Pâmela de Oliveira Soares

Expressão da glutationa S-transferase pi em pacientes com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço conforme os hábitos tabágico e etílico

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

Programa de: Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos

Orientadora: Maria Lúcia Bueno Garcia

Coorientadora: Raquel Ajub Moyses

SÃO PAULO

2017

Pâmela de Oliveira Soares

Expressão da glutationa S-transferase pi em pacientes com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço conforme os hábitos tabágico e etílico

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

Programa de: Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos

Orientadora: Maria Lúcia Bueno Garcia

Coorientadora: Raquel Ajub Moyses

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

SÃO PAULO

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Soares, Pâmela de Oliveira

Expressão da glutationa S-transferase pi em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço conforme os hábitos tabágico e etílico / Pâmela de Oliveira Soares. -- São Paulo, 2017.

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

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientadora: Maria Lúcia Bueno Garcia.

Coorientadora: Raquel Ajub Moysés

Aos meus pais, Sueli e Eliel por todo seu amor e dedicação.

Minha irmã Taline, exemplo de sucesso e motivação.

Meu sobrinho Igor Ramon, por sua alegria e amor contagiante.

“Em meio à dificuldade encontra-se a oportunidade”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido sabedoria para caminhar em direção aos meus objetivos.

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria Lúcia Bueno Garcia, exemplo de professora e orientadora, que me acolheu como profissional e enxergou em mim meus sonhos.

A Profa. Dra. Raquel Ajub Moyses, coorientadora ativa dessa dissertação. Agradeço por toda a sua dedicação ao longo da minha jornada acadêmica. Por sua amizade verdadeira, apoio em momentos difíceis e sobretudo pela sua seriedade como profissional, exemplo de motivação.

Ao Prof. Dr. Pedro Michaluart Jr (*i.m.*) por ter me proporcionado a oportunidade de ingressar no Lim 28 e aprender com sua ética, dedicação e respeito ao trabalhar com o próximo e ao lidar com momentos de dificuldade.

A todos os pacientes que em meio aos seus problemas de saúde contribuíram para que este e muitos outros trabalhos sejam executados a favor da ciência.

À Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury, por sua paciência e dedicação ao me ensinar com bom animo o seu talento como Patologista. A Profa. Elnara Marcia Negri e a Profa. Elia Tamaso Espin Garcia Caldini, bem como as Técnicas do laboratório pelo suporte e auxilio nas minhas análises de microscopia de luz.

A estatística Rossana Verónica Mendoza López pela sua paciência e pela sua dedicação no levantamento de dados e elaboração das análises estatísticas.

Ao Prof. Dr Marcos Tavares, pelas suas palavras de incentivo e por ter contribuído com seus valiosos comentários à qualificação dessa dissertação.

A Profa Dra Vera Capelozzi, bem como os professores Itamar Santos e Flavio Hojaij aos seus comentários à qualificação dessa dissertação.

A toda equipe do GENCAPO, essa dissertação é fruto da dedicação de muitos pesquisadores em levantar e analisar dados com qualidade e excelência.

A Jéssica Boscariol, pelas suas palavras amigáveis e paciência nos momentos de aflição durante o caminhar deste projeto.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Médicas, em especial à secretária Sra. Angélica Belém de Souza, por seu suporte, dedicação e palavras amigáveis em momentos de dificuldade no percurso pela pós-graduação.

As Sras. Ana Aparecida da Silva Justino Oliveira e Francisca Cátia de Oliveira, secretárias da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMUSP, pelo apoio e dedicação com o Lim 28, laboratório ao qual executei meu projeto.

Ao Centro Paula Souza, que contribuiu com o afastamento parcial das minhas atividades para melhor execução da pós-graduação. Em especial aos meus alunos e as diretoras de serviço Nataly Fernandes Savio e a Pamella Aparecida Ferreira da Silva.

Meus agradecimentos ao apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP e do Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer, pelo suporte aos projetos do GENCAPO.

Agradeço ainda a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Devo também, muitos agradecimentos especiais aos meus amigos, Henne Magalhães, Alexandre Henrique Basílio, Aline Myasaki, Natalia Madureira, Tamara Rodrigues, Mariana Fabrícia, Camila Fanelli, Gabriela Cozin Aragão, Tatiane Alves por todas as frases motivadoras, por todo apoio, carinho, companheirismo e amizade ao longo desta jornada.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS
LISTA DE SÍMBOLOS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE FIGURAS
RESUMO
ABSTRACT
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DA LITERATURA 3
2.1 Epidemiologia do Câncer de Cabeça e Pescoço e Fatores de risco 4
2.2 Câncer de Cabeça e Pescoço e glutationa S-transferases 6
2.3 Câncer de Cabeça e Pescoço e GSTPI 7
2.4 Justificativa do Trabalho 9
3. OBJETIVOS 10
4. MÉTODOS 11
4.1 População de estudo 11
4.2 Amostras de Câncer de cabeça e pescoço 12
4.3 Análise Imuno-histoquímica 12
4.4 HPV 14
4.5 Análise estatística 14
5. RESULTADOS 15
6. DISCUSSÃO 27
7. CONCLUSÃO 34
8. ANEXO 35
9. REFERÊNCIAS 37
APÊNDICE 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

400x	Aumento de 400 vezes
ADH	Álcool Desidrogenase
ALDH	Aldeído Desidrogenase
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP
CECP	Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GENCAPO	Genoma do Câncer de cabeça e pescoço
GST, GSTPI	Glutathiona-S-Transferase, Glutathiona-S-Transferase pi
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	*Human Papillomavirus* (Papilomavírus Humano)
NTE	Não Tabagistas e Etilistas
NTNE	Não Tabagistas e Não Etilistas
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
TNE	Tabagistas e Não Etilistas
TE	Tabagistas e Etilistas
TNM	Sistema TNM de Classificação de Tumores Malignos

LISTA DE SÍMBOLOS

DAB	3,3 Diaminobenzidine
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
KDa	Kilodaltons
Ml	Mililitro
PBS	Tampão Fosfato De Sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características da amostra total de pacientes..... 15
Tabela 2. Características clinicas da amostra pareada participante deste estudo 18
Tabela 3. Expressão de GSTPI conforme o hábito tabágico e etílico na margem e no tumor de pacientes com CECP 20
Tabela 4. Análise da associação de HPV em pacientes pareados NTNE e TE 22
Tabela 5. Análise da associação de HPV conforme a expressão de GSTPI na margem de pacientes NTNE 23
Tabela 6. Análise da associação de HPV conforme a expressão de GSTPI no tumor de pacientes NTNE 23
Tabela 7. Análise da associação de HPV conforme a expressão de GSTPI na margem de pacientes TE 24
Tabela 8. Análise da associação de HPV conforme a expressão de GSTPI no tumor de pacientes TE 25
Tabela 9. Análise de sobrevida em cinco anos dos pacientes não tabagistas/ não etilistas (NTNE) segundo a expressão da GSTPI em margem e tumor 26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma dos casos participantes deste estudo..... 17
Figura 2: Marcação pelo GSTPI 19
Figura 3: Fluxograma das amostras biológicas pareadas dos participantes deste estudo para análise de GSTPI 19
Figura 4: Fluxograma das amostras biológicas pareadas dos participantes deste estudo para as análises de HPV 21
Figura 5: Fluxograma das amostras biológicas de NTNE participantes das análises do HPV..... 22
Figura 6: Fluxograma das amostras biológicas de TE participantes das análises do HPV..... 24
Figura 7: Curvas de sobrevida para GSTPI em pacientes NTNE..... 26
Figura 8: Possíveis interpretações para os resultados encontrados.....37

RESUMO

Soares PO. *Expressão da glutationa S-transferase pi em pacientes com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço conforme os hábitos tabágico e etílico* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

O carcinoma epidermoide da cabeça e pescoço (CECP) tem alta prevalência mundial, alta morbimortalidade e impacto negativo na saúde individual e pública. Apresenta como principais fatores de risco o tabagismo, etilismo e infecção pelo Papilomavírus humano (HPV). A glutationa S-transferase pi (GSTPI) é uma enzima de detoxificação de carcinógenos com expressão aumentada em alguns tipos de câncer e parece associar-se a pior resposta terapêutica. Estudamos a expressão da GSTPI e a influência dos fatores de risco tabagismo, etilismo e HPV em amostras de tecido tumoral e margens não tumorais de portadores de CECP. Os dados foram obtidos do projeto temático Genoma do Câncer de Cabeça e Pescoço (GENCAPO). Os pacientes foram caracterizados: não tabagistas e não etilistas (NTNE) e tabagistas e etilistas (TE) e posteriormente pareados, perfazendo um total de 47 pares. O pareamento baseou-se em idade, sítio tumoral, estadiamento TNM, grau de diferenciação tumoral e variantes morfológicas. As amostras foram coradas por imuno-histoquímica para GSTPI e a presença de imunomarcação semiquantificada em escores de 0 a 3 (0: 0 a 10%; 1: de 10% a 30%; 2: de 31% a 60%: 3: para >60%).

Os dados foram analisados pelo teste de McNemar, Fisher, a sobrevida pela curva de Kaplan-Meier e teste de *long rank*. Houve expressão do biomarcador no tumor independente do hábito tabágico ou etílico. A expressão de GSTPI na margem do tumor foi maior no grupo TE (p=0,004). Não houve associação entre a marcação de GSTPI nas amostras de pacientes NTNE e TE em relação à positividade para HPV. Não houve óbitos no grupo NTNE com baixa imunomarcação no tumor, o que inviabilizou as análises de sobrevida neste grupo. Não houve diferença de sobrevida conforme a imunomarcação para GSTPI em margem de tumor (p=0.538). Este estudo demonstra que a marcação de GSTPI em CECP está presente no tumor independente do hábito.

Na margem do tumor, os fatores de risco tabagismo e etilismo associam-se a maior presença do biomarcador, sugerindo o papel da GSTPI na tentativa de eliminação destas toxinas.

Descritores: neoplasias de cabeça e pescoço; carcinoma de células escamosas; hábito de fumar; alcoolismo; papillomaviridae; glutationa transferase; imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Soares PO. *Expression of glutathione S-transferase pi in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck as smoking habits and ethyl* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) presents a high prevalence worldwide, high mortality and negative impact on individual and public health. Its main risk factors are tobacco, alcohol consumers and human papillomavirus infection (HPV). The pi glutathione S-transferase (GSTPI) is a carcinogen-detoxifying enzyme with increases expression in some kinds of cancer and it seems to worsen the therapy response. We studied the expression of GSTPI in tumors samples and the influence of risk factors; tobacco, alcohol and HPV. The data were obtained from Genome Head and Neck Cancer Thematic Project (GENCAPO). Patients were divided in two groups: non smokers and non drinkers (NSND) and smokers and drinkers (SD) and then selected in 47 pairs based on age, sex, tumor site, TNM staging, degree of tumor differentiation and morphological variants. Each pair was previously tested for HPV in GENCAPO project. Samples were stained by immunohistochemistry for GSTPI and analyzed by semi-quantitative method for scores from 0 to 3 according to immunostaning (0: 0 to 10%; 1: 10% to 30%; 2: 31% to 60% : 3: to> 60%).

Data were analyzed using McNemar test, Fisher and for survival analysis by the Kaplan-Meier curve and long rank test. The biomarker expression in the tumor was present in both groups independently of smoking and drinking habits. The GSTPI expression in tumor margin was higher in SD group ($p = 0.004$). There was no association between GSTPI expression and positivity for HPV in both groups. There were no deaths in NSND group presenting low tumor GSTPI expression, which prevented the survival analysis in this group. The survival rate was similar in both groups according to GSTPI immunostaining in tumor margin ($p = 0.538$). This study showed that the GSTPI biomarker in HNSCC was present independently of the smoking and drinking habit or positivity to HPV.

Tobacco and alcohol consumption were associated with greater biomarker expression in the tumor margin, suggesting that GSTPI may modulate the elimination of these toxins.

Descriptors: head and neck neoplasms; carcinoma, squamous cell; smoking; alcoholism; *papillomaviradae*; glutathione transferase; immunohistochemistry.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um grave problema de saúde pública, considerado uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. No Brasil a estimativa para 2016 está em aproximadamente 600 mil casos novos (Inca, 2016).

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) abrange todos os tumores de origem epitelial que se originam nos seios paranasais, cavidade nasal, cavidade oral, faringe e laringe. O CECP é a oitava causa mais comum de morte por câncer no mundo (Fung e Grandis, 2010).

O tabagismo, o etilismo e as infecções por HPV são os principais fatores de risco para esta neoplasia (Argiris e Eng, 2003). Não obstante, nem todos os tabagistas e etilistas desenvolvem CECP, o que sugere que fatores genéticos e ambientais também podem contribuir para a carcinogênese.

Estudos recentes indicam alterações polimórficas em genes que codificam enzimas responsáveis por eliminar carcinógenos e que podem aumentar ou diminuir o papel destas enzimas e assim, contribuir para o desenvolvimento de neoplasias (Mcwilliams *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2008; Lang *et al.*, 2012; He *et al.*, 2016).

As glutationa S-transferases (GSTs) representam uma família gênica com sete isoformas conhecidas (Alpha, Mu, Omega, Pi, Sigma, Theta e Zeta), as quais desempenham um papel importante na proteção das células contra o efeito citotóxico e carcinogêno de substâncias nocivas (Hayes e Pulford, 1995; Mcilwain *et al.*, 2006).

A Glutationa S-transferase pi (GSTPI) está expressa em tecidos normais do trato urinário, digestório e respiratório, sugerindo assim que essa isoforma apresenta papel importante na eliminação de substancias tóxicas (Terrier *et al.*, 1990).

Outros estudos ainda demostram seu papel na resistência aos quimioterápicos no tratamento de alguns tipos de câncer (Kimura *et al.*, 2004; Schumaker *et al.*, 2008). Entretanto há poucos estudos que analisam a

expressão e o papel da GSTPI em câncer de cabeça e pescoço (Sarkar *et al.*, 1997b).

Considerando que o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é frequente na população brasileira e que poucos estudos analisam o papel da GSTPI nessa neoplasia, propusemos pesquisar a expressão da Glutationa S-transferase pi correlacionado com a sobrevida desses pacientes, bem como, analisar a expressão da GSTPI conforme os hábitos tabágico e etílico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O câncer é considerado um grave problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento. No Brasil, também representa um impacto na saúde pública, apresentando uma prevalência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer estimados para o biênio de 2016-2017, segundo o Ministério da Saúde (Inca, 2015).

O câncer apresenta origem multifatorial. Entre os fatores de risco associados à sua etiologia podemos citar envelhecimento e hábitos de vida como tabagismo, obesidade, hábito sexual, exposição a agentes carcinogênicos, consumo de bebidas alcoólicas, uso de enxaguantes bucais, hábitos alimentares, entre outros (Colombo e Rahal, 2009; Ahrens *et al.*, 2014).

O câncer de cabeça e pescoço é um termo coletivo definido por bases anatômicas e topográficas para designar tumores malignos do trato aerodigestivo superior. Abrange todos os tumores de origem epitelial que se originam nos seios paranasais, cavidade nasal, cavidade oral, faringe e laringe (Dobrossy, 2005; Choong e Vokes, 2008).

É frequentemente diagnosticado em estágios avançados, por fatores diversos como desinformação e dificuldade de acesso a cuidados de saúde, ausência de sintomas em estágios iniciais, entre outros. Os sintomas podem variar de acordo com o sítio de localização tumoral e estadiamento. Pode ter impacto importante na qualidade de vida uma vez que afeta funções como deglutição, fala, paladar e olfato, além de se associar frequentemente a dor, obstrução das vias aéreas e fístulas (Vickery *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2011).

Apesar de inovações nas modalidades terapêuticas, a sobrevida de pacientes com CECP sofreu melhoras modestas nas últimas décadas (Davidson e Shanks, 2017).

2.1 Epidemiologia do Câncer de Cabeça e Pescoço e Fatores de risco

O Carcinoma Epidermoide da Cabeça e do Pescoço (CECP) está entre as neoplasias mais comuns do mundo, sendo a cavidade oral o local de maior incidência (Syrjanen, 2005; Choong e Vokes, 2008).

Os fatores de riscos como tabagismo, etilismo e infecções por HPV estão diretamente associados ao desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço, que apresenta cerca de 84 mil novos casos de câncer estimados para o ano de 2020 em ambos os sexos para regiões da cavidade oral, laringe, nasofaringe e outras partes da faringe. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer a incidência para câncer de cavidade oral é crescente e estimada em 11.140 casos de câncer da cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres. Isso significa um risco estimado de 11,27 casos novos a cada 100 mil homens e cerca de 4,21 a cada 100 mil mulheres (Inca, 2012). Cerca de 80% das neoplasias são relacionadas às influências ambientais, principalmente às relacionadas com os hábitos de vida. O mesmo ocorre no câncer de cabeça e pescoço (Dos Santos *et al.*, 2012).

Estudos apontam que o fumo é responsável por cerca de 42% dos óbitos por essa neoplasia. Já o etilismo corresponde a aproximadamente 16% dos óbitos (Inca, 2012). Outro fator é a infecção por variantes oncogênicas pelo Papilomavírus humano (HPV tipo 16 e 18) responsável por cerca de metade de cânceres de cabeça e pescoço, principalmente em praticantes de sexo oral sem o uso de preservativo e com múltiplos parceiros. No Brasil não há estimativa concreta sobre o número de tumores de cabeça e pescoço causados pelo HPV, entretanto de acordo com American Cancer Society nos Estados Unidos, estima-se que 42.440 casos foram registrados em 2014. Outros fatores de risco para CECP ainda permanecem desconhecidos. Outro dado relevante e intrigante é que apesar do tabagismo e etilismo serem fatores de risco importantes para o desenvolvimento de CECP, a incidência associada a estes fatores vem diminuindo, o que pode ser explicado pela diminuição dos hábitos tabágico e etílico em alguns países. Não obstante, segundo (Shiboski *et al.*, 2005) a incidência de tumores de cavidade oral e orofaringe aumenta, principalmente em pacientes com menor ou nenhuma exposição ao tabaco. Corroborando com

estes achados estudos recentes afirmam que a proporção de mulheres acometidas com CECP costuma-se ser maior em pacientes NTNE do que em pacientes TE. Cerca de 2 a 14% dos pacientes com CECP não fumam e, desses, a maioria também não consome álcool (Koch *et al.*, 1999; Wiseman *et al.*, 2003).

Diversos fatores de risco são explicados para esse grupo de pacientes, como a infecção por HPV, imunossupressão e susceptibilidade genética, entre outros. Ainda assim, nenhum fator de risco pode ser atribuído a uma significativa parte desses casos (Lingen *et al.*, 2001).

Além do consumo de tabaco, de álcool e infecções pelo HPV, alguns outros fatores de risco são descritos para o CECP como dieta alimentar deficiente de micronutrientes, pobre em fibras e rica em gorduras saturadas, histórico familiar positivo para câncer, comportamento sexual sem proteção e com múltiplos parceiros, baixo índice de massa corpórea, exposição a agentes cancerígenos, entre outros (Galbiatti *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2014).

Algumas pesquisas recentes descrevem evidências de genes ligados ao desenvolvimento do CECP, entretanto nenhum método citogenético ou molecular encontra-se validado para a aplicabilidade clínica (Leemans *et al.*, 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde o tabagismo é a segunda causa de morte no mundo. Seu consumo causa cerca de mais de 5 milhões de mortes anualmente e as tendências atuais sugerem que o tabaco causará mais de 8 milhões de mortes anualmente até 2030 e 1 bilhão de mortes durante o século 21. Estima-se que a tendência global para o uso do tabaco é estável ou está em declínio em países desenvolvidos, entretanto ainda aumenta em países com baixa renda. No Brasil, um terço da população adulta fuma, estimam-se 200 mil óbitos anuais relacionados ao fumo. Mais de 60 carcinógenos são detectados no cigarro. Entre esses, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, as nitrosaminas e as aminas aromáticas destacam-se por serem considerados potentes (Hecht, 2003). Sabe-se que quanto maior a quantidade de cigarros, principalmente a duração do hábito, maior o risco de desenvolvimento de CECP (Lubin *et al.*, 2009).

O uso abusivo do álcool é um fator de risco para muitas doenças e condições crônicas tais como câncer, diabetes, doenças neuropsiquiátricas,

digestivas, cardiovasculares e medidas de intervenção devem ser atribuídas para diminuir seu consumo (Shield *et al.*, 2013). O mecanismo carcinogênico do álcool ainda é pouco conhecido e relacionado às deficiências imunológicas e nutricionais associadas ao etilismo e sua metabolização no organismo. Na principal rota de degradação, o álcool é convertido pela enzima álcool-desidrogenase (ADH) em acetaldeído, e este em acetato pela enzima aldeído-desidrogenase (ALDH). A atividade da ALDH é pequena na mucosa da cavidade oral, o que pode levar a acúmulo de acetaldeído no epitélio bucal. O acetaldeído é um gerador importante de radicais livres, além de ser um conhecido carcinogênico, levando à maior propensão a desenvolver câncer no trato aerodigestório. (Yokoyama e Omori, 2005). Quando tabaco e álcool são associados, o risco para câncer é maior que a multiplicação dos riscos isolados de cada um deles (Hashibe *et al.*, 2009).

Sugere-se que um dos fatores responsáveis pelo efeito carcinogênico sinérgico seria a diluição do álcool na mucosa aerodigestiva pós ingestão, aumentando a ação de outros carcinógenos, como os presentes no tabaco (Yokoyama e Omori, 2005).

Entretanto estudos populacionais sobre CECP pareados entre pacientes tabagistas e etilistas e não portadores desses hábitos são escassos na literatura, visto que a prevalência na população de portadores desse tumor sem uso do tabaco e abuso do álcool é rara.

2.2 Câncer de Cabeça e Pescoço e glutationa S-transferases

No entanto, nem todos os tabagistas e etilistas desenvolvem CECP, o que sugere que fatores genéticos também possam contribuir para a carcinogênese. As principais famílias gênicas que codificam enzimas envolvidas na eliminação de carcinógenos do tabaco e reparo do DNA são as do Citocromo P-450 e da glutationa S-transferases, que atuam na ativação (fase I) e detoxificação (fase II) dos xenobióticos, respectivamente. Estudos recentes demonstram que polimorfismos genéticos que alteram a função dessas enzimas podem influenciar o processo de detoxificação e assim, contribuir para a carcinogênese (Lacko *et al.*, 2009; Lang *et al.*, 2012).

Apesar dos achados ainda serem em parte inconsistentes, um estudo observou que os níveis de GSTPI diferem em amostras de células tumorais quando comparados à mucosa normal e que ainda apresentavam aumento significativo da expressão desta enzima, conforme o grau da lesão (Bentz *et al.*, 2000).

Um dos mais importantes sistemas de detoxificação é a glutationa S-transferase (GST) que pertence à família de enzimas multifuncionais que catalisam e eliminam compostos nocivos ao organismo (Hayes *et al.*, 2005). Enzimas da família GST apresentam função primária de impulsionar a detoxificação dos eletrólitos capazes de se ligar ao DNA. Exercem assim, papel essencial na proteção de tecidos, combatendo os radicais livres (Peters *et al.*, 2006). Para evitar o acúmulo destes xenobióticos nocivos nas células, os organismos vivos desenvolveram diferentes alternativas para a eliminação destes compostos químicos estranhos (Xu *et al.*, 2005; Masood *et al.*, 2011).

Apesar de muitas enzimas serem necessárias para reconhecer e metabolizar todos os possíveis compostos, a biotransformação de xenobióticos foi dividida em duas fases: primeiramente, as drogas são metabolizadas por enzimas da fase I, muitas vezes numa reação de oxidação para a criação de centros reativos. Na fase II, as enzimas introduzem na molécula compostos hidrofílicos, semelhantes à glutationa ou um grupo acetil, para permitir que ela seja eliminada (Gattas e Soares-Vieira, 2000; Hatagima, 2002).

2.3 Câncer de Cabeça e Pescoço e GSTPI

A glutationa S-transferase pi, frequentemente conhecida pela abreviação GSTPI, é uma enzima homodimérica de 24 kDa e é conhecida como um gene altamente polimórfico (Vasieva, 2011). Por ser uma isoforma de GST, também apresenta um papel essencial na biotransformação e na eliminação destas substâncias nocivas ao organismo e na proteção das células contra o estresse oxidativo. Sugere-se que as isoformas da GST (GSTM1, GSTT1 e GSTP1) forneçam proteção celular contra danos mediados por radicais livres. Segundo (Gattas e Soares-Vieira, 2000), o polimorfismo de um ou mais genes, que codificam essas enzimas, aumentam a ativação de agentes carcinogênicos ou diminuem a capacidade de inativá-los ou ambas as situações, sendo provável

que indivíduos portadores de algumas dessas variantes tenham risco aumentado de câncer quando expostos a carcinógenos.

A GSTPI tem seu gene localizado no cromossomo 11q13 e codifica uma enzima expressa primariamente em tecidos da placenta, baço, coração e pulmão. Esta enzima caracteriza-se por catalisar o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutationa (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre. Três polimorfismos genéticos foram descritos em GSTPI. Segundo (Board *et al.*, 1990), existem três diferentes alelos de GSTPI, denominados GSTPI*A que é o alelo selvagem, GSTPI*B e GSTPI*C.

Estes polimorfismos são resultantes de uma substituição de aminoácidos na proteína. Um desses polimorfismos foi descrito no éxon 5 e outro no éxon 6. Entretanto somente a alteração no éxon 5 está relacionada à atividade enzimática. Essa alteração genética acarreta no polimorfismo no códon 105, em que a transformação de adenina para guanina (A/G), na sequência de DNA codificador, resulta em substituição de um resíduo de isoleucina por valina (Ile/Val) no produto final da proteína. Indivíduos que carregam alelos alterados e codificadores de enzimas de detoxificação menos eficientes, como o polimorfismo A/G no éxon 5 de GSTPI, parecem apresentar maior risco para desenvolver câncer (Strange e Fryer, 1999; Wang *et al.*, 2003; Amâncio *et al.*, 2010). Desse modo, são estudados em tumores de diferentes origens (Zimniak *et al.*, 1994; Olshan *et al.*, 2000; Gsur *et al.*, 2001).

Outra função importante realizada pela enzima GSTPI é a resistência aos quimioterápicos no tratamento de alguns tipos de câncer. Através de sua ação de detoxificação, a GSTPI parece impedir a ação de agentes químicos que destroem células neoplásicas (Schumaker *et al.*, 2008). Corroborando com estes achados, pesquisas recentes demonstraram que a elevada expressão de GSTPI está associada com o desenvolvimento de resistência a quimioterápicos e em contraste, o silenciamento deste gene aumenta a sensibilidade do tumor ao quimioterápico (Depeille *et al.*, 2005; Ruzza *et al.*, 2009) .

Desta forma, sugere-se que a baixa expressão de GSTPI pode estar associada à melhor resposta à quimioterapia e ao melhor prognóstico. Entretanto, por a GSTPI estar diretamente relacionada ao desenvolvimento de resistência a fármacos, representa uma barreira importante para o tratamento

adequado de vários tipos de câncer (Tew e Ronai, 1999; Park e Lenz, 2006; Schumaker *et al.*, 2008).

Alguns estudos demonstram que a expressão da glutationa pode estar caminhando em conjunto com a sobrevida dos pacientes que desenvolveram CECP. Uma vez que os níveis de expressão de GSTPI comportam-se de forma distinta conforme o grau da lesão (Bentz *et al.*, 2000).

Acredita-se ainda que a GSTPI possa ser utilizada como marcador de suscetibilidade para tumores relacionados ao tabagismo e/ou etilismo, como o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) (Ruwali *et al.*, 2009).

Hipotetizamos assim que, a diminuição dos níveis de GSTPI pode contribuir para os primeiros passos do processo de carcinogênese através de diminuição na capacidade celular para desintoxicar ou inativar agentes cancerígenos permitindo que interajam com o DNA e iniciem ou promovam o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. Neste trabalho visamos estudar a expressão de GSTPI em amostras de CECP subdivididas em dois grupos de pacientes: tabagistas e etilistas (TE) e não tabagistas e não etilistas (NTNE), para analisar a relação deste marcador com fatores de risco para CECP. A importância de analisar em pacientes NTNE deve-se ao fato de permitir testar a relação do marcador independente dos hábitos apresentados pelo paciente.

Desse modo, objetivo deste trabalho consiste em analisar a expressão de glutationa S-transferase pi em amostras de tumores da CECP, correlacionando com a sobrevida desses pacientes, bem como, analisar a expressão da GSTPI conforme os fatores de risco tabagismo, etilismo e infecção por HPV.

2.4 Justificativa do Trabalho

Acreditamos que a expressão da GSTPI tem significados diferentes em pacientes NTNE e TE, uma vez que a exposição a esses carcinógenos pode alterar a expressão da GSTPI. Da mesma forma, acreditamos que pode estar relacionada ao prognóstico desses pacientes. Os resultados desse estudo poderão contribuir para melhor compreensão do papel da expressão da GSTPI no CECP.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral: Comparar a expressão de glutationa S-transferase pi (GSTPI) em amostras tumorais de pacientes NTNE e TE portadores de CECP.

Objetivos Específicos: Em amostras tumorais e margens não tumorais de pacientes portadores de CECP, analisar:

- as diferenças na expressão de GSTPI no tumor e na margem de tumor em pacientes TE e NTNE;
- a sobrevida global para o câncer conforme a expressão de GSTPI em não tabagistas e não etilistas;
- a expressão de GSTPI em amostras de pacientes NTNE e TE conforme a positividade para o HPV.

4. MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal de pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral (exceto lábio), orofaringe, laringe e hipofaringe, acima de 18 anos, sem tratamento prévio para câncer e prospectivamente incluídos em um banco de tumores de CECP de janeiro de 2001 a fevereiro de 2009.

Este estudo é um subprojeto do projeto temático multicêntrico “Busca de marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço” que foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do HCFMUSP, inscrito sob o número 0511/07, executado pelo grupo de pesquisadores GENCAPO.

O GENCAPO (GENCAPO - Genoma do Câncer de Cabeça e Pescoço) é formado por um grupo de pesquisadores multidisciplinares dos serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço de cinco instituições: Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho de São Paulo, Hospital Heliópolis de São Paulo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), Universidade do Vale do Paraíba de São José dos Campos e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto.

O subprojeto “Expressão de glutationa S-transferase pi em pacientes com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço conforme os hábitos tabágico e etílico.” teve a aprovação do comitê de ética CAPPesq número 0511/07 como emenda do projeto temático de origem. Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram termo de consentimento.

4.1 População de estudo

As amostras biológicas são provenientes do estudo “Análise clínica e molecular de pacientes não tabagistas e não etilistas com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço” que foram utilizadas neste estudo para analisar a expressão de GSTPI nas amostras coletadas de câncer de cabeça e pescoço.

Os critérios de inclusão e exclusão, e de tabagista e etilista seguem parâmetros internacionais e consistem em considerar como tabagistas, aqueles que fumaram ao menos um cigarro, charuto ou cachimbo, diariamente, por pelo menos um ano em sua vida. Para classificação do consumo de álcool, pacientes foram considerados como etilistas se consumiam bebidas alcoólicas pelo menos uma vez ao mês de forma regular (Moysés, 2011).

Foram incluídos 1633 pacientes de ambos os sexos portadores de CECP no projeto “Marcadores de Agressividade em Tumores de Cabeça e Pescoço”. Destes foram identificados 80 pacientes não tabagistas e não etilistas (NTNE) e 1374 pacientes tabagistas e etilistas (TE). O restante eram 140 tabagistas e não etilistas e 39 eram não tabagistas e etilistas (Moyses *et al.*, 2013).

Pacientes TE foram pareados aos NTNE por sexo, idade (+/-5anos), sitio tumoral, estadiamento TNM, grau de diferenciação tumoral e variante morfológica, sendo identificados 47 pares de participantes (Moysés, 2011).

Os 47 pares de participantes selecionados foi a população escolhida para este trabalho.

4.2 Amostras de Câncer de cabeça e pescoço

Foram recuperados blocos de parafina provenientes de biópsias e intervenções cirúrgicas dos pacientes NTNE e de seus pares TE selecionados, junto aos serviços de Anatomia Patológica de cada instituição participante. Sempre que possível, selecionamos amostras de tecido tumoral e margem adjacente não tumoral.

4.3 Análise Imuno-histoquímica

Todas as amostras foram fixadas em formalina e embebidas em parafina. Os cortes dos blocos foram realizados com 3µm de espessura, embebidos em parafina e montados em lâminas previamente sinalizadas. As lâminas foram então desparafinizadas e reidratadas. Para a recuperação antigênica as lâminas foram colocadas em tampão especifico para GSTPI tris EDTA pH 9.0 já aquecido.

Após resfriamento por 20 minutos, seguiram-se duas lavagens em tampão fosfato de sódio (PBS) por três minutos. Foi realizado o bloqueio com a

peroxidase endógena com a lavagem das lâminas em Metanol, PBS e peróxido de hidrogênio por 20 minutos. Seguiram-se dois banhos de três minutos cada em PBS. Para o bloqueio dos sítios inespecíficos, gotejou-se na lâmina uma gota de Background Sniper do Kit Starr Trek Detection (Biocare®, Califórnia) por 10 minutos.

O anticorpo utilizado foi o Novocastra NCL-L-GSTpi-438 (Leica Biosytems Reino Unido) que é recomendado para avaliar a expressão GSTPI em amostras de tecido normal e neoplásico. O anticorpo foi diluído de acordo com as orientações do fabricante e gotejado nas lâminas por 1 hora.

Posteriormente, prosseguiu-se com duas lavagens em PBS por 3 minutos e então os cortes foram incubados com o anticorpo secundário do Kit Starr Trek Detection (Biocare®, Califórnia, EUA), de modo que primeiro gotejou-se uma gota de Trekkie Universal Link sobre cada lâmina por 30 minutos, seguiu-se com uma gota de Trekavidin – HRP Label por 30 minutos e fez-se a lavagem das lâminas com 2 banhos de PBS entre uma etapa e outra.

Executou-se a revelação com cromógeno Betazoid DAB Substrate Buffer + Betazoid DAB chromogen do Kit Starr Trek Detection (Biocare®, Califórnia, EUA), gotejando-se o DAB preparado conforme o fabricante e aguardando em média 03 minutos pela revelação.

As lâminas então foram contracoradas com Hematoxilina por 10 segundos, após duas lavagens em PBS por 3 minutos. Prosseguiu-se com banhos em água corrente e uma bateria de hidratação com 15 banhos rápidos com Álcool 96%, 5 banhos rápidos em álcool absoluto, 5 banhos rápidos em Xilol II e Xilol I até a montagem das lâminas. Finalmente, as lâminas foram montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

O controle externo negativo foi submetido a todos os passos do processo, exceto a exposição ao anticorpo. O controle externo positivo utilizado era constituído de um bloco de amostras teciduais sabidamente positivas para o anticorpo GSTPI.

A quantificação da imunoexpressão foi realizada por uma patologista e uma bióloga, de forma cega aos dados clínicos, através de um sistema semi-quantitativo e analisando toda a extensão do tecido tumoral e não tumoral das lâminas. Os critérios adotados foram: 0 para a inexistência de imunomarcação

ou imunomarcação detectável em menos de 10% das células; 1 para 10% a 30% de células coradas; 2 para 31% a 60% de células coradas; e 3 para mais de 60% de marcação das células (Tremblay *et al.*, 2006). Para a análise dos dados, os valores de 2 e 3 foram estratificados como expressão alta da GSTPI, enquanto valores de 0 e 1 foram denominados expressão baixa de GSTPI (Nishimura *et al.*, 1996).

4.4 HPV

A positividade para o HPV nas amostras de pacientes com CECP foram analisadas pelo método de detecção do DNA por PCR, como descrito Moyses et al, 2011.

4.5 Análise estatística

A análise de Imuno-histoquímica para a expressão da GSTPI tanto no tumor como na margem tumoral foi testado para os fatores de risco tabagismo, etilismo e positividade para HPV.

A relação da expressão de GSTPI com a sobrevida foi feita somente nas amostras de pacientes NTNE. Os dados foram inicialmente submetidos às análises descritivas. Para dados contínuos calculou-se a média, mediana, dispersão, homogeneidade e normalidade. Os dados categóricos foram expressos em porcentagem. Os dados de expressão da GSTPI na margem e tumor foram categorizados e comparados entre os dois grupos de pacientes pelo teste de McNemar para amostras pareadas.

Sobrevida global em 5 anos conforme a expressão de GSTPI realizada apenas no grupo de pacientes NTNE foi calculada como o tempo em anos entre a data do fim do tratamento e o óbito ou última informação do paciente. As curvas de sobrevida foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e as comparações entre as curvas foram realizadas pelo teste log-rank.

A associação entre a marcação do GSTPI e a positividade para o HPV foi realizada através do teste exato de Fischer.

O nível de significância foi de 5% bicaudal. As análises estatísticas foram realizadas no software estatístico SPSS para Windows v.18.

5. RESULTADOS

A **tabela 1** apresenta o perfil epidemiológico, clínico e patológico dos pacientes NTNE e TE da coorte original. Nota-se o predomínio de pacientes homens no grupo TE, enquanto de mulheres no grupo NTNE. Quanto ao sítio anatômico a cavidade oral é o sitio mais frequente em ambos os grupos.

Por diferenças no perfil inerentes aos grupos, foi possível o estabelecimento de apenas 47 pares de pacientes NTNE:TE, baseados em sexo, idade (+/-5anos), sitio tumoral, estadiamento TNM, grau de diferenciação tumoral e variantes morfológicas (Moyses et al, 2011). Alguns pacientes TE foram usados como pares de mais de um paciente NTNE, como estratégia de imputação de dados (Andridge e Little, 2010).

Tabela 1. Características da amostra total de pacientes

Característica	**NTNE**	**TE**
	N=80	N=1374
	N (%)	N (%)
Gênero		
Feminino	57 (71,3)	96 (7,0)
Masculino	23 (28,8)	1278 (93,0)
Idade (em anos)		
Média (DP)	62,79 (16,30)	57,13 (9,79)
Sítio anatômico		
Cavidade oral	50 (62,5)	493 (35,9)
Cavidade oral+faringe	7 (8,8)	114 (8,3)
Orofaringe	11 (13,8)	241 (17,5)
Laringe	11 (13,8)	384 (27,9)
Hipofaringe	1 (1,3)	119 (8,7)
Vários sítios	0	23 (1,7)

Estádio clínico*		
0	0	1 (0,1)
I	10 (13,5)	87 (6,6)
II	16 (21,6)	199 (15,1)
III	13 (17,6)	266 (20,2)
IV	35 (47,3)	763 (58,0)
Grau de diferenciação		
Bem diferenciado	42 (55,3)	419 (34,0)
Moderadamente diferenciado	29 (38,2)	702 (57,0)
Pouco diferenciado	5 (6,6)	110 (8,9)
Variante morfológica		
Clássico	70 (94,6)	1151 (95,4)
Verrucoso	2 (2,7)	5 (0,4)
Escamoso basaloide	1 (1,4)	24 (2,0)
Papilífero	1 (1,4)	2 (0,2)

*Tabela 1: NTNE: não tabagista e não etilista; TE: tabagista e etilista; DP: desvio padrão; *estádio clínico conforme sistema TNM. Adaptado de Moyses, RA (2011).*

A **figura 1** apresenta o fluxograma dos casos participantes deste estudo. Foram incluídos 1633 pacientes de ambos os sexos portadores de CECP provenientes do projeto “Marcadores de Agressividade em Tumores de Cabeça e Pescoço”. Destes, foram identificados 80 pacientes não tabagistas e não etilistas (NTNE) e 1374 pacientes tabagistas e etilistas (TE). O restante eram 140 tabagistas e não etilistas e 39 eram não tabagistas e etilistas. Para este estudo foram selecionados 47 pares de pacientes NTNE e TE correspondente, conforme os critérios de pareamento.

Figura 1. Fluxograma dos casos participantes deste estudo

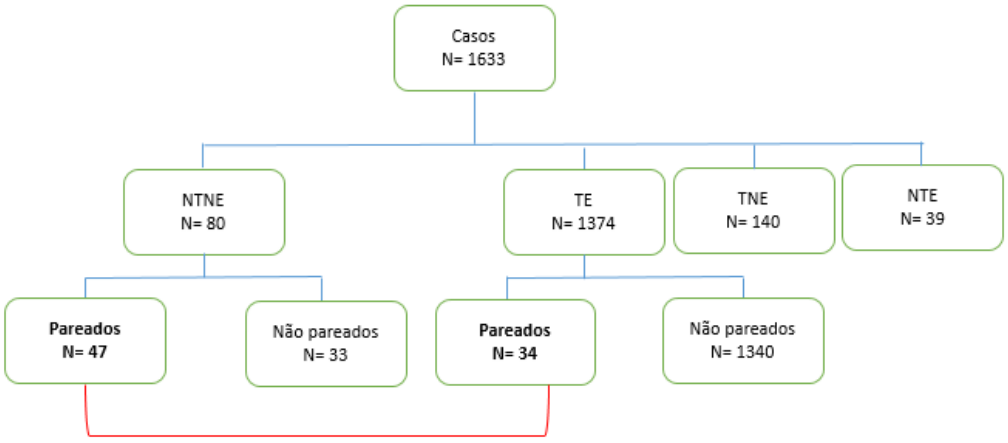

Figura 1: NTNE: não tabagista e não etilista; TE: tabagista e etilista; TNE: tabagista e não etilista; NTE: não tabagista e etilista.

Tabela 2 apresenta as características clínicas da amostra pareada participante deste estudo. Dos 47 pares formados observa-se casos de CECP, principalmente na cavidade oral.

Tabela 2. Características clinicas da amostra pareada participante deste estudo

Característica	NTNE	TE
	N=47	N=47
	N (%)	N (%)
Sítio anatômico		
Cavidade oral	33 (70,2)	33 (70,2)
Cavidade oral+faringe	2 (4,3)	2 (4,3)
Orofaringe	1 (2,1)	1 (2,1)
Laringe	10 (21,3)	10 (21,3)
Hipofaringe	1 (2,1)	1 (2,1)
Classificação T		
T_1	10 (21,3)	16 (34,0)
T_2	18 (32,3)	10 (21,3)
T_3	6 (12,8)	4 (8,5)
T_4	13 (27,7)	17 (36,2)
Classificação N		
N_0	29 (61,7)	29 (61,7)
N+	18 (38,3)	18 (38,3)
Grau de diferenciação		
Bem diferenciado	28 (62,2)	22 (46,8)
Moderadamente diferenciado	16 (35,6)	24 (51,1)
Pouco diferenciado	1 (2,2)	1 (2,1)
Variante morfológica		
Clássico	41 (97,6)	42 (91,3)
Verrucoso	0	
Escamoso basalóide	1 (2,4)	4 (8,7)

Tabela 2: NTNE: não tabagista e não etilista; TE: tabagista e etilista;

Diferenças da expressão de GSTPI em NTNE e TE

A figura 2 exemplifica a marcação de expressão de GSTPI no tecido tumoral e marginal em amostras de pacientes TE e NTNE.

Figura 2: Marcação pelo GSTPI

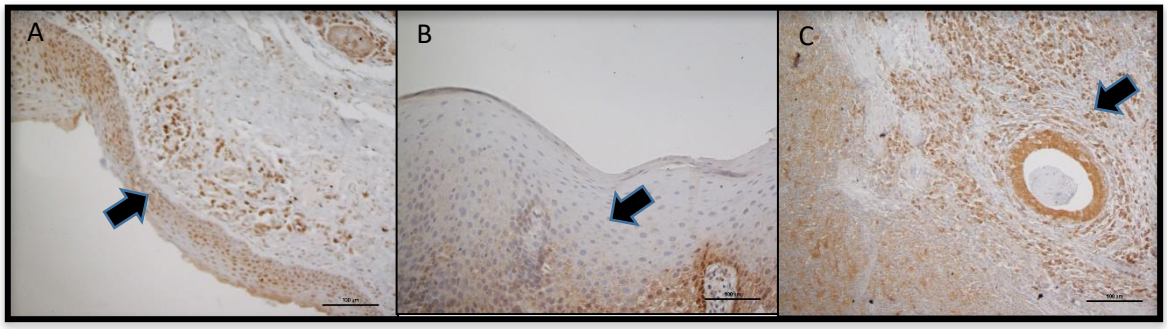

Figura 2: A: expressão de GSTPI alta em margem; B: expressão de GSTPI baixa em margem; C: expressão de GSTPI alta em tumor

A **figura 3** apresenta o fluxograma das amostras biológicas pareadas utilizadas neste estudo. Foram selecionados 47 pares de pacientes NTNE e TE correspondente, conforme os critérios de pareamento.

Figura 3: Fluxograma das amostras biológicas pareadas dos participantes deste estudo para análise de GSTPI

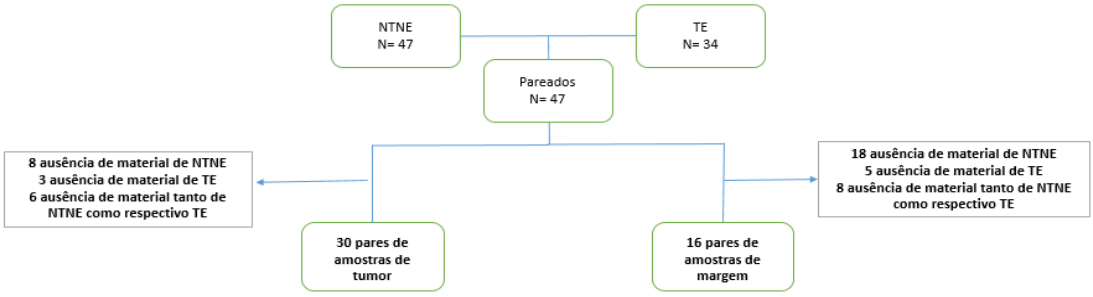

Figura 3: NTNE: não tabagista e não etilista; TE: tabagista e etilista.

A **tabela 3** apresenta dados de pacientes TE e NTNE de acordo com expressão baixa ou alta da GSTPI a fim de se estabelecer a quantidade de pares (NTNE:TE) em que os pacientes foram concordantes (negativo: negativo ou positivo: positivo) ou discordantes (positivo: negativo ou negativo: positivo). Do total de 16 pares possíveis para marcação do GSTPI na margem de tecido não tumoral, 56.3% dos pares eram discordantes e compostos por uma marcação alta para TE e baixa para o NTNE (*p*=0.004). Já para a marcação do GSTPI no tumor, dos 30 pares possíveis, 90% foram concordantes, com marcação alta tanto para NTNE quanto para TE (*p*=1).

Tabela 3. Expressão de GSTPI conforme o hábito tabágico e etílico na margem e no tumor de pacientes com CECP

		Tabagista / Etilista (TE)		Total	*p*¥
Não tabagista / não etilista (NTNE)	GSTPI margem	Baixa	alta		0,004
	baixa	1 (6,3%)*	9 (56,3%) #	10 (62,5%)	
	alta	0#	6 (37,5%)*	6 (37,5%)	
	GSTPI tumor	Baixa	alta		1
	baixa	0*	2 (6,7%) #	2 (6,7%)	
	alta	1 (3,3%) #	27 (90,0%)*	28 (93,3%)	

Tabela 3: ¥*McNemar *pares concordantes #pares discordantes; NTNE: não tabagista e não etilista; TE: tabagista e etilista; GSTPI: glutationa S-transferase;*

A **figura 4** apresenta o fluxograma das amostras biológicas pareadas utilizadas neste estudo para as análises do HPV. Para este estudo foram selecionados 33 pares de pacientes NTNE e TE correspondente, conforme os critérios de pareamento.

Figura 4: Fluxograma das amostras biológicas pareadas dos participantes deste estudo para as análises de HPV

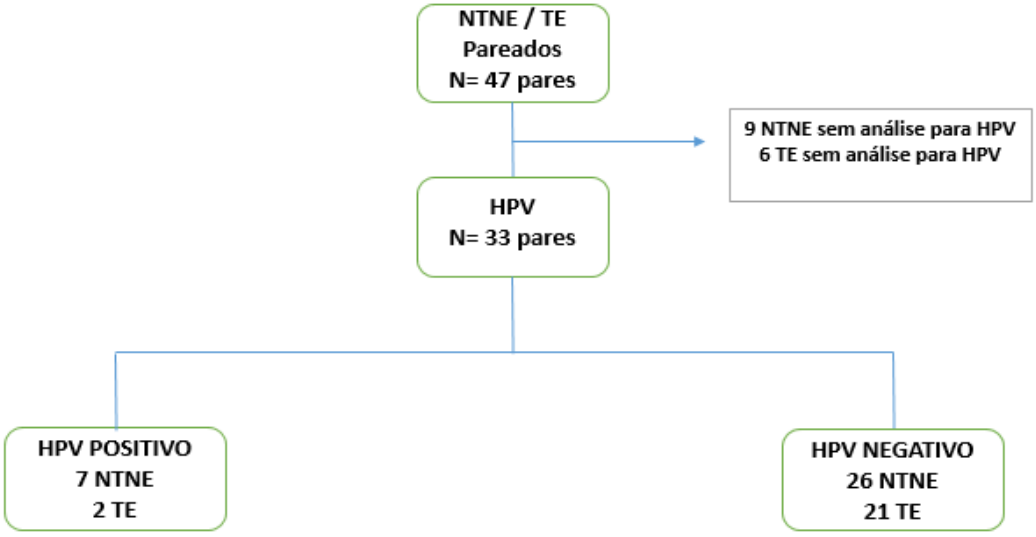

Figura 4: NTNE: não tabagista e não etilista; TE: tabagista e etilista; HPV: papilomavírus humano.

A **tabela 4** apresenta os resultados da associação entre a positividade para HPV provenientes de Moyses et al, 2011 em pacientes pareados não tabagistas e não etilistas (NTNE) e os tabagistas e etilistas (TE). Não há associação na marcação do HPV conforme o hábito tabágico e etílico.

Tabela 4. Análise da associação de HPV em pacientes pareados NTNE e TE

		TE		p¥
Não tabagista / não etilista (NTNE)	**HPV**	**HPV Negativo**	**HPV positivo**	0,180
	negativo	24 (92,3%)	2 (7,7%)	
	positivo	7(100%)	0	

Tabela 4: ¥*McNemar; NTNE: não tabagista e não etilista; TE: tabagista e etilista; HPV: papilomavírus humano;*

A **figura 5** apresenta o fluxograma das amostras biológicas utilizadas neste estudo para as análises do HPV de NTNE. Para este estudo foram selecionadas 47 amostras de pacientes NTNE.

Figura 5: Fluxograma das amostras biológicas de NTNE participantes das análises do HPV

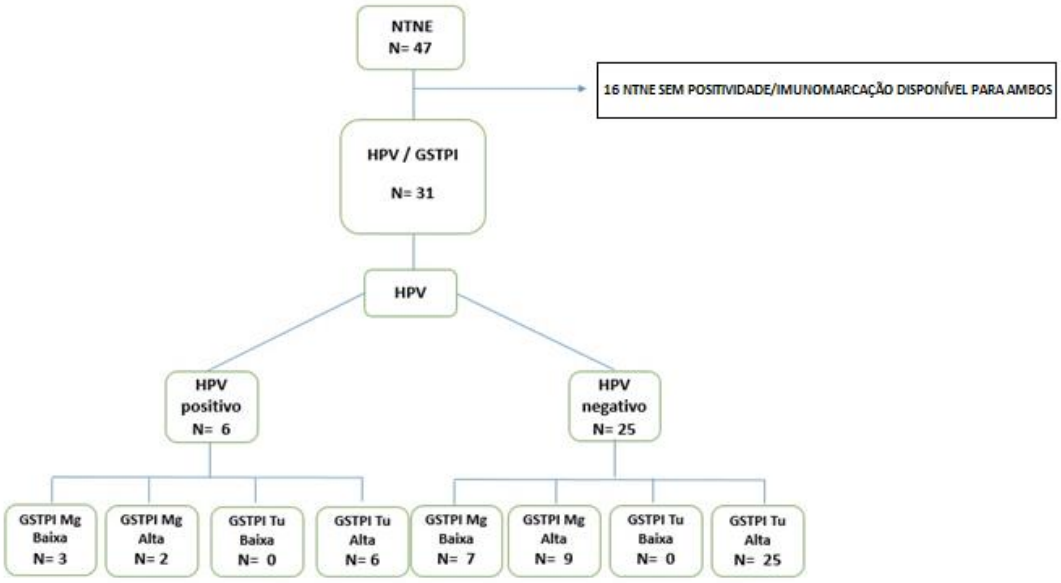

Figura 5: NTNE: não tabagista e não etilista; GSTPI Mg: glutationa S-transferase margem; GSTPI Tu: glutationa S-transferase tumor; HPV: papilomavírus humano.

A **tabela 5** apresenta os resultados da associação entre a marcação de HPV conforme a expressão de GSTPI na margem de pacientes não tabagistas e não etilistas (NTNE). Não há associação entre a marcação de HPV e a expressão de GSTPI na margem de NTNE.

Tabela 5. Análise da associação de HPV conforme a expressão de GSTPI na margem de pacientes NTNE

		GSTPI margem		p¥
Não Tabagista / Não Etilista (NTNE)	**HPV**	**Baixa**	**Alta**	
	negativo	10 (62,5%)	6 (37,5%)	1
	positivo	3 (60%)	2 (40%)	

Tabela 5: ¥*teste exato de Fisher's bicaudal; NTNE: não tabagista e não etilista; GSTPI: glutationa S-transferase; HPV: papilomavírus humano;*

A **tabela 6** apresenta a análise da associação entre a marcação de HPV conforme a expressão de GSTPI no tumor de pacientes não tabagistas e não etilistas (NTNE). Não há associação entre a marcação de HPV e a expressão de GSTPI no tumor de NTNE.

Tabela 6. Análise da associação de HPV conforme a expressão de GSTPI no tumor de pacientes NTNE

		GSTPI tumor		p¥
Não Tabagista / Não Etilista (NTNE)	**HPV**	**Baixa**	**Alta**	
	negativo	1 (4%)	24 (96%)	0,355
	positivo	1 (16,7%)	5 (83,3%)	

Tabela 6: ¥*teste exato de Fisher's bicaudal; NTNE: não tabagista e não etilista; GSTPI: glutationa S-transferase; HPV: papilomavírus humano;*

A **figura 6** apresenta o fluxograma das amostras biológicas utilizadas neste estudo para as análises de HPV de TE. Para este estudo foram selecionadas 34 amostras de pacientes TE.

Figura 6: Fluxograma das amostras biológicas de TE participantes das análises do HPV

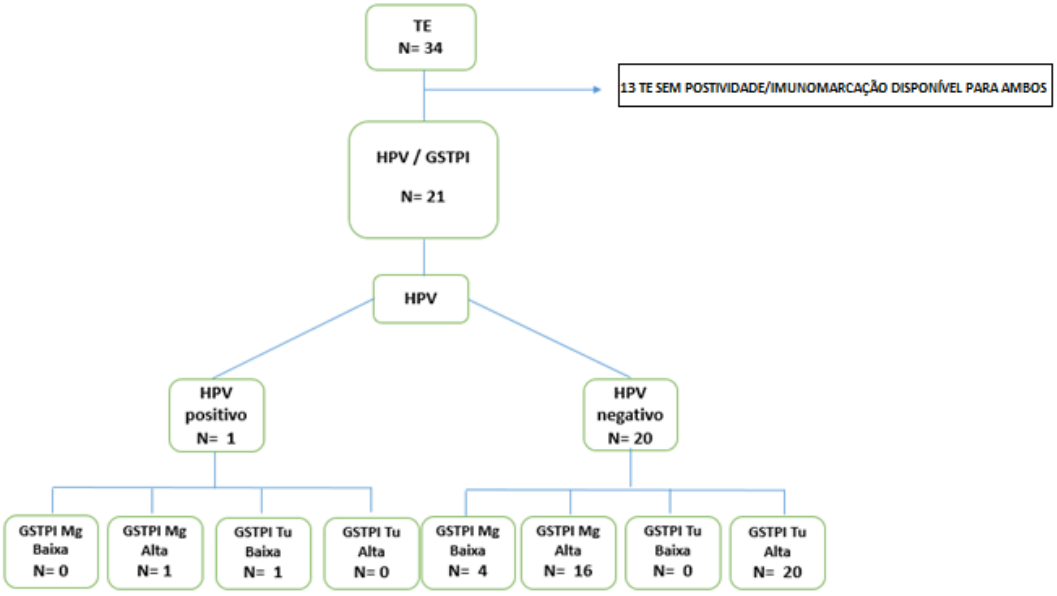

Figura 6: TE: tabagista e etilista; GSTPI Mg: glutationa S-transferase margem; GSTPI Tu: glutationa S-transferase tumor; HPV: papilomavírus humano.

A **tabela 7** apresenta a análise da associação entre a marcação de HPV conforme a expressão de GSTPI na margem de pacientes tabagistas e etilistas (TE). Não há associação entre a marcação de HPV e a expressão de GSTPI na margem de TE.

Tabela 7. Análise da associação de HPV conforme a expressão de GSTPI na margem de pacientes TE

		GSTPI margem		p¥
Tabagista / Etilista (TE)	**HPV**	**Baixa**	**Alta**	1
	negativo	4 (20%)	16 (80%)	
	positivo	0	1 (100%)	

Tabela 7: ¥*teste exato de Fisher's bicaudal; TE: tabagista e etilista; GSTPI: glutationa S-transferase; HPV: papilomavírus humano;*

A **tabela 8** apresenta a análise da associação entre a marcação de HPV conforme a expressão de GSTPI no tumor de pacientes tabagistas e etilistas (TE). Não foi possível realizar a análise devido ao baixo número de casos com HPV positivo no tumor.

Tabela 8. Análise da associação de HPV conforme a expressão de GSTPI no tumor de pacientes TE

		GSTPI tumor		p¥
	HPV	**Baixa**	**Alta**	
Tabagista / Etilista (TE)	**negativo**	0	20 (100%)	
	positivo	1	0	

Tabela 8: ¥*teste exato de Fisher's bicaudal; TE: tabagista e etilista; GSTPI: glutationa S-transferase; HPV: papilomavírus humano;*

Análise de sobrevida de pacientes NTNE com câncer de cabeça e pescoço conforme a expressão de GSTPI em margem e tumor

A **tabela 9** apresenta os resultados das diferenças entre as curvas de sobrevida de NTNE conforme a expressão alta ou baixa da GSTPI na margem e no tumor. Não foram encontradas diferenças significativas entre as curvas de sobrevida conforme a expressão da GSTPI em margem e tumor em pacientes NTNE (Figura 7). Como os dados de imunomarcação para GSTPI em TE foram obtidos apenas para os pacientes selecionados como pares dos NTNE, sua sobrevida não foi analisada, uma vez que os métodos empregados não são adequados para amostras pareadas.

Figura 7: Curvas de sobrevida para GSTPI em pacientes NTNE

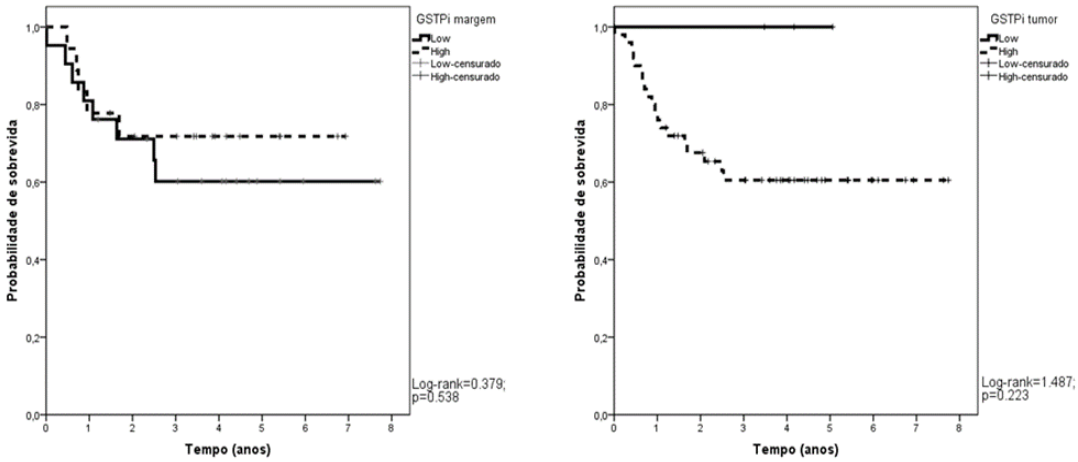

Figura 7: NTNE: não tabagista e não etilista; GSTPI Margem: glutationa S-transferase margem; GSTPI Tumor: glutationa S-transferase tumor.

Tabela 9. Análise de sobrevida em cinco anos dos pacientes não tabagistas/ não etilistas (NTNE) segundo a expressão da GSTPI em margem e tumor

		N	óbitos n (%)	vivos n (%)	Média (EP) Anos	p^1
GSTPI margem	baixa	22	8 (36,4)	14 (63,6)	5,16 (0,72)	0,538
	alta	18	5 (27,8)	13 (72,2)	5,24 (0,64)	
GSTPI tumor	baixa	3	0	3 (100)	4,23 (0,46)	0,223
	alta	51	19 (37,3)	32 (62,7)	3,02 (0,30)	

Tabela 9: EP: erro padrão. [1] teste Log-rank para comparação de curvas de sobrevida; NTNE: não tabagista e não etilista; GSTPI: glutationa S-transferase;

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que a expressão da GSTPI ocorre tanto no tumor como na margem do mesmo. Porém, a margem de CECP apresenta expressão aumentada nos pacientes com o hábito tabágico e etílico. Estes dados reforçam o papel de detoxificação desta enzima no CECP e, principalmente, como um biomarcador diferencial de carcinógenos em área não neoplásica.

A partir de uma amostra de mais de 1600 pacientes, foram obtidos 80 pacientes NTNE. Isso ilustra o desafio de se estudar pacientes NTNE com CECP, o que é corroborado pela escassez de estudos com esse perfil de pacientes na literatura.

Sendo uma enzima de detoxificação de carcinógenos, estudar seu papel em uma amostra que não apresenta exposição a carcinógenos provenientes do tabaco e do álcool (NTNE) nos permite analisar o papel da GSTPI em CECP, sem a interferência destes hábitos, tão frequentes nesses pacientes (Mcwilliams *et al.*, 2000; Hashibe *et al.*, 2007).

Para este estudo, pareamos os pacientes NTNE aos correspondentes TE por critérios demográficos, local, tipo e diferenciação tumoral, a fim de tornar a amostra mais comparável. Assim, foi possível a formação de 47 pares de pacientes NTNE e TE, conforme sexo, idade (+/-5anos), sítio tumoral, estadiamento TNM, grau de diferenciação tumoral e variantes morfológicas.

Apesar do pareamento resultar em redução da nossa amostra já limitada de pacientes NTNE, o mesmo foi importante para analisar a expressão de GSTPI sem a interferência desses possíveis fatores de confusão.

Neste estudo, analisamos a expressão de forma relativa e não absoluta. Isto é, observamos maior expressão de GSTPI em TE em comparação a NTNE. Não houve diferença entre a expressão de GSTPI no tumor conforme os hábitos tabágico e etílico. Porém, na margem houve maior expressão do biomarcador em pacientes TE. A partir disso são possíveis ao menos duas interpretações, não excludentes entre si. Primeiramente, de que existe aumento da atividade enzimática na margem de tumor induzida pelo tabagismo e/ou etilismo para detoxicação, corroborando com trabalhos que demonstram a habilidade da GSTPI em eliminar carcinógenos (Terrier *et al.*, 1990; Califano *et al.*, 1996;

Townsend e Tew, 2003). Em contrapartida, em pacientes NTNE podemos interpretar que a baixa expressão deve-se não a diminuição da atividade detoxificadora da enzima, mas aos erros de sua capacidade de detoxificação. Esse poderia ser um mecanismo responsável pelo desenvolvimento de tumores nessa população, que não foi exposta ao tabaco e ao álcool de forma direta, porém pode ter sido exposta a outros carcinógenos desconhecidos. Para melhor esclarecer esses processos, precisaríamos analisar polimorfismos genéticos e alterações na atividade enzimática de ambos os grupos, bem como em pacientes sem câncer. De fato, a glutationa S-transferase pi (GSTPI) é uma importante enzima que detoxifica metabólitos relacionados ao tabaco, sendo a mais abundante glutationa S-transferase (GST) expressa no CECP (Mulder *et al.*, 1995). A relevância do tabaco e do álcool na etiologia da doença está evidentemente constatada (Argiris *et al.*, 2008), entretanto, a relação entre a expressão de GSTPI, a carcinogênese e esses hábitos permanece controversa (Mcwilliams *et al.*, 2000; Olshan *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013).

No tumor, foi elevada a expressão da GSTPI em ambos os grupos. Estes dados sugerem que, após a transformação neoplásica do tecido, a expressão de GSTPI não depende exclusivamente do habito tabágico e etílico, mas possivelmente de outros fatores da carcinogênese que possam ser responsáveis pelo aumento da expressão. Estes dados são compatíveis com estudos prévios, que demonstram a presença de GSTPI em diferentes tecidos neoplásicos, inclusive em tumores de CECP (Sarkar *et al.*, 1997a; Bentz *et al.*, 2000).

Polimorfismos no gene da GSTPI foram associados à redução na capacidade de detoxificar carcinógenos, contribuindo para o envolvimento da GSTPI em resposta à exposição a essas substâncias tóxicas (Ali-Osman *et al.*, 1997; Olshan *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2008; Vasieva, 2011). Ademais, (Chen e Lin, 1995; Bentz *et al.*, 2000) estão em consonância com nossos dados para elevada expressão de GSTPI no tumor, bem como sua relação com o grau de diferenciação tumoral, quando observaram expressão progressivamente maior em amostras de mucosa normal, displasia e tumor. Outros estudos descreveram que as GSTPI são expressas em tecido normal do trato digestório, urinário e respiratório, o que sustenta seu papel na eliminação de substâncias tóxicas mesmo em tecido não tumoral. Alterações

histológicas de transição pré-neoplásica entre margem e tumor não foram evidenciadas no nosso estudo (Terrier *et al.*, 1990; Geisler *et al.*, 2005; Henderson *et al.*, 2014).

Entretanto, acreditamos que nossas amostras possam apresentar alterações moleculares importantes relacionadas a carcinogênese mesmo que não evidenciadas nas análises histológicas, como hipotetizado inicialmente pelo conceito de cancerização de campo (Slaughter *et al.*, 1953) e confirmado pelos estudos de (Califano *et al.*, 1996).

Analisamos a associação da positividade para o HPV em amostras pareadas de NTNE e TE. Entretanto, a positividade para o HPV não foi diferente conforme os hábitos tabágicos e etílicos dos pacientes. Vários fatores podem ter corroborado para esses achados. Estudos recentes mostram que apesar do consumo de tabaco e álcool serem fatores de risco para CECP, em torno de 10 a 20% dos pacientes que desenvolveram CECP, não apresentavam esses hábitos (Bertolus *et al.*, 2012). Os dados de HPV precisam ser considerados com cautela, uma vez que nossa amostra de pacientes NTNE é peculiar, com um grande número de mulheres idosas que não representa o perfil da maioria de pacientes que apresentam CECP associados ao HPV (Morbini e Benazzo, 2016). Outro fator limitante é que pacientes HPV positivo são acometidos frequentemente, por doença na região da orofaringe, subsítio que geralmente apresenta bons resultados oncológicos com tratamento radioterápico e quimioterápico (Chaturvedi *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2017). Os pacientes incluídos no projeto GENCAPO são recrutados em serviços de cirurgia de cabeça e pescoço e não de oncologia clínica, limitando assim o recrutamento de pacientes com tumores relacionados ao HPV neste trabalho. Adicionalmente, a prevalência do CECP relacionados ao HPV é menor no Brasil que em países desenvolvidos, especialmente entre classes socioeconômicas menos favorecidas (Chaturvedi *et al.*, 2013). Nossa amostra é composta de pacientes que estão sendo tratados no Sistema Único de Saúde (SUS), com frequência menos favorecidos socioeconomicamente. Isso pode limitar o quanto nossos resultados são generalizáveis para populações com perfil social diferente.

As GSTs estão envolvidas no metabolismo de diferentes fármacos (Black *et al.*, 1990) e sugere-se que o aumento da expressão destas enzimas pode ser

responsável, em parte, na resistência quimioterápica observada em diversos tumores (Tsuchida e Sato, 1992; Cabelguenne *et al.*, 2001; Cullen *et al.*, 2003; Geisler *et al.*, 2005; Lopes-Aguiar *et al.*, 2015). Em contrapartida, o silenciamento do gene GSTPI, aumenta a sensibilidade do tumor às drogas antineoplásicas, sugerindo-se assim, que a baixa expressão da GSTPI pode estar associada à melhor resposta terapêutica e à maior sobrevida (Shiga *et al.*, 1999; Depeille *et al.*, 2005). Desse modo, este marcador poderia ser útil na escolha terapêutica para estes pacientes. Com este intuito, avaliamos a sobrevida e a expressão de GSTPI.

Optamos por estudar a sobrevida somente no grupo NTNE e sua associação com a expressão de GSTPI a fim de identificar a relação com o prognóstico da doença, sem os prováveis efeitos do álcool e ao tabaco, tanto na sobrevida como na expressão de GSTPI. Este dado é raramente encontrado na literatura, visto que os pacientes portadores desta doença frequentemente apresentam esses hábitos (Hashibe *et al.*, 2007) e resultados prévios não costumam ajustar as análises de associação do GSTPI e mortalidade pelos hábitos. Não foi possível verificar diferenças na sobrevida conforme a expressão do GSTPI porque nenhum paciente com expressão tumoral baixa faleceu durante o período de observação, inviabilizando interpretações estatísticas a respeito. Estudos recentes demostraram menor sobrevida para CECP quando o paciente apresenta elevada presença de GSTPI (Schumaker *et al.*, 2008). Porém, diferentemente do nosso estudo, os autores não avaliaram os efeitos de forma independente destes hábitos. Uma vez que a expressão de GSTPI altera-se conforme a exposição ao fumo e ao álcool, é possível que isso ocorra de forma proporcional à intensidade do hábito. Sendo a intensidade do hábito um preditor de sobrevida da população em geral, a análise de sobrevida conforme a marcação de GSTPI em tabagistas e etilistas estaria sujeita a este fator de confusão importante. Ou seja, o GSTPI seria apenas um marcador de hábitos e não de fato, um marcador de sobrevida. Por esse motivo, a análise de sobrevida em NTNE é tão relevante. Além disso, nossa amostra de TE não foi utilizada na análise de sobrevida, pois não se trata de uma amostra aleatorizada da população total de TE, uma vez que foi pareada com os pacientes NTNE, tornando quaisquer resultados encontrados desprovidos de validade externa.

Algumas limitações do nosso estudo referem-se ao número de NTNE passíveis de seleção dentre uma amostra de 1633 pacientes pertencentes ao projeto. Pacientes NTNE eram frequentemente mulheres muito jovens ou muito idosas, perfil pouco observado entre os 1374 pacientes TE do projeto GENCAPO. Outra limitação foi em relação à obtenção de amostras tumorais e, em especial, margens. Dos 47 pares resultantes do pareamento, pudemos constituir apenas 30 pares para biomarcação de GSTPI em tumor e 16 pares biomarcação em margem, dada a dificuldade em conseguir amostras tumorais parafinadas. Além disso, não era escopo do nosso estudo analisar polimorfismos genéticos devido à maior complexidade exigida para tal fim, porém essas análises poderiam contribuir para nossas conclusões. Por fim, nosso estudo tem desenho transversal, o que permite apenas interpretações de associação, mas não de causalidade.

Os dados obtidos neste trabalho podem ser interpretados considerando três cenários conforme o hábito tabágico e etílico dos pacientes com CECP, se pudéssemos comparar a pacientes sem câncer. No primeiro cenário, devido aos hábitos, a expressão de GSTPI em TE pode estar aumentada em relação ao NTNE, que por sua vez teriam expressão em mucosa semelhante a pacientes sem câncer. No segundo cenário, a expressão da GSTPI em NTNE pode estar diminuída se comparada a expressão da GSTPI em pacientes sem câncer, devido a uma falha no processo de detoxificação e contribuindo assim para a carcinogênese neste grupo exposto a outros carcinógenos ambientais. No terceiro cenário a expressão da GSTPI pode estar aumentada no TE e diminuída no NTNE, contribuindo assim para o mecanismo de carcinogênese em pacientes acometidos por essa neoplasia (Figura 8).

Figura 8: Possíveis cenários para os resultados encontrados

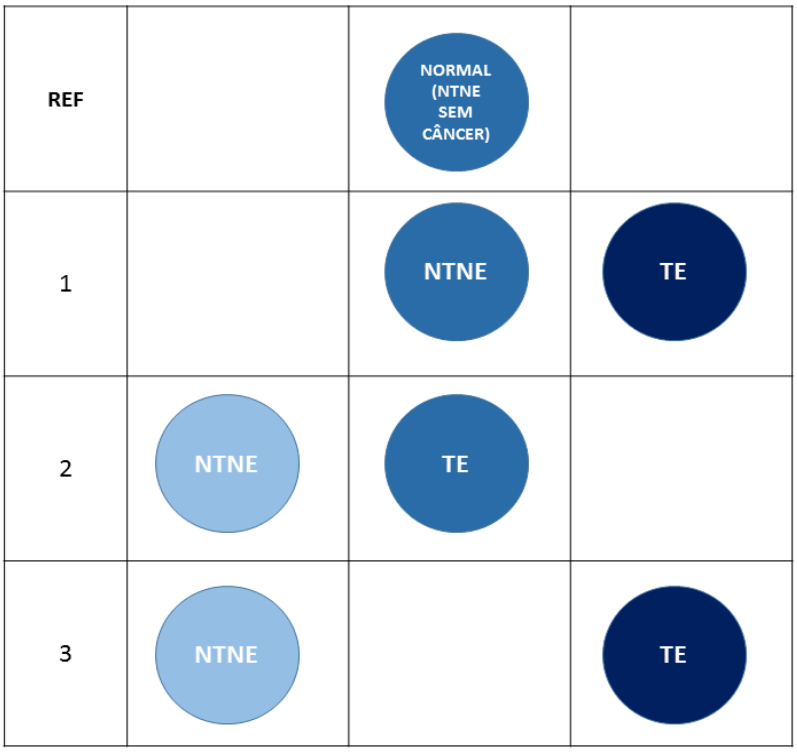

Figura 8: Intensidade das cores refletindo expressão da GSTPI. (NTNE: não tabagista e não etilista; TE: tabagista e etilista).

Dessa maneira, os resultados permitem mostrar que a expressão de GSTPI em amostras tumorais de CECP ocorre de forma independente do hábito de fumar e beber. Permitiram também identificar presença de GSTPI em tecido não neoplásico peritumoral histologicamente normal, e de forma diferencial conforme o hábito, ressaltando a importância de se analisar não somente a expressão desta enzima no tumor, mas principalmente na região peritumoral, e conforme a presença desses hábitos, o que não é usualmente feito. As análises da expressão da GSTPI em tecido tumoral e particularmente em tecido peritumoral de CECP, aliados a pesquisas moleculares e celulares futuras poderão complementar a compreensão do real papel fisiopatológico da GSTPI como fator modulador de carcinogênese e para planejamento terapêutico nos tumores de cabeça e pescoço. Assim em nosso estudo demostramos que a GSTPI apresenta expressão nos tumores independente do hábito, desta forma a exposição a estes carcinógenos não é o mecanismo responsável pela sua expressão no tumor. Ademais a expressão diferencial na margem conforme o

hábito, sendo maior em TE, sugere que neste grupo há um aumento da expressão pela exposição aos carcinógenos do tabaco e do álcool. Alternativa ou adicionalmente, a menor expressão em NTNE possa ser devido a uma falha no processo de detoxificação que poderia contribuir para carcinogênese, uma vez que podem estar expostas a outros carcinógenos ambientais.

Outro dado relevante é que a GSTPI possa ser mais um marcador de exposição ao tabagismo e etilismo, do que de fato marcador de sobrevida de forma independente do hábito. Uma vez que demonstramos que existe marcação diferencial em margens conforme a exposição aos carcinógenos do tabaco e do álcool.

Deste modo, o uso deste marcador de prognóstico para CECP deve ser interpretado considerando o impacto na sobrevida destes hábitos, tão presentes em pacientes acometidos por essa neoplasia.

7. CONCLUSÃO

Os nossos dados permitem concluir que:

- A expressão da GSTPI está presente tanto em amostras tumorais como em margem de tumor;
- A expressão da GSTPI foi independente do hábito tabágico e etílico;
- A expressão da margem foi dependente do hábito dos pacientes portadores desta neoplasia, sendo mais intensa em pacientes tabagistas e etilistas;
- Não houve associação de presença de GSTPI e a HPV na margem e no tumor de pacientes com CECP;
- A análise de sobrevida foi inconclusiva por não ocorrer óbitos no grupo com baixa expressão de GSTPI no tumor durante o período de estudo.

8. ANEXO

São Paulo, 10 de novembro de 2015.

À

Comissão Científica do Hospital das Clínicas da FMUSP

Ref.: Emenda de Inclusão de pesquisadoras em Subprojeto de Projeto Temático CAPPesq 0511/07 "BUSCA DE MARCADORES DE AGRESSIVIDADE EM TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO".

Venho solicitar a inclusão dos pesquisadores: Pâmela de Oliveira Soares (http://lattes.cnpq.br/1334579448993270) (matrícula nº 6706363) e Maria Lúcia Bueno Garcia (http://lattes.cnpq.br/5247556656251852) no subprojeto intitulado **"Avaliação de marcadores histopatológicos dos tumores de cabeça e pescoço" do projeto Temático GENCAPO "BUSCA DE MARCADORES DE AGRESSIVIDADE EM TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO" CAPPesq 0511/07.**

As pesquisadoras Pamela Oliveira Soares e Profa Maria Lucia Bueno Garcia farão o estudo sob o título "Expressão de Glutationa S Transferase Pi em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço conforme os hábitos tabágico e etílico" deste subprojeto.

Muito obrigada,

Atenciosamente

Prof. Raquel Ajub Moyses

Pesquisador Responsável

Dra. Raquel Ajub Moyses
Cirurgia de Cabeça e Pescoço
CRM 104394

Coordenadora do SubProjeto **"Avaliação de marcadores histopatológicos dos tumores de cabeça e pescoço".**

De acordo:

Pamela Oliveira Soares

Aluna de PG

Maria Lucia Bueno Garcia

Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Dra. Maria Lúcia Bueno Garcia
CRM-SP 34.305

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 - Cerqueira César - São Paulo - SP- CEP: 05403-900 – 8º andar sala 8174
Fone: (11) 2661-7506

Recebido por: _____
Data: 11/11/15
Diretoria Clínica do HCFMUSP

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0511/07
Título: BUSCA DE MARCADORES DE AGRESSIVIDADE EM TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO
Pesquisador Responsável: Raquel Ajub Moyses
Pesquisador Executante: Raquel Ajub Moyses
Disciplina: Cirurgia de Cabeça e Pescoço
Departamento: CIRURGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 18/11/2015, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta recebida em 09/11/2015 - Solicitação de cancelamento do sub estudo intitulado Papel da inflamação na resposta à terapia anti-tumoral: Preditores pscológicos e fisiológicos de desfecho - Inter relações de câncer, depressão e estresse.
•Carta datada de 10/11/2015 - Solicitação de inclusão dos pesquisadores Pâmela de Oliveira Soares e Maria Lúcia Bueno Garcia no subprojeto intitulado "Avaliação de marcadores de Agressividade em Tumores de cabeça e Pescoço".

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)**apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

CAPPesq, 18 de Novembro de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

REFERÊNCIASPrimary Sources

Secondary Sources

Uncategorized References

AHRENS, W. et al. Oral health, dental care and mouthwash associated with upper aerodigestive tract cancer risk in Europe: the ARCAGE study. **Oral Oncol,** v. 50, n. 6, p. 616-25, Jun 2014. ISSN 1368-8375.

ALI-OSMAN, F. et al. Molecular cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. **J Biol Chem,** v. 272, n. 15, p. 10004-12, Apr 11 1997. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

AMÂNCIO, A. P. et al. Análise da susceptibilidade alélica do gene gstp1 em pacientes com carcinoma espinocelular de laringe. **Monografia. Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, GO. 44p**, 2010.

ANDRIDGE, R. R.; LITTLE, R. J. A Review of Hot Deck Imputation for Survey Non-response. **Int Stat Rev,** v. 78, n. 1, p. 40-64, Apr 2010. ISSN 0306-7734 (Print)

0306-7734.

ARGIRIS, A.; ENG, C. Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer. **Cancer Treat Res,** v. 114, p. 15-60, 2003. ISSN 0927-3042 (Print)

0927-3042.

ARGIRIS, A. et al. Head and neck cancer. **Lancet,** v. 371, n. 9625, p. 1695-709, May 17 2008. ISSN 0140-6736.

BENTZ, B. G.; HAINES, G. K., 3RD; RADOSEVICH, J. A. Glutathione S-transferase pi in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Laryngoscope,** v. 110, n. 10 Pt 1, p. 1642-7, Oct 2000. ISSN 0023-852X (Print)

0023-852x.

BERTOLUS, C. et al. Clinical relevance of systematic human papillomavirus (HPV) diagnosis in oral squamous cell carcinoma. **Infect Agent Cancer,** v. 7, n. 1, p. 13, May 30 2012. ISSN 1750-9378.

BLACK, S. M. et al. Expression of human glutathione S-transferases in Saccharomyces cerevisiae confers resistance to the anticancer drugs adriamycin and chlorambucil. **Biochem J,** v. 268, n. 2, p. 309-15, Jun 01 1990. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021.

BOARD, P. et al. Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. **Pharmacol Ther,** v. 48, n. 3, p. 357-69, 1990. ISSN 0163-7258 (Print)

0163-7258.

CABELGUENNE, A. et al. Glutathione-associated enzymes in head and neck squamous cell carcinoma and response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. **Int J Cancer,** v. 93, n. 5, p. 725-30, Sep 01 2001. ISSN 0020-7136 (Print)

0020-7136.

CALIFANO, J. et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer Res,** v. 56, n. 11, p. 2488-92, Jun 01 1996. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472.

CHATURVEDI, A. K. et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. **J Clin Oncol,** v. 31, n. 36, p. 4550-9, Dec 20 2013. ISSN 0732-183x.

CHEN, Y. K.; LIN, L. M. Immunohistochemical demonstration of epithelial glutathione S-transferase isoenzymes in normal, benign, premalignant and malignant human oral mucosa. **J Oral Pathol Med,** v. 24, n. 7, p. 316-21, Aug 1995. ISSN 0904-2512 (Print)

0904-2512.

CHO, C. G. et al. Association of the GSTP1 and NQO1 polymorphisms and head and neck squamous cell carcinoma risk. **J Korean Med Sci,** v. 21, n. 6, p. 1075-9, Dec 2006. ISSN 1011-8934 (Print)

1011-8934.

CHOONG, N.; VOKES, E. Expanding role of the medical oncologist in the management of head and neck cancer. **CA Cancer J Clin,** v. 58, n. 1, p. 32-53, Jan-Feb 2008. ISSN 0007-9235 (Print)

0007-9235.

CHUNG, C. H.; BAGHERI, A.; D'SOUZA, G. Epidemiology of oral human papillomavirus infection. **Oral Oncol,** v. 50, n. 5, p. 364-9, May 2014. ISSN 1368-8375.

COLOMBO, J.; RAHAL, P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. **Rev Bras Cancerol,** v. 55, n. 2, p. 165-74, 2009.

CULLEN, K. J. et al. Glutathione S-transferase pi amplification is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and primary tumors. **Cancer Res,** v. 63, n. 23, p. 8097-102, Dec 01 2003. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472.

DAVIDSON, M. A.; SHANKS, E. J. 3q26-29 Amplification in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Review of Established and Prospective Oncogenes. **Febs j**, Mar 19 2017. ISSN 1742-464x.

DEPEILLE, P. et al. Combined effects of GSTP1 and MRP1 in melanoma drug resistance. **Br J Cancer,** v. 93, n. 2, p. 216-23, Jul 25 2005. ISSN 0007-0920 (Print)

0007-0920.

DOBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer Metastasis Rev,** v. 24, n. 1, p. 9-17, Jan 2005. ISSN 0167-7659 (Print)

0167-7659.

DOS SANTOS, R. A. et al. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer no trato aerodigestivo superior: relevância dos fatores de risco álcool e tabaco. **Revista Brasileira de Cancerologia,** v. 58, n. 1, p. 21-29, 2012.

FUNG, C.; GRANDIS, J. R. Emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck. **Expert Opin Emerg Drugs,** v. 15, n. 3, p. 355-73, Sep 2010. ISSN 1472-8214.

GALBIATTI, A. L. S. et al. Câncer de cabeça e pescoço: causas, prevenção e tratamento. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology,** v. 79, p. 239-247, 2013. ISSN 1808-8694. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-86942013000200018&nrm=iso >.

GATTAS, G. J.; SOARES-VIEIRA, J. A. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. **Occup Med (Lond),** v. 50, n. 7, p. 508-11, Sep 2000. ISSN 0962-7480 (Print)

0962-7480.

GEISLER, S. A. et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and survival from head and neck cancer. **Head Neck,** v. 27, n. 3, p. 232-42, Mar 2005. ISSN 1043-3074 (Print)

1043-3074.

GSUR, A. et al. Polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (GSTP1, GSTM1 and GSTT1) and prostate-cancer risk. **Int J Cancer,** v. 95, n. 3, p. 152-5, May 20 2001. ISSN 0020-7136 (Print)

0020-7136.

HASHIBE, M. et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **J Natl Cancer Inst,** v. 99, n. 10, p. 777-89, May 16 2007. ISSN 0027-8874.

HASHIBE, M. 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,** v. 18, n. 2, p. 541-50, Feb 2009. ISSN 1055-9965 (Print)

1055-9965.

HATAGIMA, A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. **Cadernos de Saúde Pública,** v. 18, p. 357-377, 2002. ISSN 0102-311X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2002000200002&nrm=iso >.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol,** v. 45, p. 51-88, 2005. ISSN 0362-1642 (Print)

0362-1642.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Crit Rev Biochem Mol Biol,** v. 30, n. 6, p. 445-600, 1995. ISSN 1040-9238 (Print)

1040-9238.

HE, P. et al. Associations Among Glutathione S-Transferase T1, M1, and P1 Polymorphisms and the Risk of Oral Leukoplakia. **Genet Test Mol Biomarkers,** v. 20, n. 6, p. 312-21, Jun 2016. ISSN 1945-0257.

HECHT, S. S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. **Nat Rev Cancer,** v. 3, n. 10, p. 733-44, Oct 2003. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175x.

HENDERSON, C. J.; MCLAREN, A. W.; WOLF, C. R. In vivo regulation of human glutathione transferase GSTP by chemopreventive agents. **Cancer Res,** v. 74, n. 16, p. 4378-87, Aug 15 2014. ISSN 0008-5472.

INCA, M. D. S.-. Estimativa 2012-2014: Incidência de Câncer no Brasil. **INCA**, 2012. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2 >. Acesso em: Citado em 2016 ABR 24.

_____. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. **INCA**, 2015. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2 >. Acesso em: Citado em 2017 MAR 28.

_____. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. **INCA**, 2016. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2 >. Acesso em: Citado em 2017 MAR 28.

KIMURA, S. et al. The relationship of the human glutathione S-transferase P1 polymorphism and chemotherapeutic sensitivity in head and neck squamous carcinoma. **Int J Mol Med,** v. 14, n. 2, p. 185-9, Aug 2004. ISSN 1107-3756 (Print)

1107-3756.

KOCH, W. M. et al. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. **Laryngoscope,** v. 109, n. 10, p. 1544-51, Oct 1999. ISSN 0023-852X (Print)

0023-852x.

LACKO, M. et al. Genetic polymorphisms of smoking-related carcinogen detoxifying enzymes and head and neck cancer susceptibility. **Anticancer Res,** v. 29, n. 2, p. 753-61, Feb 2009. ISSN 0250-7005 (Print)

0250-7005.

LANG, J. et al. Association of GSTP1 Ile105Val polymorphism and risk of head and neck cancers: a meta-analysis of 28 case-control studies. **PLoS One,** v. 7, n. 11, p. e48132, 2012. ISSN 1932-6203.

LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer,** v. 11, n. 1, p. 9-22, Jan 2011. ISSN 1474-175x.

LI, W.; CHEN, J.; LIU, C. Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism and oral cancer risk: a meta-analysis. **Int J Med Sci,** v. 10, n. 4, p. 392-8, 2013. ISSN 1449-1907.

LIMA, M. A. G. D.; BARBOSA, L. N. F.; SOUGEY, E. B. Avaliação do impacto na qualidade de vida em pacientes com câncer de laringe. **Revista da SBPH,** v. 14, n. 1, p. 18-40, 2011. ISSN 1516-0858.

LINGEN, M.; STURGIS, E. M.; KIES, M. S. Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers: clinical and biologic characteristics and implications for management. **Curr Opin Oncol,** v. 13, n. 3, p. 176-82, May 2001. ISSN 1040-8746 (Print)

1040-8746.

LOPES-AGUIAR, L. et al. Do genetic polymorphisms modulate response rate and toxicity of Cisplatin associated with radiotherapy in laryngeal squamous cell carcinoma?: a case report. **Medicine (Baltimore),** v. 94, n. 16, p. e578, Apr 2015. ISSN 0025-7974.

LUBIN, J. H. et al. Total exposure and exposure rate effects for alcohol and smoking and risk of head and neck cancer: a pooled analysis of case-control studies. **Am J Epidemiol,** v. 170, n. 8, p. 937-47, Oct 15 2009. ISSN 0002-9262.

MASOOD, N.; MALIK, F. A.; KAYANI, M. A. Expression of xenobiotic metabolizing genes in head and neck cancer tissues. **Asian Pac J Cancer Prev,** v. 12, n. 2, p. 377-82, 2011. ISSN 1513-7368.

MCILWAIN, C. C.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. **Oncogene,** v. 25, n. 11, p. 1639-1648, 2006 2006. ISSN 0950-9232. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209373 >.

MCWILLIAMS, J. E. et al. Genetic polymorphisms in head and neck cancer risk. **Head Neck,** v. 22, n. 6, p. 609-17, Sep 2000. ISSN 1043-3074 (Print)

1043-3074.

MORBINI, P.; BENAZZO, M. Human papillomavirus and head and neck carcinomas: focus on evidence in the babel of published data. **Acta Otorhinolaryngol Ital,** v. 36, n. 4, p. 249-258, Aug 2016. ISSN 0392-100x.

MOYSÉS, R. A. **Análise clínica e molecular de pacientes não tabagistas e não etilistas com carcinoma epidermóide**. 2011. Universidade de São Paulo

MOYSES, R. A. et al. Significant differences in demographic, clinical, and pathological features in relation to smoking and alcohol consumption among 1,633 head and neck cancer patients. **Clinics (Sao Paulo),** v. 68, n. 6, p. 738-44, Jun 2013. ISSN 1807-5932.

MULDER, T. P. et al. Glutathione S-transferases and glutathione in human head and neck cancer. **Carcinogenesis,** v. 16, n. 3, p. 619-24, Mar 1995. ISSN 0143-3334 (Print)

0143-3334.

NISHIMURA, T. et al. Immunohistochemical staining for glutathione S-transferase predicts response to platinum-based chemotherapy in head and neck cancer. **Clin Cancer Res,** v. 2, n. 11, p. 1859-65, Nov 1996. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432.

OLSHAN, A. F. et al. GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,** v. 9, n. 2, p. 185-91, Feb 2000. ISSN 1055-9965 (Print)

1055-9965.

PARK, D. J.; LENZ, H. J. Determinants of chemosensitivity in gastric cancer. **Curr Opin Pharmacol,** v. 6, n. 4, p. 337-44, Aug 2006. ISSN 1471-4892 (Print)

1471-4892.

PEREZ, C. A. et al. High-dose versus weekly cisplatin definitive chemoradiotherapy for HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncol,** v. 67, p. 24-28, Apr 2017. ISSN 1368-8375.

PETERS, E. S. et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and the synergy of alcohol and tobacco in oral, pharyngeal, and laryngeal carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,** v. 15, n. 11, p. 2196-202, Nov 2006. ISSN 1055-9965 (Print)

1055-9965.

RUWALI, M. et al. Polymorphism in cytochrome P450 2A6 and glutathione S-transferase P1 modifies head and neck cancer risk and treatment outcome. **Mutat Res,** v. 669, n. 1-2, p. 36-41, Oct 02 2009. ISSN 0027-5107 (Print)

0027-5107.

RUZZA, P. et al. Glutathione transferases as targets for cancer therapy. **Anticancer Agents Med Chem,** v. 9, n. 7, p. 763-77, Sep 2009. ISSN 1871-5206.

SARKAR, G. et al. Glutathione S-transferase pi expression in matched human normal and malignant oral mucosa. **Oral Oncol,** v. 33, n. 2, p. 74-81, Mar 1997a. ISSN 1368-8375 (Print)

1368-8375.

_____. Glutathione S-transferase π expression in matched human normal and malignant oral mucosa. **Oral Oncology,** v. 33, n. 2, p. 74-81, 1997/03/01 1997b. ISSN 1368-8375. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964195596000607 >.

SCHUMAKER, L. et al. Elevated expression of glutathione S-transferase pi and p53 confers poor prognosis in head and neck cancer patients treated with chemoradiotherapy but not radiotherapy alone. **Clin Cancer Res,** v. 14, n. 