes no mesmo cromossomo e no mesmo sentido, resultará em deleções ou duplicações da região flanqueada, já a presença de tais elementos de repetições em sentido inverso resulta na inversão do fragmento (Zhang et al., 2009; Arlt et al., 2012; Mikhail, 2014). Por outro lado, quando ocorre o *crossing-over* entre cromossomos diferentes, há a geração de translocações cromossômicas (Zhang et al., 2009; Mikhail, 2014).

O outro grande grupo denomina-se CNVs não-recorrentes, classe que é composta por segmentos de número de cópias de tamanhos distintos originados por pontos de quebras diferenciados e que sobrepõem regiões gênicas (Mikhail, 2014). Tais pontos de quebra não são caracterizados por duplicações segmentares, mas por regiões de microhomologia de fim abrupto ou de inserções pequenas em quebras de junções. Esta classe é constituída por CNVs únicos, em maior frequência, mas alguns destes também podem se sobrepor a outras regiões (Arlt et al., 2012; Mikhail, 2014). De maneira prática, a diferenciação do número de cópias apresenta-se como deleções ou duplicações em *tandem* ou, ainda, de estruturas mais complexas que compreendem inversões, segmentos interrompidos por sequências normais ou que apresentam regiões duplicadas e deletadas no mesmo fragmento (Arlt et al., 2012). Referente à formação dos CNVs não-recorrentes, há o envolvimento de mecanismos relacionados aos erros de replicação como *fork stalling and template switching* (FoSTeS – Zhang et al., 2009; Mikhail, 2014) que ocorre com a parada da forquilha de replicação em que a fita

atrasada desengata da forquilha original e anela a outra forquilha que se mostra próxima tridimensionalmente através da presença de microhomologia presente na região 3'. A troca para uma forquilha de replicação que se mantém *downstream*, resulta na deleção do fragmento, enquanto que a troca para uma forquilha a *upstream* gera a duplicação dos segmentos (Zhang et al., 2009; Mikhail, 2014). Este mecanismo pode ocorrer repetidas vezes e contribuir para a formação de rearranjos genômicos complexos (Mikhail, 2014). Outro mecanismo de formação dos CNVs não-recorrentes abrange processos de reparo da quebra de DNA como *nonhomologous end-joining* (NHEJ), o qual ocorre principalmente para reparar a quebra da dupla fita de DNA que foi ocasionada pela exposição à radiação ionizante e às espécies reativas de oxigênio. Tal mecanismo propicia uma “cicatriz molecular” caracterizada pela perda ou adição de nucleotídeos no ponto de junção das fitas de DNA (Zhang et al., 2019; Mikhail, 2014).

Diante da complexidade da formação de CNVs, seu estabelecimento não se limita a modificação de uma região genômica exclusiva, podendo corresponder a um gene ou região reguladora, mas também pode afetar uma fração da sequência genômica como, por exemplo, a correspondente a um éxon, ou abranger regiões compostas por múltiplos genes (Zhang et al., 2009; Almal e Padh, 2012). Além disso, a alteração do número de cópias é capaz de ocasionar a disruptura da sequência de genes. Portanto, o CNV é capaz de alterar a dosagem do padrão da expressão gênica, evento que contribui para os diferentes fenótipos atribuídos à variabilidade do número de cópias (Zhang et al., 2009; Almal e Padh, 2012; Haraksingh e Syder, 2013; Aouiche et al., 2018). Tais fenótipos podem conferir aos indivíduos adaptações ambientais, afetando genes relacionados com percepções sensoriais e interação ao meio ambiente (Haraksingh e Snyder, 2013), sendo denominados de CNVs benignos quando propiciam este tipo

fenotípico (Zhang et al., 2009; Almal e Padh, 2012; Haraksingh e Snyder, 2013; Mikhail, 2014). Um exemplo é a presença de múltiplas cópias do gene *AMY1*, codificador da enzima amilase, em populações cuja dieta é rica em amido (Haraksingh e Snyder, 2013). Entretanto, há CNVs considerados patogênicos, por serem associados ao desenvolvimento de diferentes classes de doenças (Zhang et al., 2009; Almal e Padh, 2012; Haraksingh e Snyder, 2013; Mikhail, 2014) e também há CNVs que foram identificados nas investigações genéticas, mas seus fenótipos ainda são desconhecidos, os quais são denominados de CNVs VOUS (*variants of uncertain significance* – Mikhail, 2014).

Dentre esses três tipos de classificações, muitos esforços vêm sendo empregados nas investigações e nos estudos sobre os CNVs patogênicos, os quais estão sendo associados ao desenvolvimento, à susceptibilidade e à severidade de doenças infecciosas, autoimunes, neurológicas e doenças complexas (He et al., 2011; Arlt et al., 2012; Aouiche et al., 2018), uma vez que há frequente detecção da alteração do número de cópias de genes envolvidos na resposta imune e na sinalização intracelular (Aouiche et al., 2018). Assim, desde as primeiras descrições da existência da variabilidade do número de cópias no genoma, o desenvolvimento de disfunções neurológicas foram umas das primeiras doenças a serem relacionadas à ocorrência dos CNVs, disfunções estas que abrangem a doença de Parkinson e o mal de Alzheimer, a Schizophrenia, o transtorno do espectro autista (Almal e Padh, 2012), doenças que podem se desenvolver pela presença de variação do número de cópias em genes específicos ou múltiplos genes (Almal e Padh, 2012).

Há registros de CNVs que conferem aumento da susceptibilidade de uma ampla gama de doenças como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a doença de

Crohn, disfunções cardiovasculares (taquicardia ventricular, cardiomiopatia hipertrófica), diabetes tipo 2 e obesidade (Almal e Padh, 2012; Aouiche et al., 2018). Destaca-se, ainda, a participação de CNVs no processo de carcinogênese, dados que se mostram potenciais preditores do prognóstico e auxiliares para a melhor escolha terapêutica a ser empregada ao paciente (Aouiche et al., 2018). As identificações de CNVs mostraram que tais alterações genéticas também favorecem a ativação de oncogenes e a inibição de genes supressores de tumor (Aouiche et al., 2018), o que permite a associação da alteração do número de cópias com o desenvolvimento de tumores de pulmão de pequenas células, de próstata, de cólon (Aouiche et al., 2018), de mama (Almal e Padh, 2012), além de sua contribuição para a ocorrência de metástases em pacientes acometidos pelo câncer de próstata (Aouiche et al., 2018).

Além desses tipos tumorais, destaca-se dados genômicos que reportaram a presença da variabilidade do número de cópias em células tumorais provenientes do carcinoma espinocelular oral (Aouiche et al., 2018). Dentre os resultados, Aouiche e colaboradores (2018) descreveram a detecção de CNV em genes que frequentemente apresentam mutações durante o processo de carcinogênese oral como duplicações nos oncogenes *PIK3CA*, *FGFR1* e deleções nos genes supressores de tumor *TP53*, *PTEN*, *RBI* e *SMAD4* (Aouiche et al., 2018). Os resultados também revelaram alterações no número de cópias em regiões mais abrangentes como deleções nos cromossomos 3p, 8p, 9p e 18q ou duplicações em 3p, 5p, 7p, 8q, 11q e 20q (Aouiche et al., 2018). Os dados dos estudos mostraram que a participação do CNV não se limita ao desenvolvimento de CECO, mas que os tumores orais primários progridem a tumores metastáticos quando adquirem variação do número de cópias em regiões genômicas apropriadas (Ali et al., 2017).

A observação de tais dados permite intuir que a alteração do número de cópias está permitindo ampliar o entendimento da carcinogênese dos carcinomas espinocelulares orais, os quais se mostram amplamente heterogêneos com nível elevado de mutações genéticas, apesar de se originarem no mesmo tipo epitelial (Leemans et al., 2018). Assim, o maior conhecimento do desenvolvimento do câncer oral propiciará a precisão na realização da predição, do prognóstico e do tratamento da doença, o que torna viável a investigação do CNV dos genes *GSTM1* e *GSTT1* que codificam enzimas participantes do processo de detoxificação celular de compostos endógenos e diferentes xenobióticos (Hayes, 2005; McIlwain et al., 2006).

1.4.1 Variabilidade do número de cópias de GSTM1 e de GSTT1

O gene *GSTM1* localiza-se no cromossomo 1p13.3 (Rebeck et al., 1997) e faz parte de um *cluster* de cinco genes pertencentes a mesma família, a saber, *GSTM1-5* (McLellan et al., 1997). Já o gene *GSTT1* está localizado no cromossomo 22q11.2 (Rebeck et al., 1997) sendo seguido por outro gene da mesma família, *GSTT2* (Stranger et al., 2000). Os estudos iniciais promoveram extensa exploração desses genes devido à identificação de alelos nulos (*GSTM1*0* e *GSTT1*0*) que resultam na deleção completa dos genes, em genótipos homozigotos, em que tal efeito deletério corresponde à ausência das respectivas proteínas (Gattás et al., 2004; McIlwain et al., 2006; Massod et al., 2013; Silva et al., 2014). Essa alteração genética foi assim definida devido à limitação metodológica que permitia apenas a detecção da presença e da ausência dos genes avaliados, em que os estudos foram capazes de identificar frequências da deleção gênica diferentemente distribuídas entre grupos étnicos bem definidos (Gattás et al., 2004), em que as frequências do genótipo nulo de *GSTM1* se mostram similares entre as populações caucasianas (53%) e asiáticas (30% - 52%), enquanto que se mostram

reduzidas entre as populações africanas subsaarianas (21% a 43%). Já em relação a *GSTT1*, os dados registraram que o genótipo nulo desse gene é detectado de 18% a 48% entre os asiáticos, em 26% a 47% dos africanos subsaarianos e em 20% dos caucasianos (Kasthurinaidu et al., 2015).

Além da frequência dos genótipos nulos, a análise da presença/ausência de *GSTM1* e de *GSTT1* também foi empregada em investigações sobre a susceptibilidade de diferentes doenças como asma (Li et al., 2013), diabetes *mellitus* (Zhang et al., 2013a; Nath et al., 2019), doenças arteriais e coronarianas (Zhou et al., 2014; Grubisa et al., 2018; Su et al., 2020), hipertensão (Ge et al., 2015) e diferentes tipos tumorais (Sampaio et al., 2009). Dentre os resultados, foi demonstrada que os genótipos nulos de *GSTM1* e de *GSTT1* foram associados, de forma individual, ou em combinação entre si, com o aumento do risco de diabetes *mellitus* (Zhang et al., 2013; Nath et al., 2019) e de distúrbios arteriais (Grubisa et al., 2018). Em relação às neoplasias, as deleções completas dos genes foram associadas ao risco de desenvolvimento do câncer de bexiga (Hung et al., 2004), do câncer hepático (Dong et al., 2012), do câncer de pulmão (Sharma et al., 2014) e da leucemia mieloide crônica (Muddathir et al., 2019), ressaltando sua participação no aumento da susceptibilidade dos carcinomas espinocelulares que acometem a região da cabeça e pescoço (Russo et al., 2013; Senthilkumar e Thirumurugan, 2014), especialmente CECO (Sato et al., 1999; Nomura et al., 2000; Buch et al., 2002; Sharma et al., 2006).

Os genótipos nulos de *GSTM1* e de *GSTT1* apresentaram associação no aumento do risco de CECO, em três vezes, em um estudo caso-controle da doença conduzido por Zakiullah e colaboradores (2015) na população paquistanesa. Esta associação também foi observada e reportada na população brasileira (Drummond et al., 2004; Drummond

et al., 2005), em que dentre as investigações, incluem-se estudos anteriores de nosso grupo que demonstraram que a deleção completa de *GSTM1* está relacionada com o aumento do risco de CECO em populações caso-controle da doença com consumo contínuo do uso de cigarros e consumo de álcool (Gattás et al., 2006; Curioni et al., 2013). Além do risco de desenvolvimento de CECO, as deleções gênicas também foram investigadas em relação à progressão da doença, em que o estudo caso-controle conduzido por Liu e colaboradores (2005) na população taiwanesa mostrou que tanto a deleção completa de *GSTM1* quanto a ausência conjunta de *GSTM1* e *GSTT1* foram associadas à ocorrência de metástases linfonodais (Liu et al., 2005), mas estes estudos são menos numerosos em relação àqueles sobre a carcinogênese oral.

Entretanto, a literatura também contém inúmeros estudos com resultados controversos sobre a relação dos genótipos nulos desses genes com o aumento da susceptibilidade das doenças (Wang et al., 2006; Pinhel et al., 2008; Datta et al., 2010; Ghosh et al., 2012), o que se estende às análises realizadas a respeito do câncer oral (Deakin et al., 1996; Tanimoto et al., 1999; Gronau et al., 2003; Saravani et al., 2019). Tais resultados podem estar relacionados com o modo das análises, ou seja, considerando-se apenas a presença e a ausência dos genes, o que poderia subestimar o papel individual de cada cópia gênica na predisposição patológica (Hayes. 2005).

Em 2004, uma nova técnica foi desenvolvida capaz de distinguir cada cópia dos genes *GSTM1* e de *GSTT1* (Brasch-Andersen et al., 2004) e, assim, reconheceu-se que tais genes apresentam, na verdade, variabilidade do número de cópias (He et al., 2011; Almal e Padh, 2012), em que as deleções ou as duplicações são resultado de um evento de *crossing-over* desigual entre duas regiões que compartilham alto grau de homologia entre si e que flanqueiam a sequência nucleotídica dos genes favorecendo a variação, de

pelo menos, zero a duas cópias de cada gene (McLellan et al., 1997; Sprenger et al., 2000). A nova metodologia tem sido empregada para investigação do CNV na susceptibilidade de algumas doenças, como o estudo de Nørskov e colaboradores (2011a) que avaliaram a possível contribuição do CNV de *GSTM1* e de *GSTT1* no risco de doenças vasculares isquêmicas. Este estudo foi conduzido numa coorte dinamarquesa e não encontrou resultados estatisticamente significativos. Por outro lado, o risco do câncer endometrial foi correlacionado com duas ou mais cópias de *GSTT1* (OR 1,51; IC 95% 1,04-2,19), investigação que foi realizada numa coorte selecionada na cidade de Boston (EUA – Karageorgi et al., 2011).

Outrossim, Emeville e colaboradores (2014), em um estudo caso-controle do câncer de próstata cujos participantes eram indivíduos caribenhos afrodescendentes, reportaram que uma cópia de *GSTM1* foi associada com o aumento do risco tumoral (OR 1,37; IC 95% 1,04-1,82) e que o risco de desenvolvimento da doença aumentou proporcionalmente com o aumento do número de cópias de *GSTT1*, uma vez que duas cópias gênicas foram relacionadas ao risco de 1,55 vezes (OR 1,55; IC 95% 1,11-2,16) e três e quatro cópias aumentaram o risco da neoplasia em quase cinco vezes (OR 4,89; IC 95% 1,71-13,99). As investigações do CNV de *GSTM1* e de *GSTT1* vêm crescendo entre os pesquisadores, mas até o presente momento parece que tais modificações genéticas ainda não foram estudadas em relação ao carcinoma espinocelular oral e sua progressão, o que se mostra plausível, uma vez que as proteínas codificadas por *GSTM1* e *GSTT1* fazem parte da superfamília das Glutathionas S-Transferases (GSTs) que é bem conhecida por sua função na proteção e manutenção da homeostase celular.

1.5 *Glutathione S-Transferases (GSTs)*

A detoxificação celular é um importante mecanismo de defesa das células e dos tecidos contra agentes nocivos endógenos e exógenos (Rushmore e Kong, 2002; Xu et al., 2005; McIlwain e Tew, 2006). Uma vez presentes no ambiente intracelular, tais agentes são capazes de interferir, direta ou indiretamente, em diferentes processos celulares como as vias de sinalização que estimulam respostas fisiológicas de diferenciação, proliferação, apoptose e necrose (Rushmore e Kong, 2002). A fim de prevenir ou neutralizar seus efeitos tóxicos, os compostos nocivos são detoxificados garantindo, desta forma, a manutenção da homeostase celular e o bom funcionamento do organismo (Rushmore e Kong, 2002; Xu et al., 2005).

O mecanismo de detoxificação faz parte do processo de biotransformação celular que é desempenhado pela ação das enzimas metabolizadoras de drogas, as quais apresentam elevados níveis protéicos tanto nos estados metabólicos basal e ativo das células (Rushmore e Kong, 2002; Xu et al., 2005). Essas enzimas distribuem-se entre as duas etapas do processo de biotransformação (Xu et al., 2005). A fase I é caracterizada pela transformação de um composto apolar em um ou mais metabólitos intermediários ativos, ou seja, tornam-se eletrofílicos por meio do ‘desmascaramento’ ou da formação de grupos funcionais específicos incluindo a hidroxila ($\cdot\text{OH}$), grupamentos aminas ($\cdot\text{NH}_2$) e o grupo tiol ($\cdot\text{SH}$) (Jancova et al., 2010). Tais compostos são gerados a partir das reações de N- e O-dealquilação, hidroxilação alifática ou aromática, N- e S-oxidação ou deaminação (Jancova et al., 2010). As principais enzimas que realizam a catálise das reações da fase I pertencem à família proteica do Citocromo P450 (CYPs - Rushmore e Kong, 2002; Xu et al., 2005; Jancova et al., 2010) que compreende enzimas heme microsossomais que, além do metabolismo de compostos endógenos e exógenos,

também participam de diferentes processos biossintéticos (Rushmore e Kong, 2002; Jancova et al., 2010), sendo enzimas abundantes no fígado, trato gastrointestinal, pulmão e rins (Rushmore e Kong, 2002; Xu et al., 2005).

Os metabólitos intermediários eletrofílicos apresentam alta afinidade pelas macromoléculas intracelulares como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (Masood et al., 2014) e tal reação é capaz de modificar as estruturas celulares que são constituídas por essas moléculas e comprometer suas funções, gerando efeitos citotóxicos e genotóxicos (Hayes e Pulford, 1995; Hayes et al., 2005; Losi-Guembarovski et al., 2008). Entretanto, durante a fase II, tais compostos reativos são submetidas a reações de conjugação que formam produtos menos reativos e aumentam sua hidrofiliabilidade (Rushmore e Kong, 2002; Xu et al., 2005; Jancova et al., 2010), o que permite o favorecimento de sua excreção via bile e/ou urina, caracterizando, dessa forma, a detoxificação celular (Rushmore e Kong, 2002; Jancova et al., 2010). Assim, as reações de conjugação são do tipo glucoronidação, sulfonação, metilação, acetilação e conjugação à glutatona (Rushmore e Kong, 2002; Jancova et al., 2010) que, diferentemente da fase I, são catalisadas por diferentes famílias enzimáticas, entre as quais estão incluídas UDP-glucuronosiltransferases (UGTs), Sulfotransferases (SULTs), Metiltransferases, N-acetil transferases (NATs), Glutatonas S-Transferases (GSTs), NAD(P)H:quinona oxirredutases (NQOs) e Epóxido hidrolases (EPHs - Xu et al., 2005; Jancova et al., 2010).

Entre essas famílias proteicas, as GSTs são consideradas uma das mais importantes enzimas do mecanismo de detoxificação, protegendo a célula contra os efeitos perniciosos de uma vasta gama de compostos eletrofílicos provenientes tanto do metabolismo celular quanto do ambiente externo (Arand et al., 1996; Bruhn et al., 1998;

Gattás et al., 2004; Hayes et al., 2005; Sampaio et al., 2009; Jancova et al., 2010; Schnekenburger et al., 2014), o que inclui carcinógenos presentes no tabaco, no ar, nos alimentos, nos fármacos, as espécies reativas de oxigênio provenientes do estresse oxidativo e nos pesticidas (Boyer, 1989; Hayes e Pulford, 1995; Hayes et al., 2005). Assim, os compostos reativos são caracterizados pela presença de algum átomo de carbono, nitrogênio ou enxofre que são eletrofílicos e as GSTs catalisam o ataque nucleofílico de tais compostos apolares ao tripeptídeo γ -glutamil-cistênil-glicina (glutathione – GSH - Schnekenburger et al., 2014) formando conjugados de tioéter entre as duas moléculas que é um produto mais estável e hidrossolúvel (Jancova et al., 2010; Board e Menon, 2013; Schnekenburger et al., 2014).

As GSTs também participam de múltiplas reações dependentes da glutathione (Board e Menon, 2013) podendo-se citar a função de glutathione peroxidase que impede a formação de radicais livres a partir de hidroperóxidos orgânicos (McIlwain e Tew, 2006) e a função de glutathionilase que é definida como a formação de pontes dissulfeto entre a glutathione e os grupamentos tióis presentes nos resíduos protéicos, o que evita a oxidação desses grupamentos e a subsequente degradação proteossômica das proteínas atingidas pelo estresse oxidativo (Board e Menon, 2013). Desta forma, as GSTs atuam em estratégias celulares de defesa que são integradas à atividade de glutamato-cisteína ligases e glutathione sintases, as quais mantêm os níveis de GSH, e aos transportadores que realizam o efluxo dos metabólitos conjugados à glutathione (Hayes et al., 2005). Além disso, as GSTs apresentam importante papel nos sistemas biológicos (Board e Menon, 2013) participando do metabolismo de hormônios esteróides, da síntese de prostaglandinas e ácido aracdônico (Jancova et al., 2010) e algumas proteínas também desempenham o papel de canais intracelulares de cloreto (CLIC-5) e proteínas

gangliosídeo associado à indução de diferenciação (*GAPDI* e *GAPD-like 1* - Board e Menon, 2013).

Assim, devido a sua participação na catálise de diferentes reações como substituições nucleofílicas aromáticas, adições de Michael, isomerações e reduções de hidroperóxidos, além da conjugação com a glutatona (Jancova et al., 2010), as GSTs são proteínas ubíquas no organismo, ou seja, são encontradas nos tecidos e órgãos destacando-se fígado, rins, cérebro, pâncreas, testículos, coração, pulmão, intestino delgado, músculo esquelético, próstata, baço e mucosa da cavidade oral (Chen e Lin, 1997; Jancova et al., 2010; Singh, 2015). Entretanto, a expressão dos genes dessas enzimas é influenciada pela idade, pelo sexo e pela espécie do organismo (Singh, 2015), e que o aumento do nível proteico das GSTs está associado com a resistência aos agentes quimioterápicos e com a tolerância aos herbicidas e inseticidas (Hayes et al., 2005), uma vez que essa família proteica está presente na maior parte dos seres vivos sendo detectada desde bactérias até mamíferos, tendo-se proposto que as GSTs estão relacionadas com uma resposta celular evolutivamente conservada contra os danos oxidativos (Hayes et al., 2005).

A superfamília das GSTs é subdividida em diferentes classes protéicas, as quais estão distribuídas em três famílias distintas, de acordo com sua localização celular, a saber: GSTs citosólicas, mitocondriais e microssomais (Hayes et al., 2005; McIlwain e Tew, 2006; Singh, 2015), dentre as quais tanto as citosólicas quanto as mitocondriais são proteínas hidrossolúveis, mas pouco relacionadas entre si (Hayes et al., 2005; McIlwain e Tew, 2006) e ambas as famílias são estruturalmente distintas das GSTs microssomais (Hayes et al., 2005; Singh, 2015). Apesar da distinção de solubilidade e de estrutura, todas as GSTs apresentam atividade peroxidase independente de selênio

(Hayes et al., 2005; Jancova et al., 2010) e atividade de conjugação de compostos a glutathione (Singh, 2015). Dentre as inúmeras proteínas e suas funções apresentadas pelas GSTs, este estudo apresenta enfoque às enzimas citosólicas.

1.5.1 *Glutathione S-Transferases citosólicas*

As proteínas citosólicas representam a maior família entre as GSTs (Hayes et al., 2005) cujas enzimas são amplamente estudadas (Board e Menon, 2013) e apresentam, como função principal, a transferase do grupo tiol (Hayes et al., 2005), sendo as principais enzimas desta superfamília a promoverem o mecanismo de detoxificação celular de diferentes classes de xenobióticos incluindo carcinógenos, mas também são cruciais no processamento de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio derivados do estresse oxidativo (Board e Menon, 2013;). Os conjugados com a glutathione, que foram formados por estas enzimas, são excretados para fora da célula principalmente através de bombas de efluxos MRP1/2 que pertencem à subfamília C dos transportadores ABC (Hayes et al., 2005; Board e Menon, 2013). As GSTs citosólicas estão presentes em todos os reinos dos seres vivos (Board e Menon, 2013) e em humanos, essas enzimas são detectadas em todos os tecidos do organismo representando 10% do total de proteínas solúveis (Board e Menon, 2013). Apesar de estarem presentes ubiquamente, o padrão de expressão dos genes codificadores dessa família proteica apresenta diferenciação entre os tipos celulares e é modulado pelo sexo, pela idade e pela etapa de vida do indivíduo, uma vez que os níveis de expressão se modificam entre a vida fetal e a vida adulta (Singh, 2015).

Estruturalmente, as GSTs citosólicas também são configuradas pela formação de dímeros, estrutura necessária para a atividade catalítica das enzimas (Hayes et al., 2005; Board e Menon, 2013), uma vez que em monômeros de GSTs citosólicas que atuam

como canais transmembrânicos não se detectou atividade enzimática (Board e Menon, 2013). Cada monômero dessas enzimas possui em torno de 199 a 244 aminoácidos em sua sequência (Hayes et al., 2005), conferindo o peso molecular entre 25 a 30 kDa (Board e Menon, 2013). A análise da estrutura terciária das GSTs citosólicas indica que esta família protéica parece ter evoluído de uma proteína do tipo tiorredoxina/glutarredoxina, pois na região N-terminal da proteína há o domínio tiorredoxina de estrutura $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ (Hayes et al., 2005; Board e Menon, 2013). Já a região C-terminal apresenta um domínio helicoidal de origem não detectada (Board e Menon, 2013). Além da atividade catalítica, a estrutura proteica das GSTs citosólicas contém regiões capazes de realizarem ligações covalente e não-covalente a compostos hidrofóbicos como bilirrubina, grupo heme, hormônios tireoideanos e esteroides (Hayes et al., 2005). Essa propriedade conferiu a denominação inicial de Ligandinas às primeiras GSTs descobertas (Hayes et al., 2005).

O sítio ativo destas enzimas citosólicas é composto por duas regiões funcionais, em que uma delas é denominada de Sítio G, onde a glutathione liga-se à enzima e tal região é hidrofóbica e situa-se no domínio N-terminal da proteína (Board e Menon, 2013; Singh, 2015). Relata-se, ainda, que o Sítio G é altamente conservado entre as diferentes classes e famílias das GSTs e é esta região que modula a atividade catalítica das enzimas (Board e Menon, 2013; Singh, 2015). A outra região funcional é chamada de Sítio H devido à ligação dos diferentes substratos enzimáticos, o que também se mostra uma região hidrofóbica, mas presente no domínio C-terminal proteico (Board e Menon, 2013; Singh, 2015). Esta região apresenta menor conservação entre as classes de GSTs, o que determina a especificidade aos substratos (Board e Menon, 2013; Singh, 2015). Entretanto, a afinidade dos substratos é sobreposta entre as enzimas citosólicas

devido ao compartilhamento de homologia entre suas sequências de aminoácidos (Hayes et al., 2005; Board e Menon, 2013), uma vez que proteínas da mesma classe apresentam 40%-50% de homologia entre si, mas GSTs de classes distintas compartilham apenas entre 25%-30% (Hayes et al., 2005; Singh, 2015).

Muitas são as classes que compõem a família das GSTs citosólicas havendo distinção de sua presença entre os diferentes reinos de seres vivos, em que em bactérias, insetos e plantas são encontradas as classes β (beta), δ (delta), ϕ (phi) e τ (tau - Hayes et al., 2005; Chatterjee e Gupta, 2018). Mas em humanos, foram identificadas pelo menos sete classes, a saber: α (GSTA), θ (GSTT), π (GSTP), ω (GSTO), σ (GSTS), ζ (GSTZ) e μ (GSTM - Hayes et al., 2005; Jancova et al., 2010; Singh, 2015). Os genes codificadores das GSTs citosólicas são parálogos e distribuem-se ao longo do genoma humano, em que alguns deles se apresentam em *clusters*, os quais codificam enzimas da mesma classe, o que pode refletir os eventos ancestrais de duplicações gênicas (Board e Menon, 2013). As classes mais importantes são GSTAs, GSTMs, GSTTs e GSTP (Strange et al., 2001), havendo destaque para as enzimas GSTM1 e GSTT1, as quais têm sido intensamente investigadas.

1.5.2 *Glutathione S-Transferase μ 1 e Glutathione S-Transferase θ 1*

A Glutathione S-Transferase μ 1 (GSTM1) notoriamente pertence à classe das GSTMs que é composta por cinco isoenzimas (GSTM1-5 - Hayes et al., 2005; Board e Menon, 2013), enquanto que a Glutathione S-Transferase θ 1 (GSTT1) é a principal enzima constituinte da classe θ , a qual é constituída apenas por duas isoenzimas (Hayes et al., 2005; Board e Menon, 2013). GSTM1 está presente em diferentes tecidos do organismo e, diferentemente das demais GSTs, seu nível mantém-se elevado durante toda a vida do indivíduo (Singh, 2015), sendo relatada quantidade enzimática

predominante no fígado, nos testículos e no cérebro (Board e Menon, 2013; Singh, 2015). Em relação a GSTT1, elevados níveis enzimáticos foram encontrados no fígado e nos eritrócitos (Bruhn et al., 1998). Essas enzimas se destacaram devido à deleção de seus respectivos genes e também por apresentarem participação no processo de detoxificação, o que inclui a inativação de diferentes tipos de carcinógenos havendo destaque para os constituintes do cigarro (McIlwain e Tew, 2006) como o benzo[α]pireno (B[a]P) que é o principal tipo de HAP (Jancova et al., 2010) e um dos principais tipos de carcinógenos associados ao desenvolvimento de diferentes tipos tumorais em humanos (IARC, 2009). Durante o processo de biotransformação celular, B[a]P é metabolizado por enzimas CYPs que geram compostos eletrofílicos como o epóxido 4,5-B[a]P e o diol 7,8-B[a]P. Tais metabólitos podem se ligar covalentemente às macromoléculas celulares modificando suas estruturas e suas funções. Uma dessas moléculas é o DNA, em que a ligação aos eletrófilos pode levar à formação de adutos, estruturas que se não forem reparadas e se acumularem no genoma, propiciam a ocorrência de eventos mutacionais e carcinogênicos (Hayes et al., 2005; *U.S. Department of Health and Human Services*, 2010; El-Bayoumy et al., 2017). Entretanto, GSTM1 e GSTT1 catalisam a conjugação desses compostos a glutatona reduzida, formando substâncias menos reativas e mais hidrofílicas que são excretadas para fora da célula por ativação dos transportadores ABC (Hayes et al., 2005; *U.S. Department of Health and Human Services*, 2010; El-Bayoumy et al., 2017). Dentre outros substratos de GSTM1 e GSTT1 estão a acroleína, uma carbonila- α/β insaturada que também apresenta efeitos tóxicos, fármacos, quimioterápicos, espécies reativas de oxigênio (Olshan et al., 2000; Vineis et al., 2004; Hayes et al., 2005; McIlwain e Tew, 2006). Assim, a ausência dessas enzimas, devido à deleção completa de seus genes, tem se mostrado como fator que possivelmente torna ineficiente o processo de detoxificação, o

que contribui para o acúmulo de eletrófilos no ambiente intracelular ocasionando danos citotóxicos e genotóxicos (Hayes et al., 2005). Por outro lado, não se está estabelecido o fenótipo da variação do número de cópias dos genes *GSTM1* e *GSTT1* na atividade das respectivas enzimas, ou seja, se há diferença na taxa de detoxificação celular entre uma ou mais cópias gênicas.

Assim, a análise da presença/ausência de *GSTM1* e de *GSTT1* parece subestimar o papel biológico do CNV desses genes na associação do risco de patologias, incluindo o carcinoma espinocelular oral (CECO). Desta forma, a investigação da possível contribuição de cada número de cópias de *GSTM1* e de *GSTT1* para o desenvolvimento e a progressão de CECO se faz necessária, uma vez que tais dados são escassos na literatura e que as enzimas *GSTM1* e *GSTT1* participam ativamente na manutenção da homeostase celular por detoxificarem carcinógenos diversos, principalmente àqueles constituintes do cigarro, e espécies reativas de oxigênio, elementos esses que propiciam a ocorrência das três etapas da carcinogênese oral. Além disso, pesquisadores têm relatado que o CNV se mostra como um fator preditivo promissor no prognóstico de tumores e um auxiliador na escolha do tratamento antitumoral mais eficaz.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

O presente estudo teve por objetivo investigar a variabilidade do número de cópias de *GSTM1* e *GSTT1*, genes codificadores de enzimas participantes da detoxificação celular, em uma população caso-controle do carcinoma espinocelular oral oriunda do Hospital Heliópolis, São Paulo.

2.2 *Objetivos específicos*

Análise dos questionários dos participantes para avaliação de dados sociodemográficos, de educação e do consumo de cigarros e álcool, bem como suas associações com o CNV de *GSTM1* e *GSTT1*;

Análise dos prontuários dos pacientes com CECO para averiguação dos dados clínico-anatomopatológicos, progressão tumoral e desfecho do seguimento;

Determinar o CNV de *GSTM1* e *GSTT1* dos pacientes com carcinoma espinocelular oral e dos pacientes sem diagnósticos tumorais quaisquer que compuseram o grupo de controles;

Investigar a possível associação entre o CNV de *GSTM1* e *GSTT1* e o risco de desenvolvimento do carcinoma espinocelular oral;

Investigar se a variabilidade do número de cópias gênicas está associada à ocorrência de eventos secundários relacionados à progressão tumoral. Tais eventos considerados foram recorrências, segundo tumores primários e metástases à distância;

Analisar a sobrevida global e a sobrevida livre de progressão dos pacientes acometidos pelo tumor e sua possível relação com CNV de *GSTM1* e *GSTT1*.

3. MÉTODOS

3.1 Casuística

O presente estudo é do tipo observacional, sendo caso-controle de caráter retrospectivo e também de caráter prospectivo, em relação às análises relacionadas com o seguimento dos pacientes com diagnóstico tumoral. Além disso, este estudo faz parte de uma pesquisa de base hospitalar originada pela parceria estabelecida entre o Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis, sob coordenação do Professor Doutor Otávio Alberto Curioni, e o Laboratório de Genética e Biologia Molecular situado no Instituto Oscar Freire da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), que foi chefiado pela Professora Doutora Gilka Jorge Fígaro Gattás no momento do estabelecimento dessa parceria. O estudo completo intentou identificar marcadores genéticos polimórficos associados ao risco de desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço e ao desfecho clínico dos pacientes acometidos pela doença, com financiamentos de projetos regulares concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob os números: 2000/06042-7, 2003/07864-9 e 2014/16092-4.

Ao longo do período de 2000 a 2011, foram recrutados todos os pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna admitidos para atendimento no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis que apresentavam tumores na cavidade oral e eram moradores da região metropolitana da cidade de São Paulo. Definiu-se como critérios de inclusão no estudo, os pacientes com

idade igual ou superior a 18 anos, que fossem tanto do sexo masculino quanto do sexo feminino, com diagnóstico de carcinoma espinocelular oral histopatologicamente confirmado, enquanto que, para este estudo, foram desconsiderados pacientes acometidos por outros tipos de câncer oral ou que apresentavam diagnóstico de carcinoma espinocelular da orofaringe. Os prontuários dos pacientes foram acessados para obtenção de informação de dados clínicos, confirmação de exames anatomopatológicos (sítio da lesão, estadiamento, tipo tumoral) e progressão da doença (recorrência, segundo tumor primário, metástase à distância), tipo de tratamento empregado (cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia) e desfecho clínico do seguimento (vivo sem doença – VSD; vivo com doença – VCD; morto por causas não associadas à doença – MOAS; morto por causa da doença – MOCA). Destaca-se, ainda, que tais pacientes receberam seguimento médico durante os anos de 2000 a 2019.

No mesmo período, pacientes de diferentes enfermarias, internados ou em atendimento ambulatorial, do Hospital Heliópolis, foram recrutados para compor o grupo controle, os quais também eram moradores da região metropolitana da cidade de São Paulo. Incluiu-se no estudo pacientes que já haviam alcançado a maioridade civil, não apresentavam diagnósticos de quaisquer tipos de câncer e/ou cirrose hepática, insuficiência hepática alcoólica, doença circulatória periférica, aneurisma cerebral e isquemia cerebral, doenças comprovadamente relacionadas ao uso de tabaco e/ou álcool. Além disso, intentou-se parear as frequências de idade e sexo dos sujeitos do grupo controle com as dos pacientes com CECO, em que para a idade, admitiu-se variação de até cinco anos entre os grupos.

O estudo e seus objetivos, bem como parte de sua metodologia foi apresentada e explicitada aos pacientes recrutados e aqueles que aceitaram participar do estudo

assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A) que foi aprovado juntamente com o projeto de pesquisa pelos Comitês de Ética e Pesquisa do Hospital Heliópolis e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo B). Tanto os pacientes com CECO quanto os pacientes sem diagnóstico tumoral responderam individualmente ao Questionário Padronizado (Anexo C) que abrangeu informações como nome, sexo, idade, endereço, cor de pele, escolaridade dos participantes e também dados sobre o consumo de cigarros e de álcool (*status* do consumo, início de consumo, tempo de uso e abstinência, tipo de substâncias utilizadas e quantidades consumidas).

As respostas dos questionários foram averiguadas propiciando a categorização de alguns dados a fim de viabilizar as subseqüentes análises. Desta forma, para a variável idade as respostas foram divididas entre os grupos “ ≤ 50 anos de idade” e “ > 50 anos de idade”, considerando-se relatos da literatura de que os indivíduos são acometidos por CECO a partir dos 50 anos de idade (Sarode et al., 2020). Em relação à cor de pele, as categorias foram formadas considerando-se as frequências das respostas dos participantes, em que respostas de colorações de pele autorreferidas menos frequentes foram agrupadas na mesma categoria para viabilizar as análises estatísticas. Desta forma, formaram-se as categorias “Não-branca” e “Branca”. Já a variável escolaridade foi categorizada em anos de estudo representando os graus de escolaridade que compuseram a educação escolar brasileira anterior ao ano 2006, quando foi implementado o ensino fundamental de nove anos de duração. Assim, o grupo “zero a sete anos” representa nenhum estudo até o ensino fundamental incompleto; o grupo “oito a 11 anos” compreende a formação do ensino fundamental completo ao ensino médio incompleto; enquanto que o agrupamento “igual ou superior a 11 anos”

representa a formação do ensino médio completo e, pelo menos, ao ingresso no ensino superior.

As respostas sobre os consumos de cigarros e álcool também foram categorizadas. Os participantes que declararam não ter tido contato com cigarro e/ou álcool foram agrupados na categoria “nunca fumaram e/ou nunca beberam”. Já os participantes que afirmaram ter parado de fumar e/ou de beber, há pelo menos 12 meses da entrevista, foram considerados como “ex-fumantes e/ou ex-bebedores”, enquanto que os entrevistados que declararam manter o uso de cigarro e/ou consumo de bebidas alcoólicas foram classificados como “fumantes e/ou bebedores”. Os dados foram confirmados com a documentação contida nos registros médicos dos participantes, sempre que possível.

As intensidades de uso do cigarro e do consumo de álcool foram quantificadas a partir dos relatos dos entrevistados que tiveram contato com cigarro e/ou bebida alcoólica. A quantidade de cigarros utilizada foi contabilizada multiplicando-se o número de maços fumados ao dia (um maço corresponde o total de 20 cigarros) pelo número de anos que o entrevistado afirmou ter fumado ou que fumava até o momento da entrevista, o que mensurou o dado da intensidade na unidade de maços-ano. Tais intensidades foram categorizadas em “até 20 maços-ano”, “21-40 maços-ano” e “mais que 40 maços-ano”, como apresentado por Marchioni e colaboradores (2011). A quantidade de álcool ingerido, por sua vez, foi mensurada na unidade de grama por dia (g/dia) considerando o teor alcoólico das bebidas relatadas (5% de álcool na cerveja; 12% no vinho; 30% em licores; 41% em bebidas destiladas). As quantidades de álcool ingeridas foram categorizadas em “até 12,5 g/dia”, “12,6-49,9 g/dia” e “igual ou superior a 50,0 g/dia”, de acordo com de Rezende e colaboradores (2019).

3.2 Extração de DNA

Todos os participantes incluídos no estudo cederam cinco mililitros (mL) de sangue periférico coletado em tubo com o anticoagulante EDTA. As amostras de DNA foram obtidas de leucócitos presentes no volume de sangue coletado cuja extração foi realizada com a utilização do protocolo por *salting-out* (Miller et al., 1988), após a coleta do volume sanguíneo, no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da FMUSP. Para isso, as amostras de sangue coletadas foram transferidas para um tubo *falcon* de 15 mL e seus volumes totais registrados, completando-se o volume final do tubo com adição de lise de hemácia, solução hipotônica e composto com um micromolar (mM) de carbonato de amônia (NH_4HCO_3) e 114 mM de cloreto de amônia (NH_4Cl). Essa mistura foi homogeneizada manualmente por inversão e deixada em geladeira por 30 minutos, ocorrendo homogeneizações periódicas a cada 10 minutos. Após, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi descartado para adição de novo volume da lise de hemácia, em que o procedimento foi repetido mais uma vez.

O *pellet* remanescente foi tratado para que ocorresse a lise dos leucócitos por meio da adição de solução composta de tampão TEN (0,1 M de Tris-Cl; 0,01 M de EDTA; um molar (M) de cloreto de sódio – NaCl), SDS (sódio dodecilssulfato) 10% e Proteinase K. Os volumes de cada componente da solução foram adicionados em relação ao volume inicial de sangue periférico coletado, que pode variar entre os indivíduos de acordo com o vácuo do tubo; assim, para um mL de sangue periférico, são adicionados 0,6 mL de TEN, 12 μL de SDS 10% e 20 μL de Proteinase K (100 μg por mililitro de sangue). A mistura contendo a solução de lise de leucócitos foi submetida à banho maria à 37°C *overnight*.

Após a incubação, adicionou-se à mistura com lise leucocitária solução saturada de NaCl (6 M), em que para cada mililitro de sangue periférico são adicionados 0,24 mL de solução. Realizou-se homogeneização vigorosa, por agitação manual, durante 15 segundos, o que permitiu o descarte do *pellet* formado e a retenção da solução sobrenadante, na qual foram adicionados dois volumes de etanol absoluto gelado para realizar a precipitação de DNA. Uma vez isoladas as amostras de DNA, elas foram lavadas com a adição de 1000 µL de etanol 70% misturando-se por inversão manual seguida de centrifugação de 6000 rpm, a 4°C durante cinco minutos. Em seguida, realizou-se uma segunda lavagem, mas com a adição de 1000 µL de etanol absoluto e as mesmas condições de centrifugação. Depois de lavadas, as amostras de DNA foram depositadas em estufa a 37°C para evaporação do volume de álcool remanescente. Por fim, as amostras de DNA foram eluídas por meio da adição da solução TE (10 mM Tris e um mM EDTA) sendo refrigeradas em geladeira até serem estocadas em *freezer* com capacidade de refrigeração a -80°C.

A concentração das amostras de DNA, bem como sua pureza, foi determinada pela técnica de espectrofotometria, em que a absorbância do ácido nucleico foi medida sob os comprimentos de onda de 260 nm (A260) e 280 nm (A280). Para isso, as amostras de DNA foram bem homogeneizadas sendo depositado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific TM, Wilmington DE, USA) um microlitro (µL) de amostra. Os valores mensurados foram computados em uma planilha, considerando-se elevado grau de pureza para as razões A260/A280 e A260/A230 que obtiveram resultados entre 1,8 a 2,2 (NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, version 1.0 – User Manual). Uma vez mensuradas as concentrações de DNA e sua pureza, uma

alíquota das amostras foi diluída à concentração de 20 ng/μL, compondo um volume final de 50 μL.

3.3 Determinação da variabilidade do número de cópias de *GSTM1* e de *GSTT1*

A distinção dos números de cópias de *GSTM1* e de *GSTT1* foi estabelecida e padronizada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Instituto Oscar Freire da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a realização deste estudo, o que foi realizada por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo-Real (qPCR) com a utilização do ensaio *TaqMan Gene Copy Number Assay* (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Ressalta-se que essa metodologia de distinção do número de cópias para os genes *GSTM1* e *GSTT1* até o início do presente estudo, havia sido pouco utilizada, sendo empregada apenas por Emeville e colaboradores (2014), não sendo estabelecida em nenhum outro laboratório da Universidade.

O CNV de *GSTM1* foi determinado separadamente do CNV de *GSTT1*, porém ambos os genes foram amplificados juntamente com o gene referência *RNAseP*, o qual não apresenta alteração em seu número de cópias. Os pares de *primers* dos dois genes-alvo (Quadro 1) apresentam sequência nucleotídica específica para o anelamento da sonda marcada com a fluorescência *6-carboxyfluoresceine minor groove binder* (6-FAM-MGB), enquanto que nas sequências de nucleotídeos dos pares de *primers* do gene *RNAseP*, há regiões complementares à sonda marcada pela fluorescência VIC-TAMRA. Desta forma, o princípio da técnica baseia-se na liberação das fluorescências carregadas pelas sondas quando digeridas pela enzima Taq DNA Polimerase durante o processo de amplificação gênica.

As emissões ocorrem a cada ciclo da reação havendo detecção das fluorescências pelo equipamento de qPCR, em nosso laboratório foi utilizada a plataforma *Step-One Plus* (Applied Biosystem), e seu registro no programa da plataforma. Assim, cada detecção das fluorescências caracteriza um ciclo específico da reação de amplificação sendo denominado Ct. Considera-se que, entre Cts subsequentes, dobra-se a quantidade de DNA na reação e que quanto menor o valor de Ct, maior a quantidade de DNA presente na amostra e, assim, maior número de cópias gênicas na amostra estudada. Fato esse que é utilizado para a determinação do número de cópias de *GSTM1* e de *GSTT1*, uma vez que a média dos valores de Ct derivadas da amplificação desses genes é comparada à média dos valores de Ct da *RNaseP*, o que é empregado no método de análise $(Ct)_2 - \Delta\Delta Ct$ cujos os dados de amplificação foram submetidos ao *software CopyCaller* (versão 2.1 – *Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA) para que o número de cópias dos genes fosse determinado.

As reações foram preparadas em placa óptica de 96-poços misturando-se água ultrapura, mistura de componentes da reação (exceto *primers*, sonda e água) denominado *TaqMan Genotyping Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), ensaio de *GSTM1* ou *GSTT1* contendo *primers* e sondas, ensaio da *RNaseP*, e o DNA genômico totalizando 10,0 μ L do volume da reação. As identificações dos componentes, bem como suas quantidades de uso foram dispostas no Quadro 1. Para cada amostra de DNA e cada gene analisado, a determinação dos números de cópias foi efetuada em triplicata e todas as análises foram conduzidas sob ensaio cego. Além disso, amostra de controle de qualidade (substituição do volume de DNA genômico por água ultrapura) foi aplicada a cada conjunto de amostras analisadas. Seguiu-se as

condições de ciclagem da reação de qPCR, de acordo com as especificações do fabricante (Quadro 1).

Quadro 1. Reagentes e pares de *primers* da reação de qPCR

Componentes da reação de qPCR		
Reagentes		Volume
TaqMan Genotyping Master Mix (4371355)		5,0 µL
Água ultrapura		3,0 µL
Ensaio <i>GSTM1</i> (Hs02595872_cn) ou		0,5 µL
Ensaio <i>GSTT1</i> (Hs01731033_cn)		
Ensaio <i>RNAseP</i> (44033260)		0,5 µL
DNA genômico (20 ng/µL)		1,0 µL
Volume final da reação		10,0 µL
Sequências dos pares de <i>primers</i>		
Gene	<i>Primers</i> (5'→ 3')	
<i>GSTM1</i>	F:	CATGATCTGCTACAATCCAGAATTT
	R:	AAATTCTGGATTGTAGCAGATCATG
<i>GSTT1</i>	F:	GGCCTTGTTCTGGAGGAACCTTGTC
	R:	GGACAAGTTCCTCCAGAACAAGGCC
Condições de ciclagem qPCR		
40 ciclos		
Temperatura	Tempo	
95°C	10 minutos	
95°C	15 segundos	
60°C	60 segundos	

qPCR: Reação em cadeia da Polimerase em Tempo-Real; F: *forward*; R: *reverse*

3.4 Análise Estatística

3.4.1 Risco do desenvolvimento do carcinoma espinocelular oral

Neste estudo caso-controle foram analisadas tanto variáveis qualitativas quanto variáveis quantitativas provenientes do questionário padronizado utilizado nas entrevistas dos participantes do estudo. Tais variáveis possibilitaram a caracterização da população de estudo, ou seja, dos pacientes acometidos por CECO e dos indivíduos do grupo controle. As variáveis qualitativas eram todas nominais abrangendo sexo, cor de pele, escolaridade, tabagismo e etilismo, enquanto que as variáveis quantitativas eram contínuas, incluindo a idade, o consumo de cigarro e o consumo de álcool. Todas as variáveis foram categorizadas e a frequência de cada categoria foi determinada para o

grupo de caso e para o grupo de controles. Além disso, calculou-se média e desvio padrão das variáveis quantitativas para os dois grupos considerados no estudo. Para cada variável, foi avaliado se a distribuição das frequências de suas categorias diferiu entre os pacientes com CECO e os controles, por meio da realização do teste exato de Fisher. Além disso, realizou-se a regressão logística univariada com a obtenção dos valores de *odds ratio* (OR) para avaliar a associação de cada variável com o risco de desenvolvimento do carcinoma espinocelular oral, considerando-se intervalo de confiança de 95% (IC 95%) e nível de significância foi estabelecido em 0,05 ou 5% ($p < 0,05$).

O CNV de *GSTM1* e *GSTT1* foi tratado como variável quantitativa discreta, considerando-se como suas categorias as cópias gênicas determinadas durante as análises genéticas por reações de qPCR. As frequências dos números de cópias também foram calculadas para ambos os grupos e suas distribuições foram analisadas pelo teste exato de Fisher com a subsequente realização da regressão logística univariada que obteve os valores de OR para análise de associação do CNV dos genes com as chances de desenvolvimento de CECO. Para isso, as frequências de zero cópias gênicas foram consideradas a referência das análises e foram comparadas às frequências das demais cópias dos genes. Considerou-se, ainda, IC 95% e nível de significância de $p < 0,05$.

A fim de avaliar a interação entre as variáveis independentes (variáveis quantitativas e qualitativas supracitadas) com a variável dependente (CECO) e neutralizar as possíveis variáveis de confusão, realizou-se a regressão logística múltipla com a inclusão apenas das variáveis que inicialmente foram associadas com o risco tumoral. Essa análise possibilitou o efeito isolado de cada fator de risco para o estabelecimento da neoplasia, além da obtenção de valores de OR ajustados,

considerando-se IC 95% e valor de $p < 0,05$. Fez-se uso do pacote estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS – versão 18.0 para Windows) para o processamento das análises estatísticas.

3.4.2 Progressão do carcinoma espinocelular oral

Para as análises da progressão de CECO, os pacientes oncológicos foram distribuídos em quatro grupos de acordo com manifestação ou não dos eventos secundários relacionados à progressão tumoral, a saber: “Ausência de eventos secundários”, “Recorrências”, “Segundo tumores primários”, “Metástases à distância”.

Nessas análises, incluíram-se todas as variáveis qualitativas e quantitativas descritas anteriormente, sendo determinadas as frequências de suas categorias para cada grupo formado a fim de caracterizar o perfil de seus respectivos pacientes. O teste exato de Fisher foi realizado para avaliar a distribuição das frequências das variáveis tabagismo, consumo de cigarro, etilismo e consumo de álcool entre os grupos, seguido do cálculo dos valores de OR e IC 95% para averiguar a associação com a chance de ocorrência dos eventos secundários relacionados à progressão de CECO. Tais análises foram conduzidas com a comparação do grupo “Ausência de eventos secundários” com os demais.

Em relação ao CNV de *GSTM1* e *GSTT1*, as frequências de cada número de cópias dos genes foram calculadas para cada grupo formado e suas distribuições avaliadas por meio da aplicação do teste exato de Fisher, em que a frequência de zero cópias dos genes foi comparada às frequências das demais cópias determinadas. A associação entre a variabilidade do número de cópias de *GSTM1* e de *GSTT1* e a chance de ocorrência dos eventos secundários da progressão de CECO foi determinada pela

obtenção dos valores de OR e IC 95%, considerando valores de $p < 0,05$. Essas análises estatísticas foram realizadas no programa computacional *Graph Pad Prism* (versão 9.0.0).

3.4.3 Sobrevida dos pacientes

A sobrevida dos pacientes acometidos pelo carcinoma espinocelular oral foi analisada a partir dos dados presentes nos prontuários clínicos dos pacientes. A sobrevida global foi definida como o período que se iniciou com a data de admissão dos pacientes no serviço do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis e finalizou com a data da última consulta registrada nos prontuários, sendo contabilizado em meses o tempo considerado nas análises.

Para a estimativa da sobrevida global, o evento considerado foi a ocorrência de óbitos por causa do câncer e demais causas entre os pacientes e àqueles que descontinuaram o seguimento ou permaneceram vivos foram considerados indivíduos censurados durante as análises. Desta forma, as curvas de sobrevida global foram construídas pelo método de Kaplan-Meier (método do produto-limite – Kaplan e Meier, 1958), enquanto que a comparação das curvas, segundo cada número de cópias de *GSTM1* e de *GSTT1*, foi realizada pelo teste de Log-rank cuja significância estatística foi adotada para valores de $p < 0,05$. Efetuou-se, ainda, a regressão de Cox para analisar a possível associação do CNV de *GSTM1* e *GSTT1* com o tempo de sobrevida global dos pacientes, em que valores de *hazard ratio* (HR) foram calculados para dimensionar tal associação, considerando-se intervalo de confiança de 95% (IC 95%) e $p < 0,05$ para a significância estatística.

Já a sobrevida livre de progressão foi definida como a data de admissão no serviço hospitalar e a data registrada de algum evento secundário relacionado à progressão tumoral. Assim, recidivas, segundo tumores primários e metástases à distância foram analisados em conjunto e se considerou a data do primeiro evento secundário ocorrido, quando o paciente apresentou mais de um evento de progressão. O tempo analisado também foi calculado em meses e os indivíduos censurados foram aqueles que não apresentaram nenhum evento secundário ou que perderam o seguimento.

O método de Kaplan-Meier também foi empregado para a estimativa das curvas de sobrevida livre de progressão e as curvas foram comparadas, em relação aos números de cópias dos genes, pelo teste de Log-rank com valores de $p < 0,05$. A associação entre o tempo de ocorrência da progressão tumoral com o CNV de *GSTM1* e *GSTT1* foi analisada pela regressão de Cox com cálculo dos valores de HR, IC 95% e $p < 0,05$. Todas as análises foram conduzidas no pacote estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS – versão 18.0 para *Windows*).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da população amostral e risco do desenvolvimento tumoral

Ao longo do período de recrutamento, incluiu-se 242 pacientes com carcinoma espinocelular oral, admitidos para tratamento no Hospital Heliópolis. Após a averiguação das concentrações das amostras de DNA, bem como sua pureza, oito pacientes oncológicos foram excluídos do estudo devido a quantidades insuficientes do material genético obtido, o que resultou em um grupo de casos com o total de 234 pacientes acometidos por CECO (Figura 1).

Figura 1 – Fluxograma da composição dos casos. Total de pacientes com CECO recrutados, em primeiro momento, e critério da exclusão de alguns indivíduos para definição final deste grupo

A análise das características demográficas dos pacientes com CECO (Tabela 1) permitiu observar que os indivíduos eram majoritariamente do sexo masculino (203/234), com média de idade de 55,1 anos ($\pm 10,3$), em que 62,8% (n=147) deles receberam o diagnóstico tumoral com mais de 50 anos. Relata-se, ainda, que mais da

metade desses participantes se autorreferiram com coloração de pele branca (67,7% - Tabela 1). Os dados sobre a escolaridade mostraram que a maioria dos pacientes (160/234) não eram alfabetizados ou estudaram até o ensino fundamental sem concluí-lo, descrição caracterizada por zero a sete anos de estudo, enquanto que 6,0% (n=14) completaram o ensino médio ou ingressaram no ensino superior (11 anos ou mais de estudo), como exposto na Tabela 1.

Em relação ao *status* do consumo de cigarros, os pacientes com diagnóstico tumoral majoritariamente (94,1%) fizeram uso de cigarros por algum período de suas vidas, em que aproximadamente 3/4 deles (181/234) continuaram a fumar, apesar do diagnóstico tumoral. Destaca-se que os pacientes que declararam nunca ter fumado corresponderam a 6,0% (n=14) deles. Os dados retirados do questionário padronizado permitiram averiguar que os pacientes com CECO apresentaram carga tabágica, em média, de 44,9 maços-ano ($\pm 27,6$), em que mais da metade (122/233) dos indivíduos relataram fumar mais que 40 maços-ano de cigarros. Semelhantemente para o *status* do consumo de álcool, observou-se que 82,0% (n=191) dos pacientes com diagnóstico de CECO declararam terem consumido bebidas alcoólicas em algum momento de suas vidas, em que a maioria (137/233) afirmou manter esse consumo, embora o câncer tenha se estabelecido, e que a menor frequência dos pacientes afirmou nunca ter ingerido bebidas alcoólicas (42/233). Quanto a intensidade de consumo do álcool, os pacientes consumiram, em média, 185,9 gramas de álcool por dia ($\pm 169,4$), dos quais 62,1% (n=144) dos indivíduos acometidos por CECO apresentaram ingestão de álcool superior a 50 g/dia (Tabela 1).

As características clínicas e histopatológicas dos pacientes, bem como o tipo de tratamento e dados da progressão tumoral também estão disponibilizados na Tabela 1.

Dentre as regiões e estruturas da cavidade oral, a língua foi o sítio anatômico acometido em maior frequência pelo tumor, correspondendo a 35,9% (84/234) dos casos da neoplasia primária, seguidos de tumores que se desenvolveram no soalho bucal (31,2%). A maior parte dos pacientes recebeu o diagnóstico tumoral em estádios avançados, sendo 26,5% (62/234) com classificação TNM III e o estadiamento IV foi observado em 43,2% dos casos (101/234). Em relação ao tratamento, a frequência de pacientes submetidos apenas à cirurgia (38,5%) se assemelhou àquela dos pacientes que receberam a combinação de cirurgia seguida de radioterapia e/ou quimioterapia (37,6%). Nota-se, ainda, que 12,0% (28/234) dos pacientes com diagnóstico tumoral receberam tratamento paliativo. Quanto à progressão tumoral, nenhum evento secundário relacionado à evolução da doença foi observado em 52,6% (n=123) dos indivíduos acometidos pelo câncer, enquanto que a recorrência da neoplasia ocorreu em maior frequência, dentre os eventos secundários considerados, correspondendo a 37,2% dos registros (87/234). Diagnósticos de segundos tumores primários foram realizados para 22 pacientes com CECO e 19 indivíduos com diagnóstico de câncer apresentaram metástases à distância.

Tabela 1. Características demográficas, educacional e consumo de cigarro e álcool dos pacientes acometidos pelo CECO, assim como os dados clínicos

Características	Pacientes com CECO	
	N	%
Sexo		
Feminino	31	13,2
Masculino	203	86,8
Total	234	100,0
Idade		
≤50 anos	87	37,2
>50 anos	147	62,8
Total	234	100,0

Continuação da Tabela 1

Cor de pele		
Não-Branca	75	32,3
Branca	157	67,7
Total	232	100,0
Escolaridade		
0-7 anos	160	68,4
8-10 anos	60	25,6
≥11 anos	14	6,0
Total	234	100,0
Tabagismo		
Nunca	14	6,0
Ex-Fumante	39	16,7
Fumante	181	77,3
Total	234	100,0
Consumo de cigarro		
0 maços-ano	14	6,0
≤20 maços-ano	31	13,3
21-40 maços-ano	66	28,3
>40 maços-ano	122	52,4
Total	233	100,0
Etilismo		
Nunca	42	18,0
Ex-Bebedor	54	23,2
Bebedor	137	58,8
Total	233	100,0
Consumo de álcool		
0 g/dia	42	18,1
≤12,5 g/dia	19	8,2
12,6-49,9 g/dia	27	11,6
≥50,0 g/dia	144	62,1
Total	232	100,0
Sítio Tumoral		
Língua	84	35,9
Soalho bucal	73	31,2
Lábios	25	10,7
Gengiva	29	12,4
Retromolar	19	8,1
Região Jugal	4	1,7
Total	234	100,0
Estádio clínico (TNM)		
I	14	6,0
II	56	23,9
III	62	26,5
IV	101	43,2
SI	1	0,4
Total	234	100,0

Continuação da Tabela 1

Tratamento		
Cirurgia	90	38,5
Rádio/quimioterapia	27	11,5
Cirurgia + Rádio/quimioterapia	88	37,6
Paliativo	28	12,0
SI	1	0,4
Total	234	100,0
Recorrência		
Sim	87	37,2
Não	147	62,8
Total	234	100,0
Segundo Tumor Primário		
Sim	22	9,4
Não	212	90,6
Total	234	100,0
Metástase à distância		
Sim	19	6,4
Não	225	93,6
Total	234	100,0

N: número absoluto de indivíduos; SI: sem informação

Em relação ao grupo controle, durante o período de recrutamento dos participantes, totalizou-se a inclusão de 465 pacientes elegíveis de diferentes enfermarias do Hospital Heliópolis, mas a avaliação das concentrações das amostras de DNA revelou quantidades insuficientes de material genético para 17 delas, as quais foram excluídas do estudo. Antes da realização das análises propostas, os questionários dos participantes remanescentes foram revisados, o que permitiu a constatação que 26 indivíduos receberam atendimento hospitalar devido doenças relacionadas ao tabagismo e/ou consumo de álcool, incluindo cirrose hepática, insuficiência hepática alcoólica, doença circulatória periférica, aneurisma cerebral, isquemia cerebral ou diagnóstico tumoral, o qual foi confirmado por análise histopatológica após a inclusão do indivíduo no estudo. Desta forma, esses pacientes também foram excluídos do presente estudo, resultando no grupo de controles com o total de 422 indivíduos (Figura 2). Quanto à

origem clínica dos indivíduos do grupo controle, estes eram provenientes, principalmente, de enfermarias da clínica médica, da gastroenterologia, da ortopedia, da endocrinologia, da dermatologia e da emergência, correspondendo a 40,4% dos participantes. Os demais indivíduos foram provenientes das enfermarias de cirurgia geral (21,1%), cirurgia vascular (20,2%), neurocirurgia (11,8%) e neurologia (6,5%).

Figura 2 – Fluxograma da composição do grupo de controles. Total de pacientes sem diagnóstico tumoral recrutados, em primeiro momento, e os critérios de exclusão de alguns indivíduos para definição final deste grupo.

As características demográficas dos indivíduos do grupo controle estão apresentadas na Tabela 2. Semelhantemente aos pacientes acometidos por CECO, os participantes sem diagnóstico tumoral eram, em sua maioria, do sexo masculino (355/422), com idade média de 53,5 anos ($\pm 11,9$), em que 59,6% (n=251) dos indivíduos apresentaram idade superior a 50 anos. Além disso, a coloração de pele branca foi autorreferida por 58,2% (242/416) desses participantes. Em relação à

escolaridade, mais da metade dos controles (61,5%; n=248) apresentaram de zero a sete anos de estudo, o que corresponde às declarações dos participantes sobre serem analfabetos ou não terem concluído o ensino fundamental. Observou-se que a frequência dos indivíduos sem diagnóstico tumoral e que concluíram o ensino médio ou ingressaram no ensino superior (≥ 11 anos de estudo) foi a menor determinada, dentre as categorias de escolaridade, correspondendo a 14,9% (60/403) dos participantes.

A análise do *status* do uso de cigarros permitiu observar que 73,5% (308/419) dos pacientes do grupo de controles afirmaram ter usado cigarro por algum período de suas vidas. Notou-se, ainda, que mais da metade destes indivíduos (n=186) declararam ser fumantes no momento da entrevista e que 26,5% (111/419) deles responderam nunca ter fumado cigarros (Tabela 2). A quantificação do consumo de cigarro revelou que a média da carga tabágica do grupo de controles foi de 26,3 maços-ano ($\pm 31,1$) e que as cargas tabágicas estabelecidas como categorias para o consumo de cigarros apresentaram frequências semelhantes entre si, em que 26,7% (111/415) dos indivíduos apresentaram carga de tabaco de até 20 maços-ano, consumo entre 21 e 40 maços-ano foram atribuídas a 21,4% (n=89) dos participantes e 25,1% (104/415) apresentaram carga tabágica maior que 40 maços-ano. Em relação ao hábito etilista, em torno de 3/4 (315/418) desses pacientes declararam fazer consumo de bebidas alcoólicas por algum momento de suas vidas, em que 171 (171/418) indivíduos declararam que bebiam corriqueiramente, no ato da entrevista, e que 104 deles nunca haviam consumido bebidas alcoólicas. A média da ingestão de álcool, em gramas por dia, desses indivíduos foi de 118,8 ($\pm 162,1$) e se observou similaridade nas frequências da quantia de 12,6-49,9 g/dia (27,1%) e da quantia de $\geq 50,0$ g/dia (30,0%), dados também apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Características demográficas, educacional e consumo de cigarro e álcool dos pacientes sem quaisquer diagnósticos tumorais que compuseram o grupo de controles

Características	Controles	
	N	%
Sexo		
Feminino	67	15,9
Masculino	355	84,1
Total	422	100,0
Idade		
≤50 anos	170	40,4
>50 anos	251	59,6
Total	421	100,0
Cor de pele		
Não-Branca	174	41,8
Branca	242	58,2
Total	416	100,0
Escolaridade		
0-7 anos de estudo	248	61,5
8-10 anos de estudo	95	23,6
≥11 anos de estudo	60	14,9
Total	403	100,0
Tabagismo		
Nunca	111	26,5
Ex-fumante	122	29,1
Fumante	186	44,4
Total	419	100,0
Consumo de cigarros		
0 maços-ano	111	26,7
≤20 maços-ano	111	26,7
21-40 maços-ano	89	21,4
>40 maços-ano	104	25,1
Total	415	100,0
Etilismo		
Nunca	104	24,7
Ex-bebedor	144	34,4
Bebedor	171	40,9
Total	418	100,0
Consumo de álcool		
0 g/dia	104	25,1
≤12,5 g/dia	74	17,9
12,6-49,9 g/dia	112	27,1
≥50,0 g/dia	124	30,0
Total	414	100,0

N: número absoluto de indivíduos

Quanto aos testes de associação de cada variável com o risco de desenvolvimento do carcinoma espinocelular oral, os pacientes com diagnóstico oncológico que se autodeclararam com coloração de pele branca apresentaram risco tumoral aumentado em 1,51 vezes (OR 1,51; IC 95% 1,08-2,12), como exibido na Tabela 3. Por outro lado, a frequência (14,9%) de indivíduos do grupo de controles que estudaram 11 anos, pelo menos, foi mais que o dobro da frequência de pacientes com CECO que apresentaram o mesmo nível de escolaridade (6,0%), o que foi associado com a diminuição da chance de desenvolvimento do câncer em 64% (OR 0,36; IC 95% 0,20-0,67).

Apesar da cessação do tabagismo, os pacientes acometidos por CECO que foram classificados como ex-fumantes apresentaram duas vezes mais chances de formação do tumor (OR 2,60; IC 95% 1,34-5,03). Já os pacientes tumorais que mantiveram o consumo de cigarros, o risco de CECO foi mais elevado, sendo superior a 7 vezes (OR 7,71; IC 95% 4,21-13,95), sendo que a frequência de casos que continuaram a fumar (77,4%) ultrapassou a frequência de fumantes provenientes do grupo de controles (44,4%). Em relação à quantidade de cigarros consumida, observou-se aumento do risco tumoral de acordo com o aumento da carga tabágica apresentada pelos pacientes, em que tal risco foi elevada a mais de nove vezes, para a carga de tabagismo maior que 40 maços-ano (OR 9,38; IC 95% 5,07-17,33 – Tabela 3). Entretanto, as análises sobre o etilismo revelaram que apenas o consumo contínuo de bebidas alcoólicas apresentou associação com o risco tumoral (OR 1,98; IC 95% 1,30-3,03) e que o consumo de 50 g ou mais de álcool por dia foi relatado, em maior frequência, pelos pacientes com CECO do que os sujeitos do grupo controle, o que foi associado com o aumento do risco tumoral em mais de duas vezes (OR 2,88; IC 95% 1,87-4,43 – Tabela 3).

Tabela 3. Análises de associação das características demográficas, de educação, consumo de cigarros e álcool, bem como as quantidades de seus consumos com o risco de desenvolvimento de CECO

Variáveis	Categorias	Controles		Pacientes CECO		OR	IC 95%		p
		N	%	N	%		Inferior	Superior	
Sexo	Feminino	67	15,9	31	13,2	1,00	-	-	-
	Masculino	355	84,1	203	86,8	1,24	0,78	2,00	0,35
Idade	≤50 anos	170	40,4	87	37,2	1,00	-	-	-
	>50 anos	251	59,6	147	62,8	1,15	0,83	1,60	0,40
Cor de pele	Não-branca	174	41,8	75	32,3	1,00	-	-	-
	Branca	242	58,2	157	67,7	1,51	1,08	2,12	0,02
Escolaridade	0-7 anos	248	61,5	160	68,4	1,00	-	-	-
	8-10 anos	95	23,6	60	25,6	0,99	0,68	1,45	0,98
	≥11 anos	60	14,9	14	6,0	0,36	0,20	0,67	<0,01
Tabagismo	Nunca	111	26,5	14	5,9	1,00	-	-	-
	Ex-fumante	122	29,1	39	16,7	2,60	1,34	5,03	0,05
	Fumante	186	44,4	181	77,4	7,71	4,27	13,95	<0,01
Consumo de cigarro (maços-ano)	0	111	26,7	14,0	6,0	1,00	-	-	-
	≤20	111	26,7	31	13,3	2,21	1,12	4,39	0,02
	21-10	89	21,4	66	28,3	5,88	3,10	11,16	<0,01
	>40	104	25,1	122	52,4	9,38	5,07	17,33	<0,01
Etilismo	Nunca	104	24,7	42	18,0	1,00	-	-	-
	Ex-bebedor	144	34,4	54	23,2	0,95	0,59	1,52	0,82
	Bebedor	171	40,9	137	58,8	1,98	1,30	3,03	<0,01
Consumo de álcool (g/dia)	0	104	25,1	42	18,1	1,00	-	-	-
	≤12,5	74	17,9	19	8,2	0,64	0,34	1,18	0,15
	12,6-49,9	112	27,1	27	11,6	0,62	0,36	1,07	0,09
	≥50,0	124	30,0	144	62,1	2,88	1,87	4,43	<0,01

N: número absoluto de indivíduos; CECO: carcinoma espinocelular oral; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; p<0,05

4.2 Determinação e análise da variabilidade do número de cópias de *GSTM1* e de *GSTT1*

A determinação da variabilidade do número de cópias de *GSTM1* permitiu a distinção de zero, uma e duas cópias gênicas tanto entre os pacientes acometidos por CECO quanto nos controles (Tabela 4). O resultado da análise de associação revelou

que duas cópias gênicas foram detectadas em 6,8% dos pacientes tumorais (16/234) e em 11,4% dos controles, resultando na diminuição de 52% de risco de CECO (OR 0,48; IC 95% 0,26-0,89), assim como a presença de apenas uma cópia de *GSTM1*, que também conferiu queda de 28% da chance de desenvolvimento do câncer (OR 0,72; IC 95% 0,51-1,00). Em relação a zero cópias de *GSTM1*, aproximadamente metade dos pacientes com diagnóstico de CECO (50,9%) apresentaram a deleção completa do gene (119/234), enquanto que zero cópias gênicas foram determinadas em 40,9% dos sujeitos do grupo controle (Tabela 4).

Quanto ao CNV de *GSTT1*, o número de cópias do gene variou, em toda população amostral, de zero a três cópias. Foram observadas três cópias gênicas em oito participantes, dos quais cinco eram provenientes do grupo de pacientes com diagnóstico tumoral, e três participantes do grupo de controles. Devido à baixa frequência, as amostras que apresentaram três cópias de *GSTT1* foram analisadas em conjunto com àquelas que carregaram duas cópias gênicas. A análise da distribuição das frequências dos números de cópias revelou que 33,3% (n=78) dos pacientes oncológicos apresentaram duas ou três cópias do gene que, ao ser comparado com os 18,7% (121/421) dos indivíduos controles, resultou na associação com o aumento do risco de CECO (OR 1,63; IC 95% 1,02-2,61). Destaca-se, ainda, que uma cópia de *GSTT1* apresentou a maior frequência dentre os números de cópias determinados tanto entre os pacientes com diagnóstico tumoral (50,2%) quanto entre os controles (48,7%), porém tal distribuição não apresentou diferença estatisticamente significativa. Além disso, observou-se que a deleção gênica completa, ou seja, zero cópias, apresentou maior frequência entre os controles, sendo detectada em 22,6% (95/421) desses indivíduos, em comparação aos casos (16,3% - Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição das frequências de cada cópia de *GSTM1* e *GSTT1* entre os controles e os pacientes com CECO, bem como os testes de associação com o risco de desenvolvimento tumoral

Gene	CNV	Controles		Pacientes CECO		OR	IC 95%		p
		N	%	N	%		Inferior	Superior	
<i>GSTM1</i>	0	172	40,9	119	50,9	1,00	-	-	-
	1	201	47,7	99	42,3	0,72	0,51	1,00	0,05
	2	48	11,4	16	6,8	0,48	0,26	0,89	0,02
	Total	421	100,0	234	100,0				
<i>GSTT1</i>	0	95	22,6	38	16,3	1,00	-	-	-
	1	205	48,7	118	50,4	1,44	0,93	2,23	0,10
	2 ou 3	121	18,7	78	33,3	1,63	1,02	2,61	0,04
	Total	421	100,0	234	100,0				

CNV: *copy number variation*; N: número absoluto de indivíduos; CECO: carcinoma espinocelular oral; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; $p < 0,05$

4.3 Análise de regressão logística múltipla

As variáveis independentemente associadas com o risco de desenvolvimento de CECO foram incluídas como covariáveis de ajuste na análise de regressão logística múltipla. Entretanto, para os fatores de risco cigarro e álcool foram consideradas apenas as variáveis que quantificaram o consumo dessas substâncias (consumo de cigarro (maços-ano) e consumo de álcool (g/dia)). Além delas, a variável cor de pele também foi excluída das análises por ter diminuído o poder estatístico do teste de Hosmer e Lemeshow. Assim, as variáveis escolaridade, consumo de cigarro, consumo de álcool e CNV de *GSTM1* e CNV de *GSTT1* foram incluídas na avaliação.

Os resultados revelaram que os indivíduos acometidos pelo tumor e que apresentaram escolaridade com pelo menos 11 anos de estudo apresentaram redução do risco de CECO em 61% (OR 0,39; IC 95% 0,20-0,76). As cargas tabágicas permaneceram associadas, proporcionalmente, ao aumento das chances de desenvolvimento dessa neoplasia, em que a carga tabágica superior a 40 maços-ano

aumentou o risco do câncer em 8,61 vezes (OR 8,61; IC 95% 4,22-17,59), como mostrado na Tabela 5. Por outro lado, o consumo de álcool resultou associações estatisticamente significantes distintas da apresentada pela regressão logística univariada, em que as categorias $\leq 12,5$ g/dia e 12,6-49,9 g/dia mostraram-se associadas à redução do risco de CECO em 62% (OR 0,38; IC 95% 0,19-0,77) e 70% (OR 0,30; IC 95% 0,16-0,57), respectivamente.

Já em relação à variação do número de cópias dos genes, a presença de 2 cópias de *GSTM1* continuou a ser associada com a diminuição das chances de desenvolvimento de CECO, redução esta que foi de 53% (OR 0,47; IC 95% 0,24-0,92), enquanto que a presença de apenas uma cópia de *GSTM1* não revelou significância estatística para o risco do câncer. Considerando-se o CNV de *GSTT1*, os resultados da regressão logística múltipla não encontraram associação estatisticamente significativa com nenhuma cópia gênica e o risco de CECO (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de regressão logística múltipla com a inclusão das variáveis escolaridade, consumo de cigarro e de álcool e a variabilidade do número de cópias de *GSTM1* e de *GSTT1*

Variáveis	OR*	IC 95%		P
		Inferior	Superior	
Escolaridade				
0-7 anos	Referência			
8-10 anos	1,05	0,68	1,60	0,83
≥ 11 anos	0,39	0,20	0,76	0,01
Consumo de cigarro (maços-ano)				
0	Referência			
≤ 20	2,32	1,11	4,87	0,03
21-40	5,35	2,53	11,29	<0,01
> 40	8,61	4,22	17,59	<0,01
Consumo de álcool (g/dia)				
0	Referência			
$\leq 12,5$	0,38	0,19	0,77	<0,01
12,6-49,9	0,30	0,16	0,57	<0,01
$\geq 50,0$	1,06	0,61	1,82	0,84

Continuação da Tabela 5

CNV de <i>GSTM1</i>				
0	Referência			
1	0,72	0,49	1,06	0,09
2	0,47	0,24	0,92	0,03
CNV de <i>GSTT1</i>				
0	Referência			
1	1,41	0,85	2,32	0,18
2 ou 3	1,31	0,77	2,23	0,32

OR*: *odds ratio* ajustado para escolaridade, consumo de cigarro, consumo de álcool, CNV de *GSTM1* e CNV de *GSTT1*; IC: intervalo de confiança; p<0,05; CNV: *copy number variation*

Adicionalmente, realizou-se a distribuição do CNV de *GSTM1* e de *GSTT1* de acordo com o estadiamento de CECO, sendo observado que cada cópia dos genes apresentou frequências similares entre si para cada classificação estabelecida, as quais foram maiores entre os tumores mais avançados (III/IV), em comparação às neoplasias em estádios iniciais (I/II), como mostrado na Tabela 6. Tal resultado possivelmente está atribuído ao fato de que a maior fração dos tumores diagnosticados, no presente estudo, encontravam-se em estádios tardios, o que deve estar relacionado com o tempo de detecção da doença, mas não em relação do número de cópias gênicas.

Tabela 6. Distribuição do CNV de *GSTM1* e de *GSTT1* de acordo com o estadiamento clínico de CECO

CNV	Estadiamento clínico (classificação TNM)							
	I		II		III		IV	
<i>GSTM1</i>	N	%	N	%	N	%	N	%
0	5	2,1	31	13,3	33	14,2	50	21,4
1	8	3,4	19	8,1	24	10,3	47	20,2
2	1	0,6	6	2,6	5	2,1	4	1,7
<i>GSTT1</i>	N	%	N	%	N	%	N	%
0	2	1,0	8	3,4	11	4,7	17	7,3
1	7	3,0	27	11,6	32	13,7	51	21,9
2 ou 3	5	2,1	21	9,0	19	8,1	33	14,2

CNV: *copy number variation*; CECO: carcinoma espinocelular oral; TNM: *tumor-node-metastasis*; N: número absoluto de indivíduos

4.4 Progressão do carcinoma espinocelular oral

Os 234 pacientes com diagnóstico tumoral foram distribuídos em quatro grupos distintos, de acordo com a ocorrência, ou não, dos eventos secundários relacionados à progressão tumoral. Assim, o grupo “Ausência de eventos secundários” foi constituído por pacientes acometidos por CECO e nenhum evento de progressão foi registrado em seus prontuários durante o período de seguimento desses pacientes, o que totalizou a inclusão de 123 indivíduos. Em relação aos pacientes que apresentaram recidivas, reuniram-se no grupo “Recorrências” 87 pacientes que foram acometidos por recidivas locorregionais, locais e/ou regionais. Já o grupo “Segundo tumores primários” foi composto de 22 indivíduos, em que tais tumores se desenvolveram, em maior frequência, no esôfago, no palato mole e na base da língua. Por fim, “Metástases à distância” se mostrou o menor dentre os grupos constituídos abrangendo 19 pacientes e que o pulmão foi o sítio mais acometido seguido de metástases ósseas, hepáticas e cerebrais. Destaca-se, ainda, que quatro pacientes desenvolveram tanto recorrência quanto segundo tumores primários, 11 indivíduos apresentaram recorrências e metástases à distância. Enquanto que um paciente foi acometido pelos três eventos relacionados à progressão tumoral.

A Tabela 7 apresenta as características demográficas e educacional dos indivíduos de cada grupo, o que permitiu observar que o perfil dos pacientes entre os grupos se assemelharam entre si e também em relação ao perfil observado para o grupo de casos como um todo. Assim, os pacientes eram majoritariamente do sexo masculino, destacando-se o grupo de “Metástases à distância” cujos integrantes eram 100% homens. Além disso, mais da metade desses indivíduos apresentaram idade maior que 50 anos e se autodeclararam com coloração de pele branca, em frequências semelhantes.

Em relação à característica educacional, a maior parte dos pacientes, em cada grupo, obteve entre zero a sete anos de estudo, em que a maior frequência desses indivíduos foi observada no grupo de “Segundo tumores primários” (72,7% - 16/22) e menor frequência, entre os pacientes acometidos por metástases à distância (57,9%). Notou-se, ainda, a presença de pacientes que apresentaram 11 anos ou mais de estudos em cada grupo formado e que os indivíduos que não apresentaram nenhum evento secundário e àqueles que desenvolveram segundo tumores primários obtiveram frequências semelhantes: 4,1% e 4,5%, respectivamente. A mesma observação foi aplicada aos grupos “Recorrências” (8,1%; 7/87) e “Metástases à distância” (10,5%), os quais obtiveram as maiores frequências, em comparação aos demais grupos (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição das características demográficas e educacional dos pacientes oncológicos com e sem eventos de progressão tumoral

Características	Sem eventos secundários		Recorrências		2º tumores primários		Metástases à distância	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Sexo								
Feminino	17	13,8	10	11,5	4	18,2	0	0,0
Masculino	106	86,2	77	88,5	18	81,8	19	100,0
Total	123	100,0	87	100,0	22	100,0	19	100,0
Idade								
≤50 anos	44	35,8	33	37,9	10	45,5	6	31,6
>50 anos	79	64,2	54	62,1	12	54,5	13	68,4
Total	123	100,0	87	100,0	22	100,0	19	100,0
Cor de pele								
Não-branca	36	29,3	28	32,2	8	36,4	8	42,1
Branca	85	69,1	59	67,8	14	63,6	11	57,9
SI	2	1,6	-	-	-	-	-	-
Total	123	100,0	87	100,0	22	100,0	19	100,0
Escolaridade								
0-7 anos	84	68,3	59	67,8	16	72,7	11	57,9
8-10 anos	34	27,6	21	24,1	5	22,7	6	31,6
≥11 anos	5	4,1	7	8,1	1	4,6	2	10,5
Total	123	100,0	87	100,0	22	100,0	19	100,0

N: número absoluto de indivíduos; SI: sem informação

A respeito do tabagismo, o consumo ininterrupto de cigarros foi majoritária e semelhantemente declarado pelos pacientes dos quatro grupos constituídos, com

destaque para os pacientes com metástases à distância, que corresponderam a 94,7% (18/19), e que o indivíduo remanescente desse grupo foi categorizado como ex-fumante, dados exibidos na Tabela 8. Relata-se, ainda, que a maior proporção de pacientes que declaram nunca ter usado cigarros foi obtida entre os pacientes que não apresentaram quaisquer eventos secundários relacionados à progressão tumoral. A distribuição entre os grupos não resultou em associações estatisticamente significantes (Tabela 8). Em relação à carga tabágica desses pacientes, também se observou que mais de 40 maços-ano de cigarros foi atribuída a mais da metade dos pacientes, em frequências aproximadas, o que também não apresentou associação estatisticamente significativa com as chances de ocorrência de progressão de CECO (Tabela 8).

De forma semelhante, a maioria dos pacientes manteve a ingestão contínua de álcool em frequências aproximadas entre os grupos “Ausência de eventos secundários”, “Recorrências” e “Segundo tumores primários”, mas o grupo de “Metástases à distância” mostrou a maior frequência dentre as determinadas (73,7%), tais distribuições indiferentes não foram associadas com o risco de ocorrência dos eventos secundários (Tabela 8). Destaca-se, ainda, que nenhum paciente com metástases à distância afirmou nunca ter ingerido bebidas alcoólicas. Em relação à quantificação do consumo de álcool, mais da metade dos pacientes apresentaram ingestão de mais de 50 gramas de álcool por dia para cada grupo constituído, em que a maior frequência foi observada entre os pacientes que desenvolveram segundo tumores primários (72,7%), mas as análises estatísticas não obtiveram resultados significantes (Tabela 8).

Tabela 8. Status tabágico e etílico, bem como a quantificação do consumo de cigarros e álcool dos pacientes oncológicos sem progressão tumoral, com recorrências, com segundo tumores primários e com metástases à distância, além das análises de associação com as chances de ocorrências dos eventos secundários

Variáveis	Ausência de eventos secundários		Recorrências		OR (IC 95%)	p	2º tumores primários		OR (IC 95%)	p	Metástases à distância		OR (IC 95%)	p
	N	%	N	%			N	%			N	%		
Tabagismo														
Nunca	9	7,3	4	4,6	1,00	-	1	4,6	1,00	-	0	0,0	1,00	-
Ex-fumante	21	17,1	13	14,9	1,39 (0,36-4,72)	0,74	7	31,8	3,00 (0,37-37,13)	0,65	1	5,3	-	-
Fumante	93	75,6	70	80,5	1,69 (0,50-5,13)	0,56	14	63,6	1,35 (0,21-15,84)	>0,99	18	94,7	-	-
Total	123	100,0	87	100,0			22	100,0					-	-
											19	100,0		
Consumo de cigarro (maços-ano)														
0	9	7,3	4	4,6	1,00	-	1	4,6	1,00	-	0	0,0	1,00	-
≤20	19	15,4	12	13,8	1,42 (0,36-4,87)	0,74	0	0,0	0,00 (0,00-4,73)	0,34	0	0,0	-	-
21-40	29	23,6	28	32,2	2,17 (0,66-6,89)	0,35	7	31,8	2,17 (0,27-26,91)	0,66	9	47,4	-	-
>40	65	52,8	43	49,4	1,49 (0,42-4,58)	0,76	14	63,6	1,94 (0,31-22,66)	>0,99	10	52,6	-	-
SI	1	0,9	-	-			-	-			-	-		
Total	123	100,0	87	100,0			22	100,0			19	100,0		
Etilismo														
Nunca	27	21,9	13	15,0	1,00	-	2	9,1	1,00	-	0	0,0	1,00	-
Ex-bebedor	24	19,5	25	28,7	2,16 (0,92-4,92)	0,09	7	31,8	3,94 (0,83-19,77)	0,15	5	26,3	-	-
Bebedor	71	57,7	49	56,3	1,43 (0,66-2,98)	0,45	13	59,1	2,47 (0,55-11,54)	0,35	14	73,7	-	-
SI	1	0,9	-	-			-	-			-	-		
Total	123	100,0	87	100,0			22	100,0			19	100,0		
Consumo de álcool (g/dia)														
0	27	21,9	13	14,9	1,00	-	2	9,1	1,00	-	0	0,0	1,00	-
≤12,5	8	6,5	8	9,2	2,08 (0,68-6,41)	0,24	3	13,6	5,06 (0,86-30,78)	0,12	3	15,8	-	-
12,6-49,9	17	13,8	8	9,2	0,98 (0,34-2,70)	>0,99	1	4,6	0,79 (0,05-7,27)	>0,99	2	10,5	-	-
≥50,0	70	56,9	58	66,7	1,72 (0,81-3,54)	0,20	16	72,7	3,09 (0,74-14,18)	0,23	13	68,4	-	-
SI	1	0,9	-	-			-	-			1	5,3		
Total	123	100,0	87	100,0			22	100,0			19	100,0		

N: número absoluto de indivíduos; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; p<0,05; SI: sem informação

A análise do CNV de *GSTM1* para os eventos secundários relacionados à progressão de CECO revelou a variação entre zero a duas cópias entre os pacientes oncológicos provenientes dos grupos. Destaca-se que os pacientes com diagnóstico de CECO sem eventos secundários apresentaram menor frequência da deleção completa do gene, ou seja, zero cópias de *GSTM1* (42,3%; 52/123), em comparação aos demais grupos, dentre os quais a deleção se mostrou em mais da metade dos indivíduos, como mostrado na Tabela 9. De forma inversa, uma cópia do gene foi detectada em 51,2% (n=63) dos pacientes do grupo de “Ausência de eventos secundários”, enquanto que os demais grupos apresentaram menores frequências de uma cópia gênica (Tabela 9). Apesar dessa diferença, uma cópia de *GSTM1* foi associada apenas com a diminuição da chance de desenvolvimento de recorrências de CECO, diminuição esta que foi de 53,0% (OR 0,47; IC 95% 0,26-0,85), como apresentado na Tabela 10. Já as duas cópias de *GSTM1* apresentaram detecção diminuta entre os pacientes com diagnóstico tumoral com frequências aproximadas entre os pacientes sem eventos secundários quaisquer (6,5%) e com recidivas (4,6), em que os testes de associação não apresentaram resultados estatisticamente significantes para nenhum evento relacionado com a progressão do câncer (Tabelas 10, 11, 12). Chama-se atenção, ainda, que as duas cópias de *GSTM1* não foram detectadas em nenhum paciente acometido por metástases à distância (Tabelas 9 e 12).

Tabela 9. Distribuição das frequências dos números de cópias de *GSTM1* e de *GSTT1* para os pacientes sem eventos de progressão tumoral, com recorrências, com segundo tumores primários e com metástases à distância

CNV	Ausência de eventos secundários		Recorrências		2º tumores primários		Metástases à distância	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>GSTM1</i>								
0	52	42,3	53	60,9	12	54,5	11	57,9
1	63	51,2	30	34,5	6	27,3	8	42,1
2	8	6,5	4	4,6	4	18,2	0	0,0
<i>GSTT1</i>								
0	23	18,7	12	13,8	1	4,5	3	15,8
1	60	48,8	48	55,2	10	45,5	13	68,4
2 ou 3	40	32,5	27	31,0	11	50,0	3	15,58

CNV: *copy number variation*; N: número absoluto de indivíduos

Em relação ao gene *GSTT1*, o número de cópias gênicas variou entre zero a três cópias, em que essas três cópias foram detectadas em três pacientes tanto do grupo “Ausência de eventos secundários” quanto do grupo “Recorrências”, também em um indivíduo com metástase à distância e nenhum dos pacientes que desenvolveram segundo tumores primários continham três cópias de *GSTT1* em seus genomas. Zero cópias desse gene apresentaram as menores frequências determinadas para os números de cópias, o que foi observado nos quatro grupos analisados, com destaque para “Segundo tumores primários”, correspondendo a 4,5% (1/22 – Tabela 9). Uma cópia de *GSTT1* foi detectada na maior parte dos pacientes com CECO, tanto àqueles que foram acometidos por algum evento secundário quanto os que não apresentaram progressão tumoral, com maior proporção entre os pacientes com metástases à distância (68,4%; n=13) seguida dos pacientes com recorrências (55,2%; 48/87 – Tabela 9). Além disso, as distribuições de uma cópia gênica não se mostraram diferenciadas, o que não resultou em associações estatisticamente significantes com as chances de eventos relacionados à progressão de CECO (Tabelas 10, 11, 12). Duas cópias de *GSTT1* foram detectadas em 50,0% dos pacientes com segundo tumores primários, enquanto que duas ou três cópias

gênicas apresentaram frequências similares entre pacientes sem eventos de progressão e pacientes com recorrências do tumor (Tabela 9). Nenhuma cópia do gene *GSTT1* foi associada com as chances de ocorrência de algum evento secundário relacionado com a progressão da doença (Tabelas 10, 11, 12).

Tabela 10. Análise de associação do CNV de *GSTM1* e de *GSTT1* com as chances de recorrências do carcinoma espinocelular oral

CNV	Ausência de eventos secundários		Recorrências		OR	IC 95%		p
	N	%	N	%		Inferior	Superior	
<i>GSTM1</i>								
0	52	42,3	53	60,9	1,00	-	-	-
1	63	51,2	30	34,5	0,47	0,26	0,85	0,01
2	8	6,5	4	4,6	0,49	0,16	1,54	0,36
<i>GSTT1</i>								
0	23	18,7	12	13,8	1,00	-	-	-
1	60	48,8	48	55,2	1,53	0,70	3,49	0,33
2 ou 3	40	32,5	27	31,0	1,29	0,57	2,89	0,67

CNV: *copy number variation*; N: número absoluto de indivíduos; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; p<0,05

Tabela 11. Análise de associação do CNV de *GSTM1* e de *GSTT1* com as chances de segundo tumores primários do carcinoma espinocelular oral

CNV	Ausência de eventos secundários		2º tumores primários		OR	IC 95%		p
	N	%	N	%		Inferior	Superior	
<i>GSTM1</i>								
0	52	42,3	12	54,5	1,00	-	-	-
1	63	51,2	6	27,3	0,41	0,14	1,17	0,13
2	8	6,5	4	18,2	2,17	0,63	8,31	0,26
<i>GSTT1</i>								
0	23	18,7	1	4,5	1,00	-	-	-
1	60	48,8	10	45,5	3,83	0,57	43,33	0,28
2 ou 3	40	32,5	11	50,0	6,32	0,94	70,90	0,09

CNV: *copy number variation*; N: número absoluto de indivíduos; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; p<0,05

Tabela 12. Análise de associação do CNV de *GSTM1* e de *GSTT1* com as chances de metástases à distância do carcinoma espinocelular oral

CNV	Ausência de eventos secundários		Metástases à distância		OR	IC 95%		p
	N	%	N	%		Inferior	Superior	
<i>GSTM1</i>								
0	52	42,3	11	57,9	1,00	-	-	-
1	63	51,2	8	42,1	0,60	0,22	1,64	0,33
2	8	6,5	0	0,0	-	-	-	-
<i>GSTT1</i>								
0	23	18,7	3	15,8	1,00	-	-	-
1	60	48,8	13	68,4	1,66	0,45	5,85	0,55
2 ou 3	40	32,5	3	15,8	0,57	0,13	2,64	0,66

CNV: *copy number variation*; N: número absoluto de indivíduos; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; $p < 0,05$

4.5 Análise de sobrevida global

O período de observação dos pacientes acometidos por CECO, neste estudo, findou-se em 30 de novembro de 2019. Dentre os desfechos apresentados, os óbitos por causa do câncer oral ocorreram em 53,0% (124/234) dos indivíduos analisados, enquanto que 35,5% ($n=82$) deles continuaram vivos até o final do seguimento; os demais desfechos estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Desfechos observados após o fim do período de seguimento dos pacientes acometidos por CECO

Desfecho	Pacientes CECO	
	N	%
VSD	82	35,0
VCD	17	7,3
MOAS	11	4,7
MOCA	124	53,0
Total	234	100,0

CECO: carcinoma espinocelular oral; N: número absoluto de indivíduos; VSD: vivo sem doença; VCD: vivo com doença; MOAS: morte não associada à doença; MOCA: morte pelo câncer

A estimativa da sobrevida global dos pacientes com CECO, por meio da curva de Kaplan-Meier, permitiu observar que a mediana do tempo de sobrevivência foi de 38 meses, com sobrevida global de cinco anos de 44% (Figura 3).

Figura 3 – Curva de sobrevida global. Estimou-se a curva para todos os pacientes acometidos por OSCC

Curvas de sobrevida global foram estimadas em relação a cada número de cópias de *GSTM1*, o que permitiu observar maior sobrevida global dos pacientes com diagnóstico tumoral que apresentaram uma cópia (mediana do tempo de 76 meses) ou duas cópias gênicas (média do tempo de sobrevida de 98,4 meses) em comparação à sobrevida global dos indivíduos que apresentaram zero cópias de *GSTM1* (mediana do tempo de 24,5 meses), em que a comparação de tais curvas de sobrevida global mostrou diferença estatisticamente significante na proporção da ocorrência de óbitos nos três grupos analisados (Log-rank: 8,20; $p=0,02$ – Figura 4).

Figura 4 – Curvas de sobrevida global de acordo com o CNV de *GSTM1*. As curvas foram estimadas segundo cada número de cópias do gene

Também se observou maior sobrevida global para os pacientes com CECO que apresentaram uma ou mais de duas cópias de *GSTT1* (mediana do tempo de sobrevivência de 52,7 e 31,1 meses, respectivamente) em comparação à curva de sobrevida estimada em relação à deleção completa de *GSTT1* (mediana do tempo de sobrevida global de 22,9 meses). Apesar da diferenciação entre as medianas das sobrevidas globais, o padrão de mortes entre os grupos ocorreu de forma similar, uma vez que o teste de Log-Rank não apresentou resultado estatisticamente significativo (Log-rank: 0,79; $p=0,67$), como mostrado na Figura 5.

Figura 5 – Curvas de sobrevida global segundo o CNV de *GSTT1*. As curvas foram estimadas para cada cópia gênica

A dimensão do efeito do CNV de *GSTM1* e de *GSTT1* na associação ao prognóstico de CECO foi definida pela realização da regressão de Cox univariada, a qual mostrou que os pacientes com diagnóstico de CECO e uma cópia de *GSTM1* apresentaram diminuição do risco de morte em 37% (HR: 0,63; IC 95% 0,44-0,91). Por outro lado, a variação do número de cópias do *GSTT1* não foi estatisticamente associada com o prognóstico do carcinoma espinocelular oral (Tabela 14).

Tabela 14. Regressão de Cox univariada para a sobrevida global dos pacientes com CECO, considerando-se o CNV dos genes *GSTM1* e *GSTT1*

CNV <i>GSTM1</i>	HR	IC 95%		p
		Inferior	Superior	
0	1,00	-	-	-
1	0,63	0,44	0,91	0,01
2	0,50	0,23	1,08	0,08
<i>GSTT1</i>				
0	1,00	-	-	-
1	0,83	0,51	1,34	0,44
2 ou 3	0,94	0,56	1,56	0,80

CNV: copy number variation; HR: hazard ratio; IC: intervalo de confiança; p<0,05

4.6 Análise de sobrevida livre de progressão

A Figura 6 mostra a estimativa da curva de sobrevida livre de progressão dos pacientes com CECO cuja mediana do tempo de sobrevivência livre da progressão tumoral foi de 53,8 meses, com sobrevida livre de progressão em cinco anos de 47%.

Figura 6 - Curva de sobrevida livre de progressão dos pacientes com OSCC

Já a curva de sobrevida livre de progressão, em termos do CNV de *GSTM1*, mostrou que o tempo de ocorrência de algum evento secundário (recidiva, segundo tumor primário ou metástase à distância), desde o diagnóstico tumoral, foi maior para os pacientes que apresentaram uma cópia gênica (mediana do tempo de sobrevida livre de progressão: 147,7 meses), seguido dos pacientes com duas cópias de *GSTM1*, em que a mediana da sobrevida foi de 66,2 anos, enquanto que os indivíduos com deleção completa do gene (zero cópias) apresentaram a menor sobrevida livre de progressão com mediana do tempo de 22,9 meses. O teste de Log-Rank permitiu observar que as proporções de ocorrência dos eventos secundários relacionados à progressão de CECO

foram diferentes entre os pacientes que apresentaram números de cópias distintos de *GSTM1* (Log-rank: 11,9; $p < 0,01$), como mostrado na Figura 7.

Figura 7 – Curvas de sobrevida livre de progressão de acordo com o CNV de *GSTM1*. As curvas foram estimadas para cada número de cópias do gene

Diferentemente para a variação do número de cópias de *GSTM1*, observou-se que a sobrevida livre de progressão foi maior para os pacientes com diagnóstico tumoral com zero cópias desse gene (mediana da sobrevivência sem a progressão tumoral de 81,7 meses), enquanto algum evento secundário da progressão de CECO ocorreu em menores tempos tanto para os pacientes com uma cópia gênica (sobrevida livre de progressão mediana de 58,4 meses) quanto para os pacientes com duas ou três cópias de *GSTM1* (tempo mediano de sobrevida livre de progressão de 35,9 meses). Observou-se, ainda, que os eventos de progressão ocorreram de maneira similar entre os indivíduos com quaisquer números de cópias de *GSTM1* (Log-rank: 0,71; $p = 0,7$ – Figura 8).

Figura 8 – Curvas de sobrevida livre de progressão em relação ao CNV de *GSTT1*. As curvas foram estimadas para cada número de cópias gênicas

As análises da regressão de Cox univariada mostraram que o risco da progressão de CECO diminuiu em 50% (HR: 0,50; IC 95% 0,33-0,75) para os pacientes tumorais que apresentaram uma cópia de *GSTM1* (Tabela 14). Por outro lado, apesar da presença do gene *GSTT1* (uma, duas ou três cópias) terem indicado aumento do risco de progressão do câncer, tais resultados não encontraram significância estatística, o que está apresentado na Tabela 15.

Tabela 15. Regressão de Cox univariada para a sobrevida livre de progressão dos pacientes acometidos por CECO, considerando-se o CNV dos genes *GSTM1* e *GSTT1*

CNV <i>GSTM1</i>	HR	IC 95%		p
		Inferior	Superior	
0	1,00	-	-	-
1	0,50	0,33	0,75	<0,01
2	0,62	0,30	1,30	0,20
<i>GSTT1</i>				
0	1,00	-	-	-
1	1,23	0,68	2,20	0,49
2 ou 3	1,30	0,70	2,40	0,40

CNV: *copy number variation*; HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confiança; p<0,05

5. DISCUSSÃO

5.1 Características da população amostral, consumo de cigarros e álcool, características do CECO

Os tumores da cavidade oral parecem assolar a humanidade desde a antiguidade, uma vez que foram identificados, em papiros do Antigo Egito, registros de casos desses tipos tumorais datados em meados de 1600 a 1550 a.C. e também em enciclopédias indianas que foram escritas em Hindu (Inchingolo et al., 2020). Apesar de não ser possível afirmar o tipo histológico desses tumores, nos documentos hindus foram indicados a associação do hábito de mascar a planta betel com o desenvolvimento dos tumores orais (Inchingolo et al., 2020), hábito esse que tem sido elencado como fator etiológico dos casos de CECO na Índia e outras regiões asiáticas (Montero e Patel, 2015).

Os registros dos casos de câncer oral foram documentados ao longo da história, com maior ou menor avanço no conhecimento da doença e seu tratamento dependendo do período e do contexto sociopolítico de cada época (Inchingolo et al., 2020). Durante o século XVI, o consumo do tabaco passou a ser popularizado em todas as camadas sociais no Ocidente, e nesta época também foram registrados o aumento da incidência de CECO, onde se encontra a descrição de casos, em pacientes ingleses, nos livros de Richard Wiseman, em que um deles era um paciente do sexo masculino com 50 anos de idade que fora acometido pelo tumor na língua (Inchingolo et al., 2020).

Por esses documentos, observamos que as características, bem como os hábitos de vida, dos pacientes com câncer oral não parecem destoar dos dados reportados na literatura atual, embora a frequência dos casos passados se mostre menor, o que pode estar relacionado com a baixa expectativa de vida das antigas, médias e modernas civilizações (Inchingolo et al., 2020). Uma vez que as alterações genéticas necessitam ser mantidas na sequência do DNA após sua formação, o que depende da falha e ineficiência do mecanismo de reparo de DNA e/ou a resistência à apoptose, o desenvolvimento e o estabelecimento de CECO demandam décadas para sua ocorrência, o que é evidenciado pela observação de que a maioria dos pacientes do presente estudo foram diagnosticados com a doença em idade superior a 50 anos (62,8%), dados esses concordantes com os estudos de revisão conduzidos por Pezzuto e colaboradores (2015) e Rettig e D'Souza (2015). Entretanto, a incidência do carcinoma espinocelular oral entre os indivíduos com menos de 40 anos mostra-se crescente nos últimos anos (Abati et al., 2020), dado que tem chamado atenção dos pesquisadores e que podem estar relacionados com mutações genéticas distintas daquelas que ocorrem devido à exposição de fatores de risco clássicas, mas tal associação demanda maiores investigações moleculares e genéticas (Leemans et al., 2018).

Além da idade, outro aspecto que chama a atenção dessa neoplasia é a alta proporção de homens acometidos pelo câncer em comparação às mulheres que são afetadas pelo CECO. No presente estudo, observou-se que os portadores desse tipo tumoral se mostraram em proporção de seis homens para uma mulher, dado superior à razão documentada na literatura para outros países ocidentais de 3:1 (Sanderson et al., 1997). Os dados epidemiológicos globais mostram que a incidência de CECO entre os homens é maior (5,8 por 100.000 indivíduos) do que entre as mulheres (2,3 por 100.000

indivíduos), diferença que se mantém ao longo das regiões geográficas, apesar da variação das proporções dos casos (Sarode et al., 2020). No Brasil, esta é a quinta neoplasia mais comum entre os homens e a 13ª entre as mulheres (INCA – estimativa 2020-22). Em nosso estudo, a variável sexo não encontrou associação com o risco de desenvolvimento de CECO, resultado que pode estar relacionado com a tentativa de pareamento, por sexo, entre os pacientes que compuseram o grupo de casos e aqueles que foram agrupados como controles. Entretanto, Rettig e D’Souza (2015) reportaram que os indivíduos do sexo masculino apresentaram risco aumentado, de duas a cinco vezes, em comparação às mulheres, semelhantemente aos demais tumores que acometem a região anatômica da cabeça e do pescoço.

Tal diferenciação de gênero no acometimento da doença se relaciona com o padrão de uso de cigarros e consumo de álcool, os principais fatores de risco, ocidentais, do carcinoma espinocelular oral. A planta do tabaco é nativa das Américas e seu consumo já fazia parte da cultura ameríndia quando Cristóvão Colombo levou as sementes e as folhas para a Espanha de onde o hábito de consumo se expandiu para o restante da Europa e, no final do século XVI, fora exportado para regiões asiáticas como Índia, China e Japão (Hajdu e Vadmal, 2010). A princípio, o tabaco foi amplamente consumido com a finalidade de tratamento e cura de diferentes tipos de doenças, mas tal finalidade passou a ser abandonada a partir do século XIX, quando sua utilização recreativa, principalmente por meio do fumo, começou a crescer atingindo alta popularidade no século seguinte, quando 50% dos adultos eram fumantes nos Estados Unidos da América (EUA) após a II Guerra Mundial (Hajdu e Vadmal, 2010).

A epidemia do tabagismo se inicia com o estabelecimento da taxa de consumo de até 20% entre os indivíduos, o que caracteriza a primeira etapa. Em seguida, na

segunda etapa, o consumo de cigarros alcança níveis entre 40% a 80%, mantendo-se estável até o início do declínio da prevalência tabagista na população (terceira etapa), a qual alcança baixas taxas, o que caracteriza a quarta e última etapa da epidemia (Lee e Hashibe, 2014). Esses estágios ocorrem em tempos distintos entre os países, em que os desenvolvidos já mostram os indícios das fases mais tardias da epidemia tabagista, enquanto que os países em desenvolvimento estão passando pelas primeiras etapas (Lee e Hashibe, 2014). Além disso, a epidemia tabágica também ocorre em fases distintas entre os sexos dos indivíduos (Mackay e Amos, 2003), visto que as mulheres começaram a fumar mais tarde, o que foi apontado por dados oriundos do seguimento de coortes nascidas entre 1900 a 1980 nos EUA, mostrando que a prevalência do uso de cigarros entre os homens passou a aumentar já para a coorte nascida em 1900, enquanto que a prevalência entre mulheres apresentou aumento a partir da coorte de 1920 (Harris, 1983). Essa diferenciação do tabagismo se mantém até os dias atuais, quando em 2018, a prevalência global do uso de cigarros entre os homens (27,5%) continuou a ser superior à das mulheres (4,8% - *World Health Organization*, 2019a). O estabelecimento tardio do tabagismo entre as mulheres pode ser atribuído a convenções sociais, uma vez que os primeiros europeus a fumarem eram indivíduos que faziam parte da tripulação de Cristóvão Colombo, ou seja, os homens (Musk e De Klerk, 2003). Além disso, no século XVII, o núcleo feminino europeu mostrou-se avesso ao consumo de cigarros, devido às primeiras observações de seu malefício, a ponto de comissões femininas terem sido criadas para desestimular as mulheres de se casarem com homens que eram fumantes e também exigir respaldo legal para a permissão do divórcio, quando o cônjuge se tornasse fumante (Hajdu e Vadmal, 2010). Essa rejeição não se manteve e as mulheres passaram a aderir ao tabagismo, mas tal aquisição tornou-se socialmente condenável, convenção que se estendeu a diferentes gerações (Mackay e Amos, 2003).

Além da condenação, outro fator que impediu que mulheres e homens passassem concomitantemente pelas fases da epidemia do cigarro foi a ausência de autonomia financeira das mulheres, as quais até meados do século XX ainda não tinham conquistado a emancipação, apresentando baixo ou nenhum poder aquisitivo por serem impedidas de adentrar ao mercado de trabalho (Mackay e Amos, 2003). O estudo de Paes (2016) reportou que elevados valores do maço de cigarros é um fator que influencia na diminuição da prevalência de seu uso entre as mulheres.

Apesar das diferentes condições que favoreçam a inibição tabagista feminina, o número de mulheres que usam cigarros está apresentando crescimento ou, pelo menos, estabilidade em alguns países europeus (Mackay e Amos, 2003), e se estima que a epidemia tabagista, entre as mulheres, irá atingir seu ápice ao decorrer do século XXI (Mackay e Amos, 2003). Relata-se, ainda, que meninas apresentam maior taxa de consumo de cigarros do que meninos no Reino Unido, Suécia, Áustria, Dinamarca, Alemanha e Finlândia (Mackay e Amos, 2003). Desta forma, a diferença do tabagismo entre homens e mulheres tende a diminuir ao longo do tempo, quando ambos os sexos se encontrarão na mesma etapa da epidemia tabágica, o que poderá levar à equiparação da prevalência de casos de CECO entre mulheres e homens.

Tal estimativa reforça a importância de programas antitabágicos, uma vez que o carcinoma espinocelular oral é um tipo tumoral prevenível, da mesma forma que as demais doenças relacionadas ao uso de cigarros (Soerjomataram et al., 2007). Neste contexto, o Brasil tem ganhado destaque no combate ao uso do tabaco, quando em 1981 as primeiras medidas passaram a ser implementadas e no final da mesma década as propagandas de marcas de cigarro passaram a sofrer restrições legais chegando a ser banidas das mídias mais populares (televisão, rádio, jornais, revistas) no ano de 2000

(*World Health Organization*, 2019b). Além dos anúncios, o fumo em público também foi alvejado sofrendo restrições em meados da segunda metade da década de 1990, quando se permitiu fumar apenas em áreas restritas para fumantes, mas em 2011 a lei passou a proibir o fumo em qualquer lugar público fechado, transportes públicos, áreas de empresas, o que elencou o Brasil como o primeiro país com mais de 100 milhões de pessoas a tornar espaços públicos e ambientes de trabalho livres do tabaco. Outras medidas incluíram o aumento de impostos sobre o cigarro, sendo uma das mais altas entre as Américas e o oferecimento ao tratamento antitabágico pelo Sistema Único de Saúde (SUS), na atenção primária (*World Health Organization*, 2019b). Essas medidas auxiliaram na redução do uso de cigarros no país, com a redução de 15,6% em 2007 para 10,1% em 2017 nas grandes capitais e em adultos a partir dos 18 anos, mas a prevalência tabágica entre os jovens se mantém estável e similar entre meninos (19%) e meninas (17%) que começam a fazer uso durante os anos escolares (*World Health Organization*, 2019a).

Em relação à coloração de pele, chamou-nos atenção que em torno de 68% dos nossos pacientes acometidos por CECO se autorreferiram como brancos, uma vez que os dados epidemiológicos apontavam que a doença seria mais incidente entre os negros do que os indivíduos com coloração de pele branca. Nos EUA, o acompanhamento da incidência de CECO durante os anos de 1975 a 2003 mostrou que as taxas do tumor, entre os homens negros, ultrapassaram àquelas apresentadas pelos caucasianos no início do período e se mantiveram elevadas durante os anos de observação, quando em 2003 sofreu uma redução mostrando-se similar à incidência de CECO em indivíduos de pele branca (Ries et al., 2006). Acredita-se que tal disparidade possa ser observada em outras regiões geográficas, como o Brasil, devido à similaridade entre a exposição aos fatores

de risco clássicos para o desenvolvimento do carcinoma espinocelular oral e também por haver relatos na literatura de que a mortalidade por causa de CECO se mostra superior entre à população brasileira negra (Antunes et al., 2013). Apesar de, em nosso estudo, a cor da pele ter sido autorreferida, e ser difícil afirmar a etnia do indivíduo, o que necessitaria de análises genéticas de marcadores de ancestralidade, devido à alta miscigenação da população brasileira, nossos resultados podem ser considerados fidedignos se considerarmos que a população negra, ao longo da História do Brasil, foi mantida na periferia das cidades, sendo privada dos direitos e benefícios implementados aos demais cidadãos como moradia, educação, saúde, exclusões que contribuíram para a desigualdade étnica do nosso país, a qual se mantém até os dias atuais (Fausto e Fausto, 1994). Assim, o menor acesso ao serviço de saúde pela população negra pode estar relacionado com a frequência diminuída do diagnóstico de CECO em indivíduos não-brancos.

Relata-se, ainda, que talvez a etnia dos pacientes com CECO possa não ser uma característica determinante da doença, pois dados epidemiológicos mais recentes reportaram que a prevalência dessa neoplasia, bem como outras que acometem a região da cabeça e pescoço, passou a se polarizar entre as populações de coloração de pele branca e as de coloração de pele negra, nos EUA (Daraei e Moore, 2015). Além disso, essa neoplasia, no Reino Unido, apresentava maiores taxas em imigrantes moradores de colônias indianas estabelecidas naquela região (Scully e Bedi, 2000), possivelmente indicando que os grupos populacionais com maior vulnerabilidade socioeconômica são mais afetados pela doença (Goodwin et al., 2007) apresentando duas vezes mais chance de desenvolvimento de CECO (Conway et al., 2015), os quais apresentam maior limitação ao acesso à assistência médica e são mais propícios à adesão de hábitos que

tenham fatores de risco tumoral, o que pode evidenciar grupos étnicos específicos na prevalência de CECO. Um dos indicadores utilizados para medir a condição socioeconômica é o nível de escolaridade dos indivíduos (Azimi et al., 2020), o qual se mostrou diminuído entre nossos pacientes tumorais com maior prevalência para zero a sete anos de estudos, ou seja, analfabetismo e o ensino fundamental incompleto, em que a literatura declara que elevado grau de escolaridade está relacionado com maior nível de atenção à ocorrência tumoral propiciando a vigilância e investigações de lesões potencialmente malignas, o que pode prevenir o desenvolvimento de CECO (Johnson et al., 2012). Além disso, Garrett e colaboradores (2019) reportaram que a prevalência do uso de cigarros é elevada entre os indivíduos com menor poder aquisitivo e nível educacional. Relacionados à literatura, observamos que mais de 11 anos de estudos foram associados com a diminuição do risco de desenvolvimento do câncer oral (OR 0,36; IC 95% 0,20-0,67), no presente estudo, o que foi reportado apenas por 6% dos pacientes com CECO.

Chamou-nos a atenção que as características demográficas e de educação, as quais apresentam associação com o risco de CECO, estão interligadas com o hábito do uso de cigarros, indicando que o estilo de vida pode ser o produto final dos níveis culturais, educacionais e das condições econômicas do indivíduo, conjunturas que se mostram relevantes para a implementação de ações de saúde pública com a finalidade de alcançar a prevenção do câncer, o que se mostra centrado no consumo de cigarros. De fato, a maioria (94%) de nossos pacientes tumorais declarou ter fumado em pelo menos algum momento de suas vidas e observamos que a cessação do hábito tabagista pôde diminuir o risco tumoral (OR 2,60; IC 95% 1,34-5,03), em comparação ao consumo de cigarros contínuo (OR 7,71; IC 95% 4,27-13,95), mas ainda elevado em

comparação aos indivíduos que nunca fumaram. São necessários pelo menos 20 anos para que o risco tumoral de um ex-fumante se assemelhe ao risco de um indivíduo que nunca fumou (Marron et al., 2009), uma vez que os compostos carcinogênicos do tabaco, bem como seus efeitos oxidantes, promovem danos moleculares cuja reversão é altamente complexa e, por vezes, pode não ser possibilitada, como a formação de adutos de DNA característicos à exposição tabágica (8-*oxo*-7-*hydrodeoxyguanosine* – 8-oxodG – Ellegaard e Poulsen, 2016), modificação estrutural que leva, se não for reparado, à formação de mutações ao longo do genoma. O estudo de Rajagopalan e colaboradores (2018) realizou a exposição de longo prazo, *in vitro*, dos componentes do cigarro à cultura celular, reportando a detecção de mutações transversais, principalmente do tipo C→A e C→T. Além disso, os pesquisadores também investigaram alterações em CNV e observaram ganho de números de cópias em 2321 genes, os quais se distribuíram, em localização, nos cromossomos 1, 5, 11, 19 e 20. Também foram relatadas alterações na morfologia das células expostas, a diminuição do nível de E-caderina e aumento dos níveis de *Slug*, um dos marcadores da transição epitélio-mesênquima, e ganho de capacidade de invasão, em comparação às células parentais (Rajagopalan et al., 2018) indicando, dessa forma, a amplitude dos danos ocasionados pelo uso do cigarro. Tais efeitos possivelmente apresentam magnitudes distintas dependendo da quantidade de cigarros consumida, o que está evidenciado no fato de termos observado o aumento do risco de desenvolvimento de CECO, que variou de duas a oito vezes, juntamente ao aumento da quantidade de cigarros consumidos, em maços-ano, que fora relatada pelos pacientes com diagnóstico tumoral incluídos em nosso estudo. A análise dos dados da literatura também aponta para aumento do risco de CECO de acordo com o aumento da intensidade de consumo de cigarros (Winn et al., 2015; IARC, 2004) e que o risco pode ser duas vezes maior para os indivíduos que apresentam baixa intensidade do consumo,

em torno de 1 a 10 cigarros por dia (Winn et al., 2015), o que permite inferir que não há nível de segurança à saúde para uso de cigarros, como demonstrado no estudo de Wang e colaboradores (2016).

Concomitantemente com o hábito tabagista, o consumo do álcool também recebe um grande destaque no processo carcinogênico de CECO, sendo que já se está estabelecido o efeito sinérgico da combinação de consumo de cigarro e álcool no aumento do risco tumoral (Hashibe et al., 2009; Vigneswaran e Williams, 2014; Pezzuto et al., 2015), o qual pode se tornar 35 vezes maior (Rettig e D'Souza, 2015). Combinação essa que foi relacionada a altas taxas de casos do câncer de cabeça e pescoço na América Latina (83%), Europa (84%) e nos EUA (51% - Pezzuto et al., 2015). Entretanto, em nosso estudo a análise da regressão logística multivariada revelou a associação do consumo de álcool, entre as quantidades de 12,5g/dia a 49,9 g/dia, com a diminuição do risco de desenvolvimento de CECO (OR 0,30; IC 95% 0,16-0,57). Há tempos em que se é afirmado que o consumo de baixas doses de bebidas alcoólicas resulta em efeito protetor, mas para o sistema cardiocirculatório. De fato, em 2018, Ueta e colaboradores demonstraram que a exposição de diminutas e moderadas doses de etanol a cardiócitos promoveu uma resposta mais eficiente da enzima ALDH2 (aldeído desidrogenase 2), enzima que realiza a metabolização do aldeído, em respostas a danos citotóxicos mais robustos. Transportando a interpretação desses achados para o processo carcinogênico, o consumo diminuto de álcool poderia aumentar a resposta antioxidante dos queratinócitos da mucosa oral e, assim, tornar as células com maior capacidade de defesa contra os agentes genotóxicos e citotóxicos. Ressalta-se que o estudo apresentou direcionamento para o tecido cardíaco sem estender os experimentos para células tumorais. Outrossim, a resposta eficaz de metabolização também depende do DNA dos

indivíduos, uma vez que o gene codificador da ALDH2 apresenta uma mutação que torna a proteína variante com atividade enzimática deficiente (Ueta et al., 2018). Portanto, a análise dos nossos achados deve ser feita de maneira cautelosa havendo a necessidade de estudos funcionais a fim de se encontrar a plausibilidade biológica dos resultados aqui registrados.

O perfil sociodemográfico, educacional e comportamental dos pacientes com CECO também contribuem para alta prevalência do diagnóstico tumoral em estádios avançados, ou seja, classificações TNM III/IV, o que foi observado em torno de 70% dos pacientes com CECO do presente estudo. Como já mencionado anteriormente, o desconhecimento sobre a doença e seus potenciais fatores de risco, bem como o atendimento médico que se torna restrito ao SUS, sistema que apresenta limitação de recursos e acolhimento de pacientes, com longos períodos de espera para o atendimento, resultam no retardo do diagnóstico tumoral. Adicionalmente, o carcinoma espinocelular oral se torna perceptível, por si só, quando se encontra em etapas mais avançadas sendo a causa de ocorrência de dores e a disfunção de atividades fisiológicas (Bagan et al., 2010), o que somado ao elevado tempo de espera para o atendimento especializado, propicia a progressão tumoral sendo comum a ocorrência de metástases regionais em linfonodos cervicais e invasões maxilomandibulares (Kim e Li, 2019). Além disso, o estágio avançado de CECO é um fator relacionado com o prognóstico desfavorável dos pacientes, fato esse que foi observado em 53% dos nossos pacientes que faleceram por causa da doença, corroborando com as baixas taxas de sobrevida de cinco anos, relatadas na literatura, em torno de 40% (Kowalski e Alves, 2016; Abati et al., 2020). Em relação ao sítio anatômico acometido pelo câncer, observamos que a maioria dos pacientes tumorais apresentaram neoplasia na língua e no soalho bucal, padrão

comumente reportado em outros estudos (Rhodus et al., 2014; Kowalski e Alves, 2016), fato esse atribuído à maior exposição direta à fase gasosa do cigarro e seus componentes tóxicos e carcinogênicos, bem como às bebidas alcoólicas.

5.2 Variabilidade do número de cópias de GSTM1 no risco de desenvolvimento de CECO

O carcinoma espinocelular oral é considerado uma doença complexa (Damani Shah et al., 2020) cujas alterações malignas ocorrem ao longo de três etapas: na fase de iniciação ocorrem mutações genéticas, espontâneas ou induzidas por agentes químicos, físicos ou biológicos, principalmente em proto-oncogenes e/ou genes supressores de tumor, o que torna a célula afetada propensa à desregulação do controle do ciclo celular. Uma vez que as células se tornaram iniciadas, os genes acometidos pelas mutações são maciçamente expressos e a célula passa a ter um perfil fenotípico neoplásico, respondendo avidamente aos estímulos proliferativos, o que culmina para a desregulação da replicação celular, tornando-se resistente à morte, modificando-se o controle de migração, efeitos que caracterizam a etapa da promoção tumoral. Já na progressão do câncer, as células tumorais alcançam um perfil maligno com modificações nas vias de sinalização, no metabolismo, na morfologia, com ativação espontânea da proliferação celular, além da invasão e ocorrência de processos metastáticos (Oliveira et al., 2007; Weinberg, 2014). Desta forma, inúmeras mutações genéticas ocorrem ao longo dessas três etapas contribuindo para a alta heterogeneidade do carcinoma espinocelular oral aumentando sua complexidade (Leemans et al., 2018). Assim, estudos das alterações genéticas contribuem para o conhecimento da patogênese da doença, com a subsequente identificação de biomarcadores moleculares para utilização no diagnóstico precoce do câncer, no seguimento e no tratamento dos pacientes. De acordo com Damani Shah e colaboradores (2020), em torno de apenas

5%-10% dos indivíduos altamente expostos aos fatores de risco vão desenvolver CECO, evidenciando que fatores genéticos apresentam papel fundamental para o estabelecimento e progressão do câncer. Neste contexto, a investigação sobre a variabilidade do número de cópias de *GSTM1* e *GSTT1* foi avaliada na presente investigação.

A determinação do número de cópias do gene *GSTM1* revelou a presença de zero a duas cópias, chamando-nos a atenção da frequência diminuta (6,8%) de duas cópias gênicas entre os indivíduos analisados, uma vez que a respectiva proteína apresenta um papel fundamental na defesa do ambiente intracelular. Outrossim, frequências similares foram reportadas por diferentes estudos que realizaram a distinção entre as cópias de *GSTM1* (Karageorgi et al., 2011; Nørskov et al., 2011a; Nørskov et al., 2011b), em que o fator comum entre tais investigações é o fato de terem sido conduzidas em populações caucasianas. Já o estudo de Emeville e colaboradores (2014) foi realizado em uma população composta apenas por caribenhos de ascendência africana subsaariana, em que se reportou a detecção de até quatro cópias de *GSTM1*, diminuta frequência de zero cópias gênicas e frequência das duas cópias mais elevadas (22,5%) em comparação aos nossos achados e aos demais estudos supracitados. As proporções dos números de cópias de *GSTM1* se distribuem distintamente em caráter polimórfico entre as populações, como já observado por Almal e Padh (2012). A deleção completa (zero cópias) do gene já foi bem estabelecida entre as diferentes regiões geográficas mundiais, quando estudos apenas avaliavam a presença ou ausência do *GSTM1*. As investigações prévias revelaram a inexistência de alelos do *GSTM1* em torno de 29% em populações africanas subsaarianas, enquanto que entre populações caucasianas, a deleção se estabelece em torno 45% a 50% (Saitou e Ishida, 2015),

frequência essa também encontrada em nossa amostra. As diferentes frequências interétnicas podem ser resultado do processo de seleção natural ao longo da evolução da humanidade, em que mudanças de comportamento, alimentação e ambiente propiciaram a exposição a diferentes xenobióticos, os quais apresentam predominância geográfico-específica (Hancock et al., 2010; Richerson et al., 2010; Mortensen et al., 2011; Saitou e Ishida, 2015; Saitou et al., 2018). Vale a pena ressaltar que a variabilidade do número de cópias é uma modificação na estrutura do DNA que também conferiu adaptação do *Homo sapiens* ao ambiente (Sudmant et al., 2015).

Em nossas análises, duas cópias de *GSTM1* foram associadas com a diminuição do risco do carcinoma espinocelular oral (OR 0,47; IC 95% 0,24-0,92), resultado que permite apontar que o aumento do número de cópias desse gene possa contribuir com níveis elevados da taxa de detoxificação celular, uma vez que o benzo[α]pireno (B[a]P), composto presente no cigarro e um substrato da enzima GSTM1 (Hayes et al., 2005), é um dos carcinógenos mais potentes contra a saúde humana contribuindo para o desenvolvimento de CECO (IARC, 2009). Desta forma, as duas cópias de *GSTM1* poderiam aumentar os níveis de expressão gênica e da atividade enzimática, o que levaria à maior taxa de conjugação dos epóxidos de B[a]P com a glutathione e evitaria sua ligação com as macromoléculas celulares, incluindo o DNA. De fato, já se foi demonstrado a relação entre as duas cópias de *GSTM1* e o aumento dos transcritos gênicos, ou seja, níveis de RNA mensageiro (mRNA – McCarrol et al., 2006; Zhang et al., 2013), enquanto que McLellan e colaboradores (1997) reportaram elevada atividade enzimática em indivíduos que apresentam duas cópias de *GSTM1*. O possível aumento da eficiência de detoxificação pela presença das duas cópias do gene se mostra ainda mais plausível no presente estudo, uma vez que os pacientes com CECO da amostra

apresentaram consumo de cigarros em quantidades elevadas por longos períodos de tempo, hipótese essa que poderá ser confirmada em estudos funcionais. Nosso resultado se mostra promissor, mas temos a ciência de que houveram pacientes que, mesmo com as duas cópias de *GSTM1*, desenvolveram o CECO, o que nos faz atentar para outros fatores que contribuem para o estabelecimento dessa doença. O processo de biotransformação celular é composto por múltiplas etapas em que as enzimas que atuam na primeira fase também são codificadas por genes polimórficos, como o *CYP1A1**2A que apresenta um SNP cuja transição T→C resulta em uma enzima de maior atividade (Petersen et al., 1991; Tanimoto et al., 1999). Esta enzima catalisa a ativação de B[a]P, em que indivíduos com o alelo polimórfico possuem maior taxa de formação dos seus epóxidos. Observamos que metade dos nossos pacientes com diagnóstico tumoral e duas cópias de *GSTM1* apresentaram genótipo heterozigoto para o SNP de *CYP1A1**2A (dados não apresentados). Além disso, a fase II do processo de biotransformação celular também é composta por demais famílias enzimáticas que participam da detoxificação das células, bem como se deve considerar o quão eficiente o sistema de reparo de DNA está funcionando nesses indivíduos, o que não foi avaliado no presente estudo.

Ainda que nossas análises necessitem ser reproduzidas em uma população mais abrangente para a confirmação de nossos achados, a implementação da determinação do CNV de *GSTM1* poderia ser considerada como ferramenta auxiliar na detecção precoce de CECO entre pacientes altamente expostos aos fatores de risco da doença, principalmente o uso de cigarros, dado que o diagnóstico tumoral em seu início favorece o prognóstico da doença, em que a taxa de sobrevivência é em torno de 80% a 90% (Bagan et al., 2010). Considera-se, ainda, que a análise de lesões potencialmente malignas não é corriqueiramente realizada, além de apresentar um processo de formação heterogêneo

entre os pacientes dificultando, desta forma, sua identificação e tratamento (Speight et al., 2018). Além disso, a avaliação de CNV de *GSTM1*, aliado à elevada carga tabágica do indivíduo, poderia ser utilizado como um argumento mais reforçado na insistência de tratamentos antitabágicos e sua adesão pelo paciente, dado que tais terapêuticas são disponíveis nos serviços de saúde e, assim, promover a prevenção do desenvolvimento do câncer, o que pode reduzir os gastos com tratamento da doença. O gasto do SUS com internações e tratamento às neoplasias associadas ao tabagismo representou 36,3% do custo total destinado ao tratamento antitumoral no ano de 2005, em que os tumores da cavidade oral, lábio e faringe apresentaram os maiores gastos (Pinto e Ugá, 2010).

5.3 Variabilidade do número de cópias de GSTM1 na progressão de CECO e sobrevida dos pacientes

A ocorrência de eventos secundários relacionados à progressão tumoral se deve principalmente pela falha do tratamento primário com intenção de cura do câncer. Relatos da literatura reportam que aproximadamente 45% dos pacientes com CECO desenvolvem recorrências, segundo tumores primários ou metástases à distância após serem submetidos a terapêuticas antitumorais iniciais (Mucke et al., 2009; Rogers et al., 2009). Além disso, a progressão tumoral também está vinculada ao estadió avançado da doença, quando a alta taxa de proliferação das células tumorais demanda maior suprimento de energia e nutrientes, alterando o metabolismo do câncer para um perfil glicolítico (efeito Warburg), o que ocasiona a disfunção da cadeia respiratória promovendo a liberação de elétrons e a consequente formação de ROS (Costa et al., 2014). O uso de cigarro a longo prazo também é outro fator associado à progressão do carcinoma espinocelular oral (Kim e Li, 2019), uma vez que a exposição aos carcinógenos, juntamente ao acúmulo intracelular de ROS, contribui para a formação de

mutações genéticas que conferem o fenótipo maligno das células afetadas, culminando na evolução da doença (Gleber-Neto et al., 2015). Observou-se, no presente estudo, que a maioria dos pacientes oncológicos que desenvolveram algum evento secundário não cessou o uso de cigarros e apresentaram elevadas cargas tabágicas. Chama-se atenção para o grupo de metástases à distância, em que quase a totalidade dos indivíduos (94,7%) continuou a fumar cigarros, enquanto que os pacientes remanescentes declararam ser ex-fumantes.

Em relação ao CNV de *GSTM1* e os eventos secundários relacionados à progressão tumoral, foi observado que uma cópia do gene se apresentou associada (OR 0,47; IC 95% 0,26-0,85) com a diminuição das chances de ocorrência da recidiva tumoral. Neste cenário, uma cópia gênica poderia apresentar papel fundamental para garantir o mecanismo de detoxificação celular e impedir que mais danos sejam causados pela presença constante de espécies reativas de oxigênio e carcinógenos provenientes dos fatores clássicos nos campos de cancerização ao longo da mucosa oral, onde se alojam células iniciadas. Talvez seja possível considerar, ainda, a modulação da expressão de *GSTM1*, e seu subsequente aumento, devido à presença de agentes oxidantes no citoplasma das células, uma vez que se já reportou que a exposição a alguns tipos de xenobióticos promove o aumento da expressão das enzimas metabolizadoras (Rushmore e Kong, 2002), sendo B[a]P um desses compostos, o qual é capaz de ativar a expressão gênica de enzimas das distintas fases do processo de biotransformação (Nguyen et al., 2003). Desta forma, uma cópia de *GSTM1* poderia alcançar níveis enzimáticos semelhantes àqueles que equivalem a duas cópias do gene, consideração essa que demanda a realização de investigações funcionais para averiguação. Além da função detoxificadora, tem-se relatado que a proteína GSTM1,

em monômero, apresenta papel na regulação da via de sinalização de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), por ser capaz de interagir fisicamente e sequestrar a proteína ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) mantendo sua inativação (Singh, 2015). ASK1 faz parte da família das MAPKs e realiza a ativação de JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), molécula envolvida em diferentes processos celulares como proliferação, diferenciação, migração e se mostra participante na progressão de CECO (Gkouveris e Nikitakis, 2017). Desta forma, uma única cópia de *GSTM1* poderia contribuir para manter a inibição de ASK1 e impedir a progressão da doença.

Embora duas cópias de *GSTM1* não tenham sido associadas com as chances de desenvolvimento dos eventos secundários de progressão de CECO, o que possivelmente possa ser efeito do número absoluto diminuto de pacientes para cada grupo e em cada categoria, consideramos que tais cópias apresentam papel diferencial na progressão do câncer, especialmente pela função proteica detoxificante previamente relatada, o que está evidenciado no fato de que, em nenhum dos pacientes tumorais que apresentaram metástases à distância, detectou-se as duas cópias desse gene. Adicionalmente, Zhang e colaboradores (2013) reportaram a associação da diminuição do risco de recorrências e/ou segundo tumores primários e as duas cópias de *GSTM1*, entretanto, os autores analisaram os dois eventos em conjunto em uma população amostral de câncer de cabeça e pescoço, análise essa realizada separadamente no presente estudo.

Por fim, os achados de nossa investigação foram complementados pelas análises de sobrevida dos pacientes, tanto livre de progressão quanto pela sobrevida global, em que uma cópia de *GSTM1* diminuiu o risco de eventos relacionados à progressão de CECO, em 50% (HR 0,50; IC 95% 0,33-0,75), assim como o risco de morte desses pacientes (HR 0,63; IC 95% 0,44-0,91), resultados que reforçam o papel imprescindível

da proteína GSTM1 para manter a homeostasia celular e garantir a integridade do tecido ao neutralizar, ou pelo menos amenizar, a toxicidade dos carcinógenos e demais compostos eletrofílicos (oriundos do mecanismo de progressão da doença ou de irradiação/quimioterápicos), o que propicia a recuperação do organismo aumentando as chances de sobrevivência do paciente. Considera-se, ainda, que uma parcela dos pacientes acometidos por CECO apresenta comorbidades que agravam a qualidade de vida desses indivíduos e aumentam as chances de evolução a óbito (Ong et al., 2017). Tais comorbidades por vezes são consequências do consumo de cigarros, as quais podem ser prevenidas ou atenuadas na presença de *GSTM1* no genoma dos pacientes, uma vez que esse gene é expresso em diferentes tecidos do organismo humano (Board e Menon, 2013). De fato, as curvas de Kaplan-Meier mostraram que os pacientes com uma ou duas cópias de *GSTM1* apresentaram menor frequência de morte, em comparação aos óbitos ocorridos entre os pacientes com zero cópias gênicas. Esses achados reforçam a hipótese de que duas cópias de *GSTM1* também podem fazer diferença nas sobrevidas livre de progressão e global dos pacientes, apesar de não termos encontrado tais observações, possivelmente por causa do pequeno número de indivíduos, mas já se foi reportado que duas cópias desse gene foram relacionadas com a diminuição do risco de recorrências e/ou segundo tumores primários, entre pacientes com câncer de cabeça e pescoço (Zhang et al., 2013b).

Aponta-se a necessidade da reprodução destas análises em uma população amostral maior para a confirmação de nossos achados. Entretanto, os resultados do nosso estudo sugerem que o CNV de *GSTM1* pode ser considerado um fator prognóstico de CECO promissor, uma vez que preditores moleculares se mostram melhores ferramentas para o acompanhamento dos pacientes com CECO e para

detecção precoce dos eventos secundários relacionados à progressão da doença, bem como oferecer a aplicação de tratamentos mais avançados e que se mostram mais eficazes, como as imunoterapias (Szturz e Vermorken, 2020) e outras terapias-alvo, as quais apresentam custos elevados e não são amplamente ofertadas pelo SUS. Ressalta-se, ainda, que a utilização das características clinicopatológicas do tumor como fatores prognósticos de CECO mostram resultados conflitantes na literatura (Yanamoto et al., 2012; Weckx et al., 2019), o que justifica a busca por preditores moleculares da doença.

5.4 Variabilidade do número de cópias de GSTT1 no risco e progressão de CECO e sobrevida dos pacientes

Identificou-se a variação de zero a três cópias de *GSTT1* no presente estudo, achado também reportado por outros estudos presentes na literatura (Karageorgi et al., 2011; Nørskov et al., 2011b; Emeville et al., 2014). Interessante observar que em torno de 79% dos sujeitos de pesquisa com ausência de *GSTM1* apresentaram pelo menos uma cópia de *GSTT1*, o que permite indicar, num primeiro momento, possível efeito compensatório entre estas classes proteicas, dado que GSTs de classe distintas compartilham em torno de 25%-30% de homologia entre suas sequências de aminoácidos, possibilitando a sobreposição de substratos (Singh, 2015). Entretanto, observamos que, para o cenário do carcinoma espinocelular oral, tal mecanismo de compensação possa não ser aplicável para nossa amostra, uma vez que as análises realizadas não encontraram associações estatisticamente significantes entre uma, duas ou três cópias de *GSTT1* e o risco de desenvolvimento do câncer, as chances de progressão da doença e a sobrevida dos pacientes. O que nos leva a refutar as afirmações de que a conjugação entre os carcinógenos do cigarro e a glutiona também

seja catalisada pela enzima GSTT1, atividade essa que poderia ser averiguada em estudos funcionais.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo permite-nos concluir que o gene *GSTM1* apresenta variação entre zero a duas cópias, enquanto que o gene *GSTT1*, entre zero a três cópias para ambos os grupos (pacientes com CECO e controles);

A frequência de duas cópias do *GSTM1* foi maior no grupo controle comparada a dos pacientes oncológicos, o que foi associado com a diminuição do risco em 53% do desenvolvimento de CECO (OR 0,47; IC 95% 0,24-0,92). Por outro lado, as frequências dos números de cópias do gene *GSTT1* não foram associadas com o risco de CECO;

Em relação à progressão tumoral avaliada (recorrências, segundo tumores primários e metástases à distância), uma cópia de *GSTM1* se mostrou associada apenas às chances de recorrências de CECO (OR 0,47; IC 95% 0,26-0,85), enquanto que o CNV de *GSTT1* não foi associado com os eventos secundários;

Os pacientes com CECO que apresentaram uma e duas cópias de *GSTM1* tiveram maior tempo de sobrevida global e sobrevida livre de progressão. Além disso, uma cópia de *GSTM1* diminuiu o risco de morte (HR 0,63; IC 95% 0,44-0,91) e também o risco de progressão da doença (HR 0,50; IC 95% 0,33-0,75), podendo ser considerado um possível fator prognóstico de CECO. O CNV de *GSTT1*, por sua vez, não foi associado com o desfecho dos pacientes acometidos pelo carcinoma espinocelular oral.

Dessa forma, nossos achados sugerem que a determinação do CNV de *GSTM1* se mostra uma ferramenta molecular auxiliar de predição tanto do desenvolvimento de CECO quanto de sua progressão, especialmente entre os pacientes altamente expostos aos fatores de risco, como o consumo de cigarros, e, assim, melhorar o prognóstico dos pacientes. Reitera-se, ainda, que para o CNV de *GSTM1* ser aplicado à clínica, são necessários estudos confirmatórios de que tal alteração seja, de fato, biomarcador do carcinoma espinocelular oral.

7. LIMITAÇÃO DO ESTUDO

As GSTs também apresentam papel importante na metabolização de quimioterápicos, o que viabiliza a investigação da variabilidade do número de cópias desses genes e a eficácia do tratamento antitumoral, fator que também influencia a ocorrência da progressão e o prognóstico da doença. Entretanto, não foi possível a análise de tal associação, na presente investigação, devido à informação imprecisa do tipo de tratamento aplicado aos pacientes com diagnóstico de CECO.

A casuística empregada na presente investigação é considerada pequena, em que a reprodução das análises em uma população amostral maior possibilite a apresentação de associações mais robustas e também a observação de resultados anteriormente não descritos. Entretanto, tais associações, as quais são provenientes de um estudo de caráter retrospectivo, limitam-se à formação de hipóteses que necessitam ser comprovadas por meio da realização de estudos prospectivos.

8. ANEXOS

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**ESTUDO INTERNACIONAL SOBRE AMBIENTE, VÍRUS E DOENÇAS DA
CAVIDADE ORAL E LARINGE**

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do paciente:
 Documento de identidade: Sexo M F.....
 Data de nascimento:
 Endereço:
 Bairro: Cidade: Estado:
 CEP: Telefone: (.....)

2. Responsável legal:
 Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):
 Documento de identidade: Sexo M F.....
 Data de nascimento:
 Endereço:
 Bairro: Cidade: Estado:
 CEP: Telefone: (.....)

II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. Título do protocolo de pesquisa: "Estudo internacional sobre ambiente, vírus e doenças da cavidade oral e laringe".

Pesquisadores responsáveis:
 José Eluf Neto, CREMESP: 22183, Professor Doutor, Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da USP.
 Victor Wunsch Filho, CREMESP: 28777, Professor Doutor, Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP.

2. Avaliação do risco da pesquisa:
 Os procedimentos da pesquisa apresentam risco mínimo de ocorrência de algum dano imediato ou tardio para o participante.

3. Duração da pesquisa: agosto de 1998 a julho de 2001.

III. REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA

Nós estamos conduzindo um estudo no Brasil e em outros países para investigar se certas características e hábitos dos homens e das mulheres estão relacionados com algumas doenças. Para isso estamos solicitando aos pacientes neste e em outros hospitais para participarem da pesquisa.

A sua participação na pesquisa inclui: a) responder a perguntas de um questionário; b) o exame da boca e coleta de algumas células com uma escova de dentes e c) a coleta de uma amostra de sangue de 15 ml por punção venosa. Esclarecemos que estes procedimentos podem lhe trazer algum desconforto.

Dependendo da sua doença e, somente se isto fizer parte dos procedimentos habituais e necessários de diagnóstico ou de tratamento de sua doença, serão coletadas pelo seu médico assistente amostras de tecido da parte doente e isto fará parte dos dados da pesquisa.

IV. ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

Todas as informações prestadas durante a entrevista serão de caráter confidencial e as informações colhidas serão utilizadas somente para fins científicos descritos no protocolo desta pesquisa, sem qualquer identificação pessoal.

Qualquer provável benefício do estudo para o bem-estar da população depende da exatidão de suas respostas. Portanto, se o (a) Sr.(a) não entender alguma das questões, por favor solicite todos os esclarecimentos que julgar necessário sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa ou qualquer outra dúvida.

O(A) Sr.(a) tem a liberdade de não participar do estudo e retirar seu consentimento a qualquer momento deixando de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade de sua assistência.

Para quaisquer danos à saúde decorrentes dos procedimentos necessários para a pesquisa o (coleta de sangue e de células da mucosa oral) o(a) Sr. (a) será ressarcido pela pesquisa em compensação pelas despesas exclusivas decorrentes destes danos.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

Esther M. O. A. de Camargo Andrade. End.: Rua Vito Bovino, 477
Fone/fax: (011) 5632-0675

Sérgio Guerra Sartor. End.: Av. Caminho do Mar, 2131, apt. 36
Fone: (011) 7764-2020

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo,/...../.....

(assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal)

(assinatura do pesquisador)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

- 1. NOME DO PACIENTE**
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº **SEXO:** M () F ()
DATA NASCIMENTO:/...../.....
Endereço **Nº**
Complemento: **BAIRRO:**
CIDADE
CEP: **TELEFONE: DDD (.....)**
- 2. RESPONSÁVEL LEGAL**
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: **SEXO:** M () F ()
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: **Nº** **APTO:**
BAIRRO: **CIDADE:**
CEP: **TELEFONE: DDD (.....)**

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

- 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** Avaliação de Polimorfismos Genéticos em Pacientes com Câncer de Cabeça e Pescoço
- 2. PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:**
 Gilka Jorge Figaro Gattás, CRBM: 2654. Professora Doutora, Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do trabalho - Faculdade de Medicina da USP.
 Marcos Brasilino de Carvalho, CREMESP: 17212. Diretor das Clínicas Cirúrgicas - Hospital Heliópolis - São Paulo, SP
 José Eluf Neto, CREMESP: 22183. Professor Doutor, Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da USP.
 Victor Wunsch Filho, CREMESP: 28777, Professor Doutor, Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP.
- 3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**
SEM RISCO	x RISCO MÍNIMO	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	
- Os procedimentos da pesquisa apresentam risco mínimo de ocorrência de algum dano imediato ou tardio para o participante.
- 4. DURAÇÃO DA PESQUISA :** Janeiro de 2003 a Janeiro de 2006

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Este estudo está sendo realizado na Faculdade de Medicina da USP, em colaboração com o Hospital Heliópolis, com o objetivo de avaliar as certas características biológicas e hábitos dos homens e das mulheres estão relacionados com algumas doenças. Para isso estamos solicitando sua participação voluntária. Esta participação inclui:

- Responder a um questionário com questões sobre as atividades desenvolvidas no trabalho e no lar, hábitos de vida, condições de trabalho, de saúde e outras.
- Coleta de uma amostra de sangue, 10 ml, por punção venosa. Este procedimento poderá trazer-lhe algum desconforto, mas servirá para avaliar as possíveis alterações genéticas.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Qualquer provável benefício do estudo para o bem-estar da população depende da exatidão de suas respostas. Portanto se o(a) Sr.(a) não entender alguma das questões, por favor solicite todos os esclarecimentos que julgar necessário sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa ou qualquer outra dúvida.

2. O(A) Sr.(a) tem a liberdade de não participar do estudo e retirar seu consentimento a qualquer momento deixando de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade de sua assistência oferecida no Hospital das Clínicas da FMUSP.

3. Todas as informações dadas durante a entrevista serão de caráter confidencial e, após colhidas, serão utilizadas somente para os fins científicos descritos no protocolo desta pesquisa, sem qualquer identificação pessoal.

4. Para quaisquer danos à saúde decorrentes dos procedimentos necessários para a pesquisa, como por exemplo a coleta de sangue, você poderá contar com o atendimento no Hospital Heliópolis.

5. Caso seja necessário, você será ressarcido nas despesas decorrentes destes danos.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

Marcos Brasilino de Carvalho. End.: Cônego Xavier, 276

Fone: (11) 274-7600 – Hospital Heliópolis – São Paulo, SP

Gilka Jorge Fígaro Gattás. End.: Rua Teodoro Sampaio, 115

Fone: (11) 3055-9677 – Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do trabalho - Faculdade de Medicina da USP.

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, _____ de _____ de _____

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

HOSPITAL DAS CLINICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº.....SEXO:M () F ()

DATA NASCIMENTO: / /

Endereço.....Nº

Complemento:.....

BAIRRO:.....

CIDADE:.....

. CEP: TELEFONE: DDD ()

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M () F ()

DATA DE NASCIMENTO//.....

ENDEREÇO:.....NºAPTO: ".....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP: TELEFONE: DDD ()

II- DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Polimorfismos Genéticos e o risco de câncer de cabeça e pescoço

2. PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Gilka Jorge Fígaro Gattás, CRBM: 2654. Professora Doutora, Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho - Faculdade de Medicina da USP.

""

Marcos Brasilino de Carvalho, CREMESP: 17212. Diretor das Clínicas Cirúrgicas - Hospital Heliópolis - - São Paulo, SP

Dr. Otávio Alberto Curioni - Hospital Heliópolis - - São Paulo, SP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	X RISCO MÍNIMO	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	

Os procedimentos da pesquisa apresentam risco mínimo de ocorrência de algum dano imediato ou tardio para o participante.

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 01 Agosto 2006 a Agosto de 2008

III- REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Este estudo está sendo realizado na Faculdade de Medicina da USP, em colaboração com o Hospital Heliópolis, com o objetivo de avaliar se certas características biológicas e hábitos dos homens e das mulheres estão relacionados com algumas doenças. Para isso estamos solicitando sua participação voluntária. Esta participação inclui:

- a) Responder a um questionário com questões sobre as atividades desenvolvidas no trabalho e no lar, hábitos de vida, condições de trabalho, de saúde e outras.
- b) Coleta de uma amostra de sangue, 10 ml, por punção venosa. Este procedimento poderá trazer-lhe algum desconforto, mas servirá para avaliar as possíveis alterações genéticas.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Qualquer provável benefício do estudo para o bem-estar da população depende da exatidão de suas respostas. Portanto se o(a) Sr.(a) não entender alguma das questões, por favor solicite todos os esclarecimentos que julgar necessário sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa ou qualquer outra dúvida.

2. O(A) Sr.(a) tem a liberdade de não participar do estudo e retirar seu consentimento a qualquer momento deixando de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade de sua assistência oferecida no Hospital Heliópolis.

3. Todas as informações dadas durante a entrevista serão de caráter confidencial e, após colhidas, serão utilizadas somente para os fins científicos descritos no protocolo desta pesquisa, sem qualquer identificação pessoal.

4. Para quaisquer danos à saúde decorrentes dos procedimentos necessários para a pesquisa, como por exemplo a coleta de sangue, você poderá contar com o atendimento no Hospital Heliópolis.

5. Caso seja necessário, você será ressarcido nas despesas decorrentes destes danos.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES

ADVERSAS:

Marcos Brasilino de Carvalho. End.: Cônego Xavier, 276

Fone: (11) 274-7600 - Hospital Heliópolis - São Paulo, SP

Gilka Jorge Fígaro Gattás. End.: Rua Teodoro Sampaio, 115

Fone: (11) 3085-9677 - Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho. Faculdade de Medicina da USP.

VI - CONSENTIMENTO PÓS ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo,de.....de.....

(assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal)

(assinatura do pesquisador (carimbo ou nome Legível))

Anexo B – Aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa das Instituições envolvidas

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09.04.03, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **115/03**, intitulado: "Avaliação de polimorfismos genéticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço" apresentado pela ÁREA DE FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador(a) Responsável: PROFA. DRA. GILKA JORGE FÍGARO GATTÁS

Pesquisador(a) Executante: DRA. MARIA SALETE SIRAQUE GARCEZ

CAPPesq, 09 de Abril de 2003.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

inscreva-se à CPG-FMUSP

as devidas providências.

1104103

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

Dr. Pontoni

a. Maria Mitzu Brentani
coordenadora do Curso de
Educação do programa
Patologia Experimental

RECEBIDO SPG

ASS:

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 24.03.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **148/05**, intitulado: "Marcadores moleculares em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cavidade bucal" apresentado pelo Departamento de **MEDICINA LEGAL, ÉTICA MÉDICA E MEDICINA SOCIAL E DO TRABALHO**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Dra. Gilka Jorge Figaro Gattás**

CAPPesq, 24 de Março de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

COMPLEXO HOSPITALAR HELIÓPOLIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

São Paulo, 15 de fevereiro de 2005.

Ao

Dr. Otávio Alberto Curioni.

Informamos que o projeto de pesquisa: **"Marcadores moleculares em pacientes portadores de carcinoma epidermóide da cavidade bucal"**, registrado neste CEP sob nº374, tendo como relator Dr. Marcos Brasilino de Carvalho foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa no dia 15/02/2005.

Atenciosamente,

Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
Coordenador

MINISTERIO DA SAUDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa: MALCAJORES MOLECULARES EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO		01/2000	
2. Área do Conhecimento (Ver relação no verso) MEDICINA		3. Código: 4. 01	4. Nível: (Só áreas do conhecimento 2 a 4) T
5. Área(s) Temática(s) Especial (s)		6. Código(s):	7. Fase: (Só área temática 3) I () II () III () IV ()
8. Unitermos:			
SUJEITOS DA PESQUISA			
9. Número de sujeitos		10. Grupos Especiais: <18 anos () Portador de Deficiência Mental () Embrão/Feto () Relação de Dependência (Estudantes, Militares, Presidiários, etc) () Outros () Não se aplica ()	
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
11. Nome: OTAVIO ALBERTO CURIONI			
12. Identidade: 10558433		13. CPF: 12337423857	
14. Nacionalidade: BRASIL		15. Profissão: PEDECO	
16. Maior Titulação: RETE		17. Cargo: PEDECO	
18. Instituição a que pertence: HOSPITAL HENRIQUE		19. Endereço (Rua, nº): COM. XAVIER	
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumpro os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Data: 31/01/05		20. CEP: 04231030	
		21. Cidade: SÃO PAULO	
		22. UF: SP	
		23. Fone: 619145576	
		24. Fax: 83766743	
		25. E-mail: 303R.CURIONI@al.com	
INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO			
26. Nome: HOSPITAL HENRIQUE		29. Endereço (Rua, nº): CAR. XAVIER	
27. Unidade/Orgão: Serviço Cirúrgico Cabeça e Pescoço		30. CEP: 04231030	
28. Participação Estrangeira: Sim () Não (X)		31. Cidade: SÃO PAULO	
		32. UF: SP	
		33. Fone: 619145576	
		34. Fax: 83766743	
35. Projeto Multicêntrico: Sim () Não (X) Nacional (X) Internacional () (Anexar a lista de todos os Centros Participantes no Brasil)			
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumpro os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução			
Nome: _____		Cargo: _____	
Data: 23/02/05		Assinatura: _____	
PATROCINADOR			
36. Nome: _____			
37. Responsável: _____			
38. Cargo/Função: _____			
39. Endereço: _____			
40. CEP: _____		41. Cidade: _____	
42. UF: _____		43. Fone: _____	
44. Fax: _____			
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP			
45. Data de Entrada: 11/02/05		46. Registro no CEP: 379	
47. Conclusão: Aprovado (X)		48. Não Aprovado ()	
Data: 15/2/05		Data: _____	
49. Relatório(s) do Pesquisador responsável previsto(s) para: _____			
Encaminhamento a CONEP: 50. Os dados acima para registro () 51. O projeto para apreciação (X) 52. Data: _____			
53. Coordenador: _____		Assinatura: _____	
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA - CONEP			
54. Nº Expediente		55. Data Recebimento: _____	
56. Processo: _____		57. Registro na CONEP: _____	
58. Observações: _____

COMPLEXO HOSPITALAR HELIÓPOLIS

N. ° do CEP: 374.	Data de entrada: 01/02/2005
Data de aprovação: 15/02/2005.	Data de encerramento:
Autor: Dr. Otávio Alberto Curioni.	
Relator: Dr. Marcos Brasilino de Carvalho.	
Título: "Marcadores moleculares em pacientes portadores de carcinoma epidermóide da cavidade bucal".	
Obs:	

Rua Cônego Xavier, 276 – Sacomã – São Paulo – PS-Externo – CEP 04231-030 Fone: 6215-1001/274-
7600 ramal 105 – E-mail: cep@hospitalheliopolis.org.br e Site www.hospitalheliopolis.org.br

Rua Cônego Xavier, 276 – Sacomã – São Paulo – PS-Externa – CEP 04231-030 Fone: 6215-1001/274-
7600 ramal 105 – E-mail: cep@hospitalheliopolis.org.br e Site www.hospitalheliopolis.org.br

Anexo C – Questionário Padronizado**QUESTIONÁRIO SOBRE HÁBITOS DE VIDA**

Data: ____/____/____. Reg. Hosp.: ____ Reg. Lab.: ____ Reg. Proj.: ____

Nome: _____

Endereço: _____ n.º: ____ apto: ____

Bairro: _____ Cidade: _____ U.F.: ____

CEP: _____ Telefone: (____) _____

Entrevistador: _____

INFORMAÇÕES GERAIS**A1 Estado:** (1) Caso (2) Controle**A2 Data de nascimento:** ____/____/____**A3 Clínica do hospital:**

(1) Clínica Médica	(7) Dermatologia
(2) Cirurgia	(8) Oftalmologia
(3) Gin / Obst	(9) Odontologia
(4) Ortopedia	(10) Radioterapia
(5) Oncologia	(11) Ambulatório
(6) Otorrino	(12) Outro

A4 Diagnóstico principal da baixa hospitalar: _____

A5 Data da admissão hospitalar ____/____/____

A6 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino

A7 Idade em anos completos _____

A8 Grupo étnico?

(1) branco (2) mulato (3) negro (4) índio (5) oriental

Cor pele pai: _____ Cor pele mãe: _____

A9 Qual a cidade onde mora?

A10 Há quanto tempo mora nesta cidade?

A11 Em qual cidade o(a) Sr.(a) nasceu?

A12 O(a) Sr.(a) frequentou a escola? (1) sim (2) não

A13 Qual o último ano completo que o(a) Sr.(a) terminou na escola?

A14 Até qual grau o(a) Sr.(a) estudou?

HÁBITO DE FUMAR

B1 O(a) Sr.(a) fuma ou já fumou em média 1 cigarro ou charuto ou cachimbo, diariamente, pelo menos por 1 ano?

(1) sim ainda fuma

(2) nunca fumou

(3) somente no passado

B2 O(a) Sr.(a) fuma ou já fumou cigarro?

(1) sim

(2) não

Idade início _____ idade que parou _____ tipo cigarro _____ nº/dia _____

Idade início _____ idade que parou _____ tipo cigarro _____ nº/dia _____

Idade início _____ idade que parou _____ tipo cigarro _____ nº/dia _____

Tipo 1: manufaturado, com filtro

Tipo 2: manufaturado, sem filtro

Tipo 3: enroladinho de papel

Tipo 4: enroladinho de palha

B3 O(a) Sr.(a) fuma ou já fumou charuto? (1) sim (2) não

Idade início _____ idade que parou _____ marca _____ nº/dia _____

B4 O(a) Sr.(a) fuma ou já fumou cachimbo? (1) sim (2) não

Idade início _____ idade que parou _____ marca _____ nº/dia _____

B5 O(a) Sr.(a) fuma ou já fumou maconha, pelo menos uma vez por semana por pelo menos 6 meses? (1) sim (2) não

Idade início _____ idade que parou _____ n°/semana _____

QUESTÕES PARA NÃO FUMANTES

B6 O(a) Sr. (a) já esteve casado (ou vivendo junto) com um(a) fumante?

(1) sim (2) não

B7 O(a) Sr.(a) trabalhou em lugar fechado onde as pessoas fumassem?

(1) sim (2) não

HÁBITOS ALIMENTARES

C1 Qual a frequência em que o(a) Sr.(a) consome ou consumia esses alimentos?

Tipo de alimento	Número vezes	Semana	Mês
Carne vermelha			
Carne branca			
Leite e/ou derivados			
Verduras			
Legumes			
Frutas frescas			
Bolos ou doces			

C2 Nos últimos dois anos o(a) Sr.(a) tem tomado vitaminas?

(1) sim (2) não (3) não sabe

C3 Com que frequência o(a) Sr.(a) toma estas vitaminas?

(1) diariamente (2) 1x semana (3) 1 x mês (4) ocasionalmente (5) nunca

C4 Qual o seu peso hoje? _____Kg

C5 Perdeu peso ultimamente? (1) sim (2) não Quantos? _____ Kg

C6 O (a) Sr.(a) usa fogão a lenha para cozinhar alimentos? (1) sim (2) não

HÁBITOS DE BEBIDA

D1 O(a) Sr.(a) toma bebidas alcoólicas pelo menos 1 vez por mês?

(1) sim (2) não (3) só no passado

Unidade:

(1) copo peq. - 50mL (3) copo gnd. -500mL (5) garrafa -700 - 750mL

(2) copo méd. - 100mL (4) 1/2 ou garrafa peq. ou lata 330mL (6) garrafa -1 L

Por: (1) dia (2) semana (3) mês

Bebida	1 sim/ 2-não	Idade início	Idade que parou	Unidade	Quantas unidades consome	Por
Cerveja						
Vinho						
Cachaça, vodca,rum						
Licores						

INFORMACÕES SOBRE SAÚDE**QUEIXAS GERAIS**

E1 O(a) Sr. (a) tem algum problema de saúde? ☐ Não ☐ Sim

Especifique:

E2 Possui casos de câncer na família?

☐ Não ☐ Sim ☐ Não sei

Grau de parentesco	Tipo de Câncer
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>

HISTÓRIA OCUPACIONAL

F1 Qual sua profissão atual?

F2 Há quanto tempo o(a) Sr(a) trabalha com essa atividade? _____

F3 O(a) Sr.(a) poderia descrever suas atividades específicas (o que fazia ou como fazia)?

F4 Qual sua profissão anterior?

9. REFERÊNCIAS

- Abat S, Bramati C, Bondi S, Lissoni A, Trimarchi M. Oral Cancer and Precancer: A Narrative Review on the Relevance of Early Diagnosis. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(24):9160.
- Aires FT, Lin CS, Matos LL, Kulcsar MAV, Cernea, CR. Risk factors for distant metastasis in patients with oral cavity squamous cell carcinoma undergoing surgical treatment. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2017;79(6):347-55.
- Ali J, Sabiha B, Jan HU, Haider SA, Khan AA, Ali, SS. Genetic etiology of oral cancer. *Oral Oncol*. 2017;70:23-8.
- Almal SH, Padh H. Implications of gene copy-number variation in health and diseases. *J Hum Genet*. 2012;57(1): 6-13.
- Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(10):1731-37.
- Antunes JLF, Toporcov TN, Biazevic MGH, Boing AF, Bastos JL. Gender and racial inequalities in trends of oral cancer mortality in Sao Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica*. 2013;47:470-8.
- Aouiche C, Shang X, Chen B. Copy number variation related disease genes. *Quant Biol*. 2018;6(2):99-112.
- Arand M, Mühlbauer R, Hengstler J, Jäger E, Fuchs J, Winkler L, Oesch F. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathioneS-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Anal Biochem*. 1996;236(1):184-6.
- Argiris A, Brockstein BE, Haraf DJ, Stenson KM, Mittal BB, Kies MS, Vokes EE. Competing causes of death and second primary tumors in patients with locoregionally advanced head and neck cancer treated with chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res*. 2004;10(6):1956-62.

- Arlt MF, Wilson TE, Glover TW. Replication stress and mechanisms of CNV formation. *Curr Opin Genet Dev.* 2012;22(3):204-10.
- Azimi S, Ghorbani Z, Ghasemi E, Tennant M, Kruger E. Does socioeconomic status influence oral cancer awareness? The role of public education. *East Mediterr Health J.* 2020;26(12):1510-17.
- Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol.* 2010;46(6):414-17.
- Board PG, Menon, D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(5):3267-88.
- Bose P, Brockton NT, Dort JC. Head and neck cancer: from anatomy to biology. *Int J Cancer.* 2013;133(9):2013-23.
- Boyer TD. Special article the glutathione S-transferases: An update. *Hepatology.* 1989;9(3):486-96.
- Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003;63(8):1727-30.
- Brasch-Andersen C, Christiansen L, Tan Q, Haagerup A, Vestbo J, Kruse TA. Possible gene dosage effect of glutathione-S-transferases on atopic asthma: using real-time PCR for quantification of GSTM1 and GSTT1 gene copy numbers. *Hum Mutat.* 2004;24(3):208-14.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
- Bruhn C, Brockmöller J, Kerb R, Roots I, Borchert HH. Concordance between enzyme activity and genotype of glutathione S-transferase theta (GSTT1). *Biochem Pharmacol.* 1998;6(9): 1189-93.
- Buch SC, Notani PN, Bhisey RA. Polymorphism at GSTM1, GSTM3 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer in an Indian population. *Carcinogenesis.* 2002;23(5):803-7.
- Caldeira E, Issa JP, Fernandes A. Cavidade Oral. In: Buchaim R, Issa JP. *Manual de Anatomia Odontológica.* Barueri (SP): Manole; 2018.

- Carnielli CM, Macedo CCS, De Rossi T, Granato DC, Rivera C, Domingues RR, et al. Combining discovery and targeted proteomics reveals a prognostic signature in oral cancer. *Nat Commun*. 2018;9(1):3598.
- Chatterjee A, Gupta S. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Lett*. 2018;433:33-42.
- Chen YK, Lin LM. Evaluation of glutathione S-transferase activity in human buccal epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1997;26(3):205-9.
- Choudhari SK, Chaudhary M, Gadbail AR, Sharma A, Tekade S. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: a review. *Oral Oncol*. 2014;50(1):10-8.
- Conway DI, Brenner DR, McMahon AD, Macpherson L, Agudo A, Ahrens W, et al. Estimating and explaining the effect of education and income on head and neck cancer risk: INHANCE consortium pooled analysis of 31 case-control studies from 27 countries. *Int J Cancer*. 2015;136(5):1125-39.
- Conway DI, Purkayastha M, Chestnutt IG. The changing epidemiology of oral cancer: definitions, trends, and risk factors. *Br Dent J*. 2018;225(9):867-73.
- Costa A, Scholer-Dahirel A, Mechta-Grigoriou F. The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. *Semin Cancer Biol*. 2014;25:23-32.
- Curioni OA, de Carvalho MB, Dedivitis RA, Rapoport A, Gattas GJ. The influence of gene polymorphisms on tobacco and alcohol-induced oral cancer risk. *J Cancer Therap*. 2013;4:978-88.
- D'souza S, Addepalli V. Preventive measures in oral cancer: An overview. *Biomed Pharmacother*. 2018;107:72-80.
- Damani Shah H, Saranath D, Pradhan S. Single nucleotide polymorphisms in transcription factor genes associated with susceptibility to oral cancer. *J Cel Biochem*. 2020;121(2):1050-60.
- Daraei P, Moore CE. Racial disparity among the head and neck cancer population. *J Cancer Educ*. 2015;30(3):546-51.

Datta SK, Kumar V, Pathak R, Tripathi AK, Ahmed RS, Kalra OP, Banerjee BD. Association of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphism with oxidative stress in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease. *Ren Fai*. 2010;32(10):1189-95.

de Rezende LFM, Lee DH, da Costa Louzada ML, Song M, Giovannucci E, Eluf-Neto J. Proportion of cancer cases and deaths attributable to lifestyle risk factors in Brazil. *Cancer Epidemiol*. 2019;59:148-57.

Deakin M, Elder J, Hendrickse C, Peckham D, Leopard D, Bell DA, Jones P, Duncan H, Brannigan K, Aldersea J, Fryer AA, Strange RC. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis*. 1996;17(4):881-4.

Drummond SN, De Marco L, Noronha JCM, Gomez RS. GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2004;40(1):52-5.

Drummond SN, Gomez RS, Noronha JCM, Pordeus IA, Barbosa AA, De Marco L. Association between GSTT-1 gene deletion and the susceptibility to oral squamous cell carcinoma in cigarette-smoking subjects. *Oral Oncol*. 2005;41(5):515-19.

D'Souza W, Saranath D. OMICS, oral cancer molecular landscapes, and clinical practice. *OMICS*. 2017;21(12):689-703.

Durazzo TC, Mattsson N, Weiner MW, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Smoking and increased Alzheimer's disease risk: a review of potential mechanisms. *Alzheimers Dement*. 2014;10:S122-45.

El-Bayoumy K, Chen KM, Zhang SM, Sun YW, Amin S, Stoner G, Guttenplan JB. Carcinogenesis of the oral cavity: environmental causes and potential prevention by black raspberry. *Chem Res Toxicol*. 2017;30(1):126-44.

Ellegaard PK, Poulsen HE. Tobacco smoking and oxidative stress to DNA: a meta-analysis of studies using chromatographic and immunological methods. *Scand J Clin Lab Invest*. 2016;76(2):151-8.

Emeville E, Broquère C, Brureau L, Ferdinand S, Blanchet P, Multigner L, Romana M. Copy number variation of GSTT1 and GSTM1 and the risk of prostate cancer in a Caribbean population of African descent. *PloS One*. 2014;9(9):e107275.

- Er TK, Wang YY, Chen CC, Herreros-Villanueva M, Liu TC, Yuan SSF. Molecular characterization of oral squamous cell carcinoma using targeted next-generation sequencing. *Oral Dis*. 2015;21(7):872-8.
- Fausto B, Fausto S. Primeira República (1889-1930). In: Fausto B, Fausto S. *História do Brasil*. São Paulo: Edusp; 1994.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znoar A, Soerjomataram I, Bray F. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2020. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, acessado em 28/01/2021.
- Freeman HS. Aromatic amines: use in azo dye chemistry. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2013;18:145-64.
- Garrett BE, Martell BN, Caraballo RS, King BA. Peer Reviewed: Socioeconomic Differences in Cigarette Smoking Among Sociodemographic Groups. *Prev Chronic Dis*. 2019;16:E74.
- Gattás GJF, Kato M, Soares-Vieira JA, Siraque MS, Kohler P, Gomes L, Rego MAV, Bydlowski SP. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(4):451-8.
- Gattás GJF, de Carvalho MB, Siraque MS, Curioni OA, Kohler P, Eluf-Neto J, Wünsch-Filho V. Genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. *Head Neck*. 2006;28(9):819-26.
- Gavina JM, Yao C, Feng YL. Recent developments in DNA adduct analysis by mass spectrometry: a tool for exposure biomonitoring and identification of hazard for environmental pollutants. *Talanta*. 2014;130:475-94.
- Ge B, Song Y, Zhang Y, Liu X, Wen Y, Guo X. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) null polymorphisms and the risk of hypertension: a meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118897.

Ghosh T, Mustafa MD, Kumar V, Kumar Datta S, Bhatia MS, Sircar S, Banerjee BD. A preliminary study on the influence of glutathione S transferase T1 (GSTT1) as a risk factor for late onset Alzheimer's disease in North Indian population. *Asian J Psychiatr.* 2012;5(2):160-3.

Gkouveris I, Nikitakis NG. Role of JNK signaling in oral cancer: a mini review. *Tumor Biol.* 2017;39(6):1010428317711659.

Gleber-Netto FO, Braakhuis BJ, Triantafyllou A, Takes RP, Kelner N, Rodrigo JP, Strojan P, Poorten VV, Rapidis AD, Rinaldo A, Brakenhoff R, Ferlito A, Kowalski LP. Molecular events in relapsed oral squamous cell carcinoma: Recurrence vs secondary primary tumor. *Oral Oncol.* 2015;51(8):738-44.

Goodwin WJ, Thomas GR, Parker DF, Joseph D, Levis S, Franzmann E, Anello C, Hu JJ. Unequal burden of head and neck cancer in the United States. *Head Neck.* 2008;30(3):358-71.

Gronau S, Koenig-Greger D, Jerg M, Riechelmann H. GSTM1 enzyme concentration and enzyme activity in correlation to the genotype of detoxification enzymes in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral dis.* 2003;9(2):62-7.

Grubisa I, Otasevic P, Vucinic N, Milicic B, Jozic T, Krstic S, Milasin J. Combined GSTM1 and GSTT1 null genotypes are strong risk factors for atherogenesis in a Serbian population. *Genet Mol Biol.* 2018;41(1):35-40.

Guimarães E, Regatão M, B MV. Organização Anatômica e Funcional do Aparelho Estomatognático. In: Baldo MV, Regatão M. *Fisiologia Oral.* São Paulo: Santos; 2013.

Gupta N, Gupta R, Acharya AK, Patthi B, Goud V, Reddy S, Garg Anshul, Singla A. Changing Trends in oral cancer-a global scenario. *Nepal J Epidemiol.* 2016;6(4):613-19.

Hajdu SI, Vadmal MS. The use of tobacco. *Ann Clin Lab Sc.* 2010;40(2):178-81.

Hancock AM, Witonsky DB, Ehler E, Alkorta-Aranburu G, Beall C, Gebremedhin A, Sukernik R, Utermann G, Pritchard J, Coop G, Di Rienzo A. Human adaptations to diet, subsistence, and ecoregion are due to subtle shifts in allele frequency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107:8924-30.

Haraksingh RR, Snyder MP. Impacts of variation in the human genome on gene regulation. *J Mol Biol.* 2013;425(21):3970-7.

Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen, C et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(2):541-50.

Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the Isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Bioche Mol Biol.* 1995;30(6):445-520.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:51-88.

He Y, Hoskins JM, McLeod HL. Copy number variants in pharmacogenetic genes. *Trends Mol Med.* 2011;17(5):244-51.

Hirvonen A. Genetic factors in individual responses to environmental exposures. *J Occup Environ Medicine.* 1995;37(1):37-43.

Hussein AA, Helder MN, de Visscher JG, Leemans CR, Braakhuis BJ, de Vet HC, Forouzanfar T. Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: A systematic review. *Eur J Cancer.* 2017;82:115-27.

IARC - International Agency for Research on Cancer, IARC Working Group on the Evaluation of Cancer-Preventive Strategies, e World Health Organization. Fruit and Vegetables; 2003.

IARC - International Agency for Research on Cancer, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking; 2004.

IARC - International Agency for Research on Cancer, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Alcohol consumption and ethyl carbamate; 2007.

IARC - International Agency for Research on Cancer, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. A review of human carcinogens. Part F: Chemical agents and related occupations; 2009.

Inchingolo F, Santacroce L, Ballini A, Topi S, Dipalma G, Haxhirexha K, Bottalico L, Charitos IA. Oral Cancer: A Historical Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(9):3168.

International Agency for Research on Cancer em <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table>

Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010;154(2):103-16.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.

Johnson S, McDonald JT, Corsten M. Oral cancer screening and socioeconomic status. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012;41(2):102-7.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;53(282):457-81.

Karageorgi S, Prescott J, Wong J Y, Lee IM, Buring JE, De Vivo I. GSTM1 and GSTT1 copy number variation in population-based studies of endometrial cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(7):1447-52.

Kasthurinaidu SP, Ramasamy T, Ayyavoo J, Dave DK, Adroja DA. GST M1-T1 null allele frequency patterns in geographically assorted human populations: a phylogenetic approach. *PloS One.* 2015;10(4):e0118660.

Kernohan MD, Clark JR, Gao K, Ebrahimi A, Milross CG. Predicting the prognosis of oral squamous cell carcinoma after first recurrence. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;136(12):1235-39.

Kim D, Li R. Contemporary treatment of locally advanced Oral Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2019;20(4):32.

Kowalski LP, Alves F. Carcinoma Espinocelular. In: Almeida O. *Patologia Oral.* São Paulo: Artes Médicas; 2016.

Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *J Cancer Res Ther.* 2016;12(2):458-63.

Kumar V. Neoplasia. In: Kumar V. *Robbins patologia básica.* 10a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2018.

Lee YCA, Hashibe M. Tobacco, alcohol, and cancer in low and high income countries. *Ann Glob Health.* 2014;80(5):378-83.

Leemans CR, Snijders PJ, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(5):269-82.

Li F, Li S, Chang H, Nie Y, Zeng L, Zhang X, Wang Y. Quantitative assessment of the association between the GSTM1-null genotype and the risk of childhood asthma. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013;17(9):656-61.

Li CC, Shen Z, Bavarian R, Yang F, Bhattacharya A. Oral Cancer: Genetics and the Role of Precision Medicine. *Dent Clin North Am*. 2018;62(1):29-46.

Liu CJ, Chang CS, Lui MT, Dang CW, Shih YH, Chang KW. Association of GST genotypes with age of onset and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2005;34(8):473-7.

Liu Y, Tavana O, Gu W. p53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian. *J Mol Cell Biol*. 2019;11(7):564-77.

López-López J, Omaña-Cepeda C, Jané-Salas E. Oral precancer and cancer. *Med Clin (Barc)*. 2014;145(9):404-8.

Losi-Guembarovski R, Cólus IMDS, De Menezes RP, Poliseli F, Chaves VN, Kuasne, H. et al. Lack of association among polymorphic xenobiotic-metabolizing enzyme genotypes and the occurrence and progression of oral carcinoma in a Brazilian population. *Anticancer Res*. 2008;28(2A):1023-8.

Mackay J, Amos A. Women and tobacco. *Respirology*. 2003;8(2):123-130.

Marchioni DML, Gattás GJF, Curioni OA, Carvalho MBD. Interação entre consumo alimentar e polimorfismos da GSTM1 e GSTT1 no risco para o câncer de cabeça e pescoço: estudo caso-controle em São Paulo, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2011;27(2):379-87.

Marron M, Boffetta P, Zhang ZF, Zaridze D, Wünsch-Filho V, Winn DM et al. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol*. 2010;39(1):182-96.

Masood N, Yasmin A, Kayani MA. Genetic deletions of GSTM1 and GSTT1 in head and neck cancer: review of the literature from 2000 to 2012. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(6):3535-9.

- Masood N, Yasmin A, Kayani MA. Genetic variations and head and neck cancer risks. *Mol Biol Rep.* 2014;41(4):2667-70.
- McBride KA, Ballinger ML, Killick E, Kirk J, Tattersall MH, Eeles RA, Thomas DM, Mitchell G. Li-Fraumeni syndrome: cancer risk assessment and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11(5):260-71.
- McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH, Sabeti PC, Zody MC, Barrett JC, Dallaire S, Gabriel SB, Lee C; Daly MJ, Altshuler DM, International HapMap Consortium. Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet.* 2006;38(1):86-92.
- McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene.* 2006;25(11):1639-48.
- McLellan RA, Oscarson M, Alexandrie AK, Seidegård J, Evans DA P, Rannug A, Ingelman-Sundberg M. Characterization of a Human Glutathione S-Transferase μ Cluster Containing a Duplicated GSTM1 Gene that Causes Ultrarapid Enzyme Activity. *Mol Pharmacol.* 1997;52(6):958-65.
- Medrado L. Fatores de Risco. In: Medrado L. *Carcinogênese: desenvolvimento, diagnóstico e tratamento das neoplasias.* São Paulo: Érica; 2015.
- Mikhail FM. Copy number variations and human genetic disease. *Curr Opin Pediatr.* 2014;26(6):646-52.
- Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin.* 2015;24(3):491-508.
- Mortensen HM, Froment A, Lema G, Bodo JM, Ibrahim M, Nyambo TB, Omar SA, Tishkoff SA. Characterization of genetic variation and natural selection at the arylamine N-acetyltransferase genes in global human populations. *Pharmacogenomics.* 2011;12(11):1545-58.
- Mücke T, Wagenpfeil S, Kesting MR, Hölzle F, Wolff KD. Recurrence interval affects survival after local relapse of oral cancer. *Oral oncol.* 2009;45(8):687-91.
- Musk AW, De Klerk NH. History of tobacco and health. *Respirology.* 2003;8(3):286-90.
- Nanci A. Estrutura dos Tecidos Orais. In: Ten Cate – *Histologia Oral.* 9a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2019.

Nath S, Das S, Bhowmik A, Ghosh SK, Choudhury Y. The GSTM1 and GSTT1 null genotypes increase the risk for type 2 diabetes mellitus and the subsequent development of diabetic complications: a meta-analysis. *Curr Diabetes Rev.* 2019;15(1):31-43.

Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43(1):233-60.

Nomura T, Noma H, Shibahara T, Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T. Aldehyde dehydrogenase 2 and glutathione S-transferase M 1 polymorphisms in relation to the risk for oral cancer in Japanese drinkers. *Oral oncol.* 2000;36(1):42-6.

Nørskov MS, Frikke-Schmidt R, Loft S, Sillesen H, Grande P, Nordestgaard BG, Tybjærg-Hansen A. Copy number variation in glutathione S-transferases M1 and T1 and ischemic vascular disease: four studies and meta-analyses. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011a;4(4):418-28.

Nørskov MS, Frikke-Schmidt R, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Loft S, Tybjærg-Hansen A. Copy number variation in glutathione-S-transferase T1 and M1 predicts incidence and 5-year survival from prostate and bladder cancer, and incidence of corpus uteri cancer in the general population. *Pharmacogenomics J.* 2011b;11(4):292-99.

Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz P, Luis F, Lopes C. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc.* 2007;79(4):593-616.

Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9(2):185-91.

Ong TK, Murphy C, Smith AB, Kanatas AN, Mitchell DA. Survival after surgery for oral cancer: a 30-year experience. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2017;55(9):911-16.

Paes NL. Fatores econômicos e diferenças de gênero na prevalência do tabagismo em adultos. *Cie Saude Colet.* 2016;21(1):53-61.

Paffenbarger Jr RS, Hyde RT, Wing AL, Hsieh C. Cigarette smoking and cardiovascular diseases. *IARC Sci Publ.* 1986;(74):45-60.

Panarese I, Aquino G, Ronchi A, Longo F, Montella M, Cozzolino I et al. Oral and Oropharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic and predictive parameters in the etiopathogenetic route. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2019; *19*(2):105-119.

Petersen DD, McKinney CE, Ikeya K, Smith HH, Bale AE, McBride OW, Nebert DW. Human CYP1A1 gene: cosegregation of the enzyme inducibility phenotype and an RFLP. *Am J Hum Genet.* 1991;48(4):720-5.

Pezzuto F, Buonaguro L, Caponigro F, Ionna F, Starita N, Annunziata C, Buonaguro FM, Tornesello, M. L. Update on head and neck cancer: current knowledge on epidemiology, risk factors, molecular features and novel therapies. *Oncology.* 2015;89(3):125-36.

Pflaum T, Hausler T, Baumung C, Ackermann S, Kuballa T, Rehm J, Lachenmeier DW. Carcinogenic compounds in alcoholic beverages: an update. *Arch Toxicol.* 2016;90(10):2349-67.

Pinhel MA, Nakazone MA, Cacao JC, Piteri RC, Dantas RT, Godoy MF, Godoy MRP, Tognola WA, Conforti-Froes NDT, Souza DR. Glutathione S-transferase variants increase susceptibility for late-onset Alzheimer's disease: association study and relationship with apolipoprotein E ϵ 4 allele. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(4):439-45.

Pinto M, Ugá MAD. (2010). Os custos de doenças tabaco-relacionadas para o Sistema Único de Saúde. *Cad SaUde Publica.* 2010;26(6):1234-45.

Rajagopalan P, Patel K, Jain AP, Nanjappa V, Datta KK, Subbannayya T et al. Molecular alterations associated with chronic exposure to cigarette smoke and chewing tobacco in normal oral keratinocytes. *Cancer Biol Ther.* 2018;19(9):773-85.

Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6(9):733-43.

Reidy J, McHugh E, Stassen LFA. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *Surgeon.* 2011;9(5):278-83.

Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of head and neck cancer. *Surg Oncol Clin.* 2015;24(3):379-96.

Rhodus NL, Kerr AR, Patel K. Oral cancer: leukoplakia, premalignancy, and squamous cell carcinoma. *Dent Clin*. 2014;58(2):315-40.

Richerson PJ, Boyd R, Henrich J. Gene-culture coevolution in the age of genomics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:8985-92.

Ries LA, Harkins D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ et al. SEER cancer statistics review. 2006; 1975-2003.

Rivera C, Oliveira AK, Costa RAP, De Rossi T, Leme AFP. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: a systematic review. *Oral Oncol*. 2017;72:38-47.

Rogers SN, Brown JS, Woolgar JA, Lowe D, Magennis P, Shaw RJ, Sutton D, Errington D, Vaughan, D. Survival following primary surgery for oral cancer. *Oral Oncol*. 2009;45(3):201-11.

Romick-Rosendale LE, Lui VW, Grandis JR, Wells SI. The Fanconi anemia pathway: repairing the link between DNA damage and squamous cell carcinoma. *Mutat Res*. 2013;743:78-88.

Rosso M, Chitnis T. Association between cigarette smoking and multiple sclerosis: a review. *JAMA Neurol*. 2020;77(2):245-53.

Rushmore TH, Tony Kong A. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metabol*. 2002;3(5):481-90.

Russo A, Francelin PR, Galbiatti ALS, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Association between GSTP1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms involved in xenobiotic metabolism and head and neck cancer development. *Mol Biol Rep*. 2013;40(7):4181-88.

Saitou M, Ishida T. Distributions of the GSTM1 and GSTT1 null genotypes worldwide are characterized by latitudinal clines. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(1):355-61.

Saitou M, Satta Y, Gokcumen O, Ishida T. Complex evolution of the GSTM gene family involves sharing of GSTM1 deletion polymorphism in humans and chimpanzees. *BMC Genomics*. 2018;19(1):1-12.

Sampaio AC, Morari EC, Bufalo NE, Leite JL, Lima CSP, Ward LS. Lack of influence of glutathione S-transferase genotype profile on cancer susceptibility in smokers and nonsmokers. *Med Sci Mon*. 2008;15(1):CR10-5.

- Sanderson R J, De Boer MF, Damhuis RAM, Meeuwis CA, Knekt PP. The influence of alcohol and smoking on the incidence of oral and oropharyngeal cancer in women. *Clin Otolaryngol All Sci*. 1997;22(5):444-48.
- Santosh ABR, Jones T, Harvey, J. A review on oral cancer biomarkers: Understanding the past and learning from the present. *J Cancer Res Ther*. 2016;12(2):486-92.
- Saravani S, Miri-Moghaddam M Bazi A, Miri-Moghaddam E. Association of glutathione-S-transferases M1 and T1 deletional variants with development of oral squamous cell carcinoma: a study in the South-East of Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(6):1921-26.
- Sardaro N, Della Vella F, Incalza MA, Di Stasio D, Lucchese A, Contaldo M, Laudadio C, Petruzzi, M. Oxidative stress and oral mucosal diseases: an overview. *In Vivo*. 2019;33(2):289-96.
- Sarode G, Maniyar N, Sarode SC, Jafer M, Patil S, Awan KH. Epidemiologic aspects of oral cancer. *Dis Mon*. 2020;66(12):100988.
- Sato M, Sato T, Izumo T, Amagasa T. Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. *Carcinogenesis*. 1999;20(10):1927-31.
- Schnekenburger M, Karius T, Diederich M. Regulation of epigenetic traits of the glutathione S-transferase P1 gene: from detoxification toward cancer prevention and diagnosis. *Front Pharmacol*. 2014;5:170.
- Scully C, Bedi R. Ethnicity and oral cancer. *Lancet Oncol*. 2000;1(1):37-42.
- Senthilkumar KP, Thirumurugan R. Risk modulation of GSTM1–GSTT1 interactions to head and neck cancer in tobacco users. *Mol Biol Rep*. 2014;41(9):5635-44.
- Sharma A, Mishra A, Das BC, Sardana S, Sharma JK. Genetic polymorphism at GSTM1 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer. *Neoplasma*. 2006;53(4):309-315.
- Silva TM, Marques CR, Marques Filho MF, Marques AB, Di Pietro G, Rios-Santos F. Association of the GSTT1 polymorphism in upper aerodigestive tract cancer with tobacco smoking. *Genet Mol Res*. 2014;13(1):528-37.

Sinevici N, O'sullivan J. Oral cancer: deregulated molecular events and their use as biomarkers. *Oral Oncol.* 2016;61:12-8.

Singh S. Cytoprotective and regulatory functions of glutathione S-transferases in cancer cell proliferation and cell death. *Cancer Chem Pharmacol.* 2015;75(1):1-15.

Sistema de informação sobre mortalidade - SIM – Ministério da Saúde: <http://www.datasus.gov.br>

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953;6(5):963-8.

Soerjomataram I, De Vries E, Pukkala E, Coebergh JW. Excess of cancers in Europe: a study of eleven major cancers amenable to lifestyle change. *Int J Cancer.* 2007;120(6):1336-43.

Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018;125(6):612-27.

Sprenger R, Schlagenhauser R, Kerb R, Bruhn C, Brockmöller J, Roots et al. Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype–phenotype correlation. *Pharmacogenetics.* 2000;10(6):557-65.

Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mut Res.* 2001;482(1-2):21-6.

Su H, Cao Y, Li J, Zhu Y, Ma X. GST null polymorphisms may affect the risk of coronary artery disease: evidence from a meta-analysis. *Thromb J.* 2020;18(1):1-10.

Sudmant PH, Mallick S, Nelson BJ, Hormozdiari F, Krumm N, Huddleston J et al. Global diversity, population stratification, and selection of human copy-number variation. *Science.* 2015;349(6253):aab3761.

Szturz P, Vermorken JB. Management of recurrent and metastatic oral cavity cancer: Raising the bar a step higher. *Ora Oncol.* 2020;101:104492.

Tanimoto K, Hayashi SI, Yoshiga K, Ichikawa T. Polymorphisms of the CYP1A1 and GSTM1 gene involved in oral squamous cell carcinoma in association with a cigarette dose. *Oral Oncol.* 1999;35(2):191-6.

- Taylor FR. Tobacco, nicotine, and headache. *Headache*. 2015;55(7):1028-44.
- Tomar SL, Hecht SS, Jaspers I, Gregory RL, Stepanov I. Oral health effects of combusted and smokeless tobacco products. *Adv Dent Res*. 2019;30(1):4-10.
- Ueta CB, Campos JC, Albuquerque RPE, Lima VM, Disatnik MH, Sanchez AB, Chan CH, de Medeiros MHG, Yang W, Mochly-Rosen D, Ferreira JCB. Cardioprotection induced by a brief exposure to acetaldehyde: role of aldehyde dehydrogenase 2. *Cardiovasc Res*. 2018;114(7):1006-15.
- U.S. Department of Health and Human Services. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. 2010.
- van der Waal I, de Bree R. Second primary tumours in oral cancer. *Oral Oncol*. 2010;46(6):426-8.
- Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin*. 2014;26(2):123-41.
- Vineis P, Veglia F, Anttila S, Benhamou S, Clapper ML, Dolzan V et al. CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and lung cancer: a pooled analysis of gene–gene interactions. *Biomarkers*. 2004;9(3):298-305.
- Wang G, Zhang L, Li Q. Genetic polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and NQO1 genes and diabetes mellitus risk in Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341(2):310-3.
- Wang K, Li F, Zhang X, Li Z, Li H. Smoking increases risks of all-cause and breast cancer specific mortality in breast cancer individuals: a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies involving 39725 breast cancer cases. *Oncotarget*. 2016;7(50):83134-47.
- Wang S, Hanna D, Sugamori KS, Grant DM. Primary aromatic amines and cancer: Novel mechanistic insights using 4-aminobiphenyl as a model carcinogen. *Pharmacol Ther*. 2019;200:179-89.
- Weckx A, Riekert M, Grandoch A, Schick V, Zöller JE, Kreppel M. Time to recurrence and patient survival in recurrent oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2019;94:8-13.
- Weinberg R. The nature of cancer. In: Weinberg R. *The biology of cancer*. New York: Garland Science, Taylor and Francis Group; 2014.

- Winn DM, Lee YC, Hashibe M, Boffetta P, INHANCE consortium. The INHANCE consortium: toward a better understanding of the causes and mechanisms of head and neck cancer. *Oral Dis.* 2015;21(6):685-93.
- Winning TA, Townsend GC. Oral mucosal embryology and histology. *Clin Dermatol.* 2000;18(5):499-511.
- Wong TSC, Wiesenfeld D Oral cancer. *Australian Dent J.* 2018;63:S91-9.
- World Health Organization. WHO global report on trends in prevalence of tobacco use; 2019a: 2000-25.
- World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic: Offer help to quit tobacco use. World Health Organization; 2019b.
- Xu C, Li CYT, Kong ANT. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res.* 2005;28(3):249-68.
- Yanamoto S, Yamada S, Takahashi H, Yoshitomi I, Kawasaki G, Ikeda H, Minamizato T, Shiraishi T, Fujita S, Ikeda T, Umeda M. Clinicopathological risk factors for local recurrence in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41(10):1195-1200.
- Yoshioka S, Tsukamoto Y, Hijiya N, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Takeuchi I, Seto M, Kawano K, Moriyama M. Genomic profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. *PloS One.* 2013;8(2):e56165.
- Zakiullah Z, Ahmadullah A, Khisroon M, Saeed M, Khan A, Khuda F, Ali S, Javed N, Ovais M, Massod N, Khalil NK, Ismail M. Genetic susceptibility to oral cancer due to combined effects of GSTT1, GSTM1 and CYP1A1 gene variants in tobacco addicted patients of Pashtun ethnicity of Khyber Pakhtunkhwa province of Pakistan. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(3):1145-50.
- Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet.* 2015;16(3):172-83.
- Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Ann Rev Genomics Hum Genetics.* 2009;10:451-81.

Zhang J, Liu H, Yan H, Huang G, Wang B. Null genotypes of GSTM1 and GSTT1 contribute to increased risk of diabetes mellitus: a meta-analysis. *Gene*. 2013a; 518(2):405-11.

Zhang X, Huang M, Wu X, Kadlubar S, Lin J, Yu X, Kadlubar FF. GSTM1 copy number and promoter haplotype as predictors for risk of recurrence and/or second primary tumor in patients with head and neck cancer. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2013b; 6:9-17.

Zhao X, Sun S, Zeng X, Cui L. Expression profiles analysis identifies a novel three-mRNA signature to predict overall survival in oral squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res*. 2018, 8(3): 450.

Zhou D, Hu W, Wang Q, Jin Y. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and coronary heart disease susceptibility: a meta-analysis involving 47,596 subjects. *Heart Lung Circ*. 2014;23(6):578-85.

APÊNDICES

I – Súmula curricular

ISABELA BARBOSA FIRIGATO

1. Formação

Ano	Título	Instituição
2016	Bacharel em Ciências Biomédicas	Universidade de São Paulo
2021	Mestrado	Universidade de São Paulo

2. Histórico Acadêmico

Bacharelado em Ciências Biomédicas no Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP).

2013 – Monitora de Anatomia Humana

2014 – Monitora de Imunologia Básica

2016 – Monitora de Anatomia do Sistema Digestório

2014-2015 – Estágio no Laboratório de Imuno-Hematologia e Hematologia Forense da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob a orientação da Profa Dra Gilka Jorge Fígaro Gattás e co-orientação da Dra Fernanda de Toledo Gonçalves

2015-2016 – Realização de Iniciação Científica (IC) a partir do projeto de pesquisa intitulado “Variabilidade do Número de Cópias de *GSTM1* e de *GSTT1* e o Risco do Câncer de Cabeça e Pescoço”, sob a orientação da Profa Dra Gilka Jorge Fígaro Gattás. Concessão de bolsa de IC pelo financiamento do CNPq. O estudo originou a publicação de um artigo científico e uma apresentação oral em congresso internacional, para o qual foi concedido o *Travel Grant*.

2018 – Ingresso no Programa de Pós-Graduação em Oncologia da FMUSP para obtenção do título de Mestre a partir do desenvolvimento da presente dissertação, sob orientação da Dra Fernanda de Toledo Gonçalves. Concessão de bolsa de Mestrado pela CAPES.

Total de 39 créditos em disciplinas cursadas, das quais se obteve o conceito “A:”
Bases Moleculares das Funções Celulares (ICB – USP)

Redação Científica em Inglês com Foco na Publicação Internacional: do texto ao contexto (FFLCH – USP)

Epidemiologia Clínica (FMUSP)

Mecanismos de Carcinogênese (FMUSP)

Carcinogênese Oral (Odontologia – USP)

Câncer de Cabeça e Pescoço: um panorama geral (FMUSP)

Durante o Mestrado, o projeto de pesquisa foi apresentado tanto em evento nacional quanto em eventos internacionais, dentre estes, houve premiação de melhor apresentação da sessão de apresentações orais. Também são resultados

desse estudo um manuscrito que foi submetido para publicação e o rascunho de um segundo manuscrito que será submetido à avaliação em breve, além da premiação acadêmica de melhor projeto de Mestrado.

Como atividade extracurricular, houve a elaboração da escrita do Capítulo 5 (Carcinogênese), juntamente com a Profa Dra Laura Sichero, para compor o livro “Oncologia: da molécula à clínica”, iniciativa do VI Curso de Oncologia Molecular do ICESP. A publicação desta obra está em andamento.

3. Artigos publicados

Firigato I, de Toledo Gonçalves F, De Antonio J, Curioni OA, Silva MR, Gattás GJF. How many copies of *GSTM1* and *GSTT1* are associated with head and neck cancer risk?. *Biomarkers*. 2019;24(3):262-267.

Silva MR, Gattás GJ, De Antonio J, **Firigato I**, Curioni OA. Gonçalves FDT. Polymorphisms of *CHRNA3* and *CHRNA5*: Head and neck cancer and cigarette consumption intensity in a Brazilian population. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(12):e998.

4. Participações em Eventos Científicos

23rd International Student Congress of (bio) Medical Sciences. Copy Number Variation of *GSTM1* and *GSTT1* and Head and Neck Cancer Risk. 2016. (Oral Presentation)

VI Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis. DNA repair genes *XRCC1*, *XRCC3* and *XPB* polymorphisms and laryngeal cancer: their contribution in the tumor development risk, metastasis and second primary tumor. 2018. (Apresentação de pôster)

I Simpósio de Câncer de São Paulo. Quando mais é menos: CNV de *GSTM1* no risco do câncer oral. 2020 (Apresentação Oral)

Digital International Student Congress Of (bio) Medical Sciences. Many hands make light work: CNV of *GSTM1* effect on oral cancer risk. 2020 (Oral Presentation)

I Simpósio Desafios em Oncologia Molecular do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Câncer de Cabeça e Pescoço. 2021 (Apresentação Oral)

28th International Student Congress of (bio) Medical Sciences. Look at DNA and be near the future: CNV of *GSTM1* and *GSTT1* associated with the development of OSCC recurrences and second primary tumors. 2021 (Oral Presentation).

5. Premiações

ISCOMS TRAVEL GRANT. International Student Congress of (Bio)Medical Sciences. 2016

Melhor projeto de Mestrado. XII Jornada da Pós-Graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). 2020.

ISCOMS Oral Session Winner Epidemiology Award. International Student Congress of (Bio)Medical Sciences. 2021.

II – Manuscrito submetido à publicação

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to

Environmental and Molecular Mutagenesis

Manuscript ID

EMM-21-0051

Title

Many hands make light work: CNV of *GSTM1* effect on the oral cancer risk

Authors

Frigato, Isabela

López, Rossana

Curioni, Otávio

De Antonio, Juliana

Silva, Mariana

Gattás, Gilka

Gonçalves, Fernanda

Date Submitted

26-May-2021

**Many hands make light work: CNV of *GSTM1*
effect on theoral cancer risk**

Journal:	<i>Environmental and Molecular Mutagenesis</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Firigato, Isabela; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Legal, Etica Medica, Medicina Social e do Trabalho, Instituto Oscar Freire, LIM-40, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo (FMUSP), Sao Paulo, Brazil</p> <p>López, Rossana ; Universidade de Sao Paulo Instituto do Cancer do Estado de Sao Paulo, Center for Translational Research in Oncology, Instituto do Cancer do Estado de Sao Paulo, Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil</p> <p>Curioni, Otávio; Hospital Heliópolis, Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, Hospital Heliopolis, Sao Paulo, Brazil</p> <p>De Antonio, Juliana; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Legal, Etica Medica, Medicina Social e do Trabalho, Instituto Oscar Freire, LIM-40, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo (FMUSP), Sao Paulo, Brazil</p> <p>Silva, Mariana; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Legal, Etica Medica, Medicina Social e do Trabalho, Instituto Oscar Freire, LIM-40, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo (FMUSP), Sao Paulo, Brazil</p> <p>Gattás, Gilka ; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Legal, Etica Medica, Medicina Social e do Trabalho, Instituto Oscar Freire, LIM-40, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo (FMUSP), Sao Paulo, Brazil</p> <p>Gonçalves, Fernanda ; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Legal, Etica Medica, Medicina Social e do Trabalho, Instituto Oscar Freire, LIM-40, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo (FMUSP), Sao Paulo, Brazil</p>
Key Words:	<i>GSTM1</i>, copy number variation, oral squamous cell carcinoma, cancer susceptibility

Many hands make light work: CNV of *GSTM1* effect on the oral cancer risk

Short running title: CNV of *GSTM1* reduces the OSCC risk

Keywords: *GSTM1*, copy number variation, oral squamous cell carcinoma, cancer susceptibility

Isabela Firigato¹, Rossana V. M. López², Otávio A. Curioni³, Juliana De Antonio¹, Mariana Rocha Silva¹, Gilka Fígaro Gattás¹, Fernanda de Toledo Gonçalves¹

1 - Departamento de Medicina Legal, Etica Medica, Medicina Social e do Trabalho, Instituto Oscar Freire, LIM-40, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo (FMUSP), Sao Paulo, Brazil

2 - Center for Translational Research in Oncology, Instituto do Cancer do Estado de Sao Paulo, Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

3 - Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, Hospital Heliopolis, Sao Paulo, Brazil

Corresponding author: Miss Isabela Firigato. Departamento de Medicina Legal, Etica Medica, Medicina Social e do Trabalho, Instituto Oscar Freire, LIM-40, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, SP, BR. 455 Dr. Arnaldo Avenue, São Paulo, SP, 01246-903, Brazil. Telephone number: + 55 11 30618411. E-mail: isabela.firigato@usp.br

Abstract

GSTM1 and *GSTT1* codify enzymes that inactivate cigarette carcinogens that are the mainly oral squamous cell carcinoma (OSCC) risk factor. These genes present copy number variation (CNV), whereas the contribution of one and more copies to cell detoxification is not fully understood. The study aimed to determine and evaluate CNV of *GSTM1* and *GSTT1* in the OSCC risk. The number of copies of genes were determined in 234 OSCC patients and 422 controls by TaqMan real-time PCR. Two copies of *GSTM1* decreased the OSCC risk in 54% (OR 0.46; 95% CI 0.23-0.92). No association was found between CNV of *GSTT1* and the chances of the tumor development. Then, CNV of *GSTM1* might be applied as a surveillance toll for early detections of OSCC and improve the prognosis of patients.

Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common tumor among head and neck region [Ali et al., 2017] that corresponds to 90% of oral cancer cases [Ali et al., 2017]. The tumor arises from lining mucosa of oral cavity, mainly on the tongue and floor of the mouth, and can impair functions of speech, swallowing, and chewing [Rivera, 2015]. Worldwide, more than 377.000 new cases of the disease are diagnosed and more than 177,000 deaths are registered annually [Ferlay et al., 2020]. Because the high incidence, morbidity and mortality rates, OSCC became a serious public health problem over the years [Boing and Antunes, 2011]. According to INCA (National Cancer Institute), 15.190 new cases were estimated for the triennium 2020-22 in Brazil, while during the year of 2019, 6,605 OSCC Brazilian patients died due to the cancer [Brazil, Ministry of Health]. The disease is highly prevalent among men around the age of 60 years [Chaturvedi et al. 2019], of which two third are diagnosed in tumor advanced stages [Ali et al., 2017] and 50% of cases already present locally or regional metastasis [Li et al., 2018], factors that contribute for worst prognosis [Min et al., 2019].

The tumor development is strongly associated with tobacco use and alcohol consumption, and the interaction of both substances increases the OSCC risk [Conway et al., 2018]. However, the disease has been considered a complex multi-step process, wherein the genetic alterations play a key role on the oral cavity carcinogenesis [Hopkins et al., 2008; Ali et al., 2017]. Among these alterations, the copy number variation (CNV) of metabolism and carcinogenesis-related genes have been stood out, such as CNV of *GSTM1* and *GSTT1*, genes that codify enzymes of phase II of

biotransformation process and catalyze the inactivation of cigarette smoking carcinogenic compounds [Hayes et al., 2005; Jancova et al., 2010].

Zero copies of the genes represent their total deletion with the respectively lack of enzymatic activity [Hayes et al., 2005], which is correlated with the susceptibility of many diseases including OSCC [Curioni et al., 2013]. Nevertheless, the individual contribution of one and more copies of *GSTM1* and *GSTT1* to the biotransformation process is not fully understood. A new technique description has allowed the determination of each copy of these genes [Brasch-Andersen et al., 2004] that was carried out in few investigations. It was reported that one copy of *GSTT1* increased the endometrial cancer risk [Karageorgi et al., 2011], while the prostate cancer susceptibility was elevated by one copy of *GSTM1* and by two or more copies of *GSTT1* [Emeville et al., 2014]. For the best our knowledge, there are no studies about the copy number of these genes and OSCC susceptibility in the literature. Therefore, the aims of this study were to determine the CNV of *GSTM1* and *GSTT1* and investigate their possible association with the oral squamous cell carcinoma risk.

Material and Methods

Study subjects

During the period of 2000-2011, OSCC patients with histologically diagnosis were recruited at the Heliópolis Hospital, São Paulo, Brazil. At the same time, patients without any tumor diagnoses were enrolled from different nurseries of the same hospital to constitute the control group, which were included only individuals that recently received tobacco and/or alcohol-unrelated disease diagnoses. Furthermore, the subjects from control group were frequency-matched for age within five years with OSCC patients. All participants signed the informed consent form approved by the Ethics

Committee for Research Projects Analysis of the University of São Paulo Medical School and Heliópolis Hospital. They also answered a standardized questionnaire about age, gender, skin color, level of education, and intensities of smoking and drinking consumption information.

DNA extraction

Genomic DNA was assessed from 5 mL of peripheral blood lymphocytes of all participants through the salting-out extraction method [Miller et al., 1988]. After the extraction, the quality and quantity of the DNA samples were assessed under wavelengths of 260 nm (A260) and 280 nm (A280) using a spectrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific™, Wilmington, DE). An A260/A280 ratio between 1.8 and 2.2 was used to classify the samples as high genomic DNA quality.

Copy number variation of *GSTM1* and *GSTT1* determination

The determination of the copy number variation was performed through the TaqMan Gene Copy Number Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA), wherein *GSTM1* and *GSTT1* were analyzed separately, but both genes were amplified in a duplex Real-Time PCR (qPCR) together with the reference gene, *RNAseP*. The primers of *GSTM1* (Hs02595872_cn) as well as *GSTT1* (Hs01731033_cn) presented complementary sequences for the specific-gene 6-carboxyfluoresceine minor groove binder (6-FAM-MGB) labelled probe, while the primer of *RNAseP* (4403326) was complementary for the VIC-TAMRA labelled probe. Then, qPCR reactions were carried out on a Step One-Plus real-time PCR apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA), that were deposited in 96-well plates and followed the cycling conditions: 40 cycles of 90 °C for 10 min, 95 °C for 15 s, and 60 °C for 60 s, as manufacturer's instructions. The samples

were genotyped in triplicate under blinded conditions and a DNA quality control sample was used (water instead genomic DNA). The amplification reactions were analyzed using the (Ct) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and results were submitted to CopyCaller software (version 2.1 - Life Technologies, Carlsbad, CA) to quantify the copy number of the genes. The CNV determination was repeated for 10% of the samples, which achieved 100% of concordance for both genes.

Statistical analysis

The statistical analyses were conducted on Statistical Package for the Social Sciences (SPSS - version 18.0 for Windows) software, with a p-value lower than 0.05 considered statistically significant. Fisher's Exact test was performed to compare the differences in the distribution of categorical variables (gender, age, skin color, educational level, cigarette smoking and alcohol consumption) as well as the frequencies of each copy number of *GSTM1* and *GSTT1* between cases and controls. Zero copies of the genes were considered the reference of the tests, which were compared to one copy and two or more copies for both genes. The multivariate logistic regression analysis was performed to obtain the values of the adjusted odds ratio (OR*) and 95% confidence interval (95% CI).

Results

At the end of the recruitment period, a total of 234 OSCC patients and 422 patients without any diagnoses were included in this study. Regarding the OSCC patients, most of them were affected by cancer on the tongue (35.9%) or on the floor of the mouth (31.2%), and received a tumor diagnosis in advanced stages (TNM III/IV). Furthermore, the frequency of patients who underwent to surgery (38.5%) was similar to the

frequency of patients who received both surgery and radio/chemotherapy (37.6%), as shown in Table 1. About the patients without any cancer diagnoses, 40.4% of them were recruited mainly from the medical, gastroenterology, orthopedics, endocrinology, dermatology clinics, and the emergency.

[Table 1]

The demographic and educational characteristics, and cigarette smoking and alcohol consumption of OSCC patients and controls are shown in Table 2. The characteristics were similar among both groups, wherein most of the subjects were men who were more than 50 years old and classified themselves as white skin color. Furthermore, the multivariate logistic regression analysis revealed that a high educational attainment was related to decreased OSCC risk (OR 0.36; 95% CI 0.20-0.67), but 68.4% of tumor patients and 61.5% of controls presented none or low educational levels. Regarding tobacco and alcohol consumption, all amounts of cigarette smoking were significantly associated with the increase of tumor risk, whereas the high cigarette smoking quantity consumed (40 packs-year) raised the OSCC risk more than 9-fold (OR 9.38; 95% CI 5.07-17.33). Nonetheless, the tumor risk was diminished among patients that consumed low (≥ 12.5 g/day: OR 0.39; 95% CI 0.19-0.79) and moderate (12.6-49.9 g/day: OR 0.32; 95% CI 0.17-0.61) doses of alcohol, Table 2.

[Table 2]

The determination of CNV quantified a range from zero to two copies of *GSTM1*, while a range from zero to three copies of *GSTT1* (Table 3). Two copies of *GSTM1* were detected in 6.8% of tumor patients and in 11.4% of controls, of which resulted, from multivariate logistic regression analysis, the association with the reduced OSCC risk in 54% (OR 0.46; 95% CI 0.23-0.92). Furthermore, the frequency of zero copies

was higher among OSCC patients (50.6%) than among individuals without cancer diagnosis (40.9%). CNV of *GSTT1* results revealed that no copy number of the gene were associated with the oral squamous cell carcinoma risk, besides more cancer patients presented two or three copies of *GSTT1* (33.6%) rather than the controls (18.7%). Three copies of the gene were quantified in five cases and in three controls. In contrast with *GSTM1* deletion, more participants without OSCC presented zero copies of *GSTT1* (22.6%) rather than the cases (16.2%), as shown in Table 3.

[Table 3]

Discussion

Latest genome sequencing analyses have been revealed that the human genome presents other types of variations with intermediate sizes that are defined as structural DNA alterations, besides cytogenetically visible segments and single-nucleotide polymorphisms [SNPs - Sudmant et al., 2015; Zarrei et al., 2015; Nowakowska, 2017]. The most prominent structural alteration is the copy number variation (CNV) that is a genomic segment that varies in DNA content, due to the occurrence of duplications or deletions events, when compared with a genome reference. Around 9.5% of the human genome comprises CNVs [Zarrei et al., 2015], which has been claimed as an element to the hominid evolution, the adaptive traits and the development of diseases [Sudmant et al., 2015; Zarrei et al., 2015]. Furthermore, genomic analyses from different cancer types, including head and neck cancer, showed that the presence of duplications or deletions considerably leads to the DNA instability through the genomic imbalance, which is a factor that triggers mutagenic and carcinogenic processes. The CNV also is associated with the cancer susceptibility, which was detected in regions of genes-related

with the tumorigenic pathways, such as cellular adhesion, system immune response, proinflammatory responses and cellular metabolism [Speleman et al., 2008].

Regarding cellular metabolism, the copy number variation of *GSTM1* and *GSTT1* is explored because these genes participate in cellular detoxification process, which aids the cellular homeostasis maintenance. The CNV of these genes is a consequence of an unequal crossing-over event that involves two homologous sequences that flank *GSTM1* and *GSTT1* with a subsequently occurrence of duplications as well as deletions events [McLellan et al., 1997; Sprenger et al., 2000]. Then, the inherited parental allelic combination determines the genes copy number in the genome of individuals. Emeville and colleagues (2014) determined the CNV of *GSTM1* and *GSTT1* in a Caribbean population of African descents and the authors found the variety from zero to four copies for both genes. These findings indicate that deletions and duplications might be polymorphic in different populations [Almal and Padh, 2012]. Results of the present hospital-based case-control study showed that the genes copy number between zero to three, wherein the *GSTM1* deletion was observed in 50.6% of oral cancer patients and in 40.9% of controls, while the absence of *GSTT1* was detected in 16.2% of cases and in 22.6% of controls. These frequencies are similar to those that were determined to Caucasian population for *GSTM1* (40-55%) as well as *GSTT1* (17-21%). The reason why deletion frequencies were sustained in high levels is not fully understood yet, but studies hypothesize that the fixation of null alleles is a result of non-neutralists processes [Saitou et al., 2018].

Another aspect that is also not established is the biological role of each copy of the genes in cellular processes. Thus, the possible association of the copy number variation of *GSTM1* and *GSTT1* with the OSCC risk was studied. The results revealed that two

copies of *GSTM1* contributed to the protection effect against the tumor development (OR 0.46; 95% CI 0.23-0.92). This association might be linked with the activity of *GSTM1* enzyme, which catalyzes the conjugation reaction between electrophilic compounds with the reduced glutathione during the phase II of biotransformation process originating less reactive metabolites that are unable to bound and disrupt molecules as DNA [Hayes and Strange, 2000]. Two copies of the gene might increase messenger RNAs (mRNAs) transcription and, consequently, increase the enzyme activity, which might elevate the cellular detoxification efficacy. Dose-dependence response is one related-phenotype to CNVs effect [Speleman et al., 2008], which was demonstrated by McCarroll and colleagues (2006) that reported the equivalence between the copy number of *GSTM1* and the amount of mRNAs. Furthermore, the correspondence between each copy of the gene with the *GSTM1* enzymatic level was also demonstrated [McLellan et al., 1997]. Moreover, *GSTM1* mainly metabolizes polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and α,β -unsaturated ketones, substrates that are originated from the cigarette smoking. The findings of this study points out that the most of OSCC patients (52.6%) were classified as heavy smokers due to the consumption of elevated amounts of cigarette smoking (≥ 40 packs-year). If these substances keep activating and accumulating into the cell, they covalently bind to DNA resulting in the formation of adducts that are key molecules in the mutagenic and carcinogenic processes [U.S. Department of Health and Human Services, 2010].

The adducts modify the DNA structure and prompt point mutations by the occurrence of substitutions or deletions, oxidative stress induction, which can cause oxidative DNA-damaging and leads mutations, interrupt the polymerase replication activity impairing the DNA repair process. The mutations lead the activation of proto-

oncogenes and/or inactivate tumor suppressor genes, essential events for the tumor initiation and promotion [Ewa and Danuta, 2017]. Thus, the applicability of CNV of *GSTM1* to predict the development of OSCC might aid the early diagnosis of the disease and improve the patient prognosis, which achieves 80-90% of survival rates for tumors in early stages [TNM I/II – Bagan et al., 2010].

Besides the gene *GSTT1* present copy number variation and participate in the cellular metabolism, no association between the CNV of *GSTT1* and the OSCC risk were found in our sample. Indeed, PAHs and α,β -unsaturated ketones are not the main substrates of *GSTT1* [Hayes et al., 2005]. However, enzymes that belong to different classes of Glutathione S-Transferase (GSTs) superfamily can share around 25-30% of homology among their amino acids sequences, which allows the overlap of substrates [Singh, 2015]. However, that are substrates that present high affinity with the enzyme than others [Wu and Dong, 2012]. About *GSTT1*, the protein strongly catalyzes the conjugation of butadiene epoxide, dichloromethane, ethylene oxide, and eventually can detoxify cigarette smoking carcinogens, perhaps in low concentrations and less effectiveness.

In conclusion, because two copies of *GSTM1* may increase the cellular protection against genotoxic and cytotoxic compounds, the determination of the copy number variation of *GSTM1* might be applied as a risk predictor of OSCC among individuals who are highly exposed to cigarette smoking carcinogens and improve the prognostic of the disease.

Statment of author contribution

Fernanda de Toledo Gonçalves and Isabela Firigato: study design and application for Research Ethics Board approval. Gilka Fígaro Gattás and Otávio A. Curioni:

recruitment patients and data collection. Isabela Firigato, Juliana De Antonio, and Mariana Rocha Silva: performing the experiments and analysis of the data. Rossana V. M. López: performing the statistical analysis. Isabela Firigato: preparation of draft tables and the manuscript draft with important intellectual input from Fernanda de Toledo Gonçalves. Isabela Firigato, Fernanda de Toledo Gonçalves, Juliana De Antonio, Mariana Rocha Silva, Otávio A. Curioni, and Gilka Jorge Fígaro Gattás had complete access to the study data.

Acknowledgment

Isabela Firigato was financial supported by a MD studentship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Brazilian Federal agency fot the support and evaluation of graaduate education.

This study was supported by São Paulo Research Foundation (Grant number 2014/16092-4) and by Laboratório de Investigação Médica 40 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM40 FMUSP)

Conflicts of interest

All the authors declare none conflict of interest.

References

Ali J, Sabiha B, Jan HU, Haider SA, Khan AA, Ali SS. 2017. Genetic etiology of oral cancer. *Oral Oncol* 70:23-28.

Almal SH, Padh H. 2012. Implications of gene copy-number variation in health and diseases. *J Hum Genet* 57(1):6-13.

Bagan, J, Sarrion, G, Jimenez, Y. 2010. Oral cancer: clinical features. *Oral oncol* 46(6):414-417.

Boing, AF, Antunes, JLF. 2011. Socioeconomic conditions and head and neck cancer: a systematic literature review. *Cien Saude Colet* 16(2):615-622.

Brasch-Andersen C, Christiansen L, Tan Q, Haagerup A, Vestbo J, Kruse TA. 2004. Possible gen dosage effect of glutathione-S-transferases on atopic asthma: using real-time PCR for quantification of GSTM1 and GSTT1 gene copy numbers. *Hum Mutat* 24(3): 208-214.

Brazil, Ministry of Health – Mortality information system. Brasília, DF: Ministry of Health, c2008b. Available on: <http://www.datasus.gov.br>

Chaturvedi, P, Singh, A, Chien, CY, Warnakulasuriya, S. 2019. Tobacco related oral cancer. *BMJ* 5;365:I2142.

Conway DI, Purkayastha M, Chestnutt IG. 2018. The changing epidemiology of oral cancer: definitions, trends, and risk factors. *Br Dent J* 225(9):867-873.

Curioni OA, De Carvalho MB, Dedivitis RA, Rapoport A, Gattas, GJ. 2013. The influence of gene polymorphisms on tobacco and alcohol-induced oral cancer risk. *JCT* 4(5):978-988.

Emeville E, Broquère C, Brureau L, Ferdinand S, Blanchet P, Multigner L, Romana M. 2014. Copy number variation of GSTT1 and GSTM1 and the risk of prostate cancer in a Caribbean population of African descent. *Plos One* 9(9), e107275.

Ewa B, Danuta MŠ. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. 2017. *J Appl Genet* 58(3):321-330.

Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znoar A, Soerjomataram I, Bray F. 2020. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>

- Hayes JD, Strange RC. 2000. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 61(3):154-166.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. 2005. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51-88.
- He Y., Hoskins JM, Mcleod HL. 2011. Copy number variants in pharmacogenetic genes. *Trends Mol Med* 17(5): 244-251.
- Hopkins J, Cescon DW, Tse D, Bradbury P, Xu W, Ma C. et al. 2008. Genetic polymorphisms and head and neck cancer outcomes: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(3):490-499.
- Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. 2010. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 154(2):103-16.
- Karageorgi S, Prescott J, Wong JY, Lee IM, Buring JE, De Vivo I. 2011. GSTM1 and GSTT1 copy number variation in population-based studies of endometrial cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20(7):1447-1452.
- Li CC, Shen Z, Bavarian R, Yang F, Bhattacharya A. 2018. Oral cancer: genetics and the role of precision medicine. *Dent Clin North Am* 62(1):29-46.
- McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH, Sabeti PC, Zody MC, Barrett JC. 2006. Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet* 38(1):86-92.
- McLellan RA, Oscarson M, Alexandrie AK, Seidegård J, Evans DAP, Rannug A, Ingelman-Sundberg M. 1997. Characterization of a Human Glutathione S-Transferase μ Cluster Containing a Duplicated GSTM1 Gene that Causes Ultrarapid Enzyme Activity. *Mol Pharmacol* 52(6):958-965.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HFRN. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16(3):1215.
- Min SK, Choi SW, Lim J, Park JY, Jung KW, Won YJ. 2019. Second primary cancers in patients with oral cavity cancer included in the Korea Central Cancer Registry. *Oral Oncol* 95:16-28.

Nowakowska B. 2017. Clinical interpretation of copy number variants in the human genome. *J Appl Genet* 58(4):449-457.

Rivera C. 2015. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8(9):11884-94.

Saitou M, Satta Y, Gokcumen O, Ishida T. 2018. Complex evolution of the GSTM gene family involves sharing of GSTM1 deletion polymorphism in humans and chimpanzees. *BMC Genomics* 19(1):293.

Singh S. 2015. Cytoprotective and regulatory functions of glutathione S-transferases in cancer cell proliferation and cell death. *Cancer Chemother Pharmacol* 75(1):1-15.

Speleman F, Kumps C, Buysse K, Poppe B, Menten B, De Preter K. 2018. Copy number alterations and copy number variation in cancer: close encounters of the bad kind. *Cytogenet Genome Res* 123(1-4):176-182.

Sprenger R, Schlagenhauser R, Kerb R, Bruhn C, Brockmöller J, Roots I, Brinkmann U. 2000. Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype–phenotype correlation. *Pharmacogenetics* 10(6):557-565.

Sudmant PH, Mallick S, Nelson BJ, Hormozdiari F, Krumm N, Huddleston J, Coe BP, Baker C, Nordenfelt S, Bamshad M, et al. 2015. Global diversity, population stratification, and selection of human copy-number variation. *Science* 349(6253), aab3761.

U.S. Department of Health and Human Services. 2010. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health.

Wu B, Dong D. 2012. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 33(12):656-668.

Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. 2015. A copy number variation map of the human genome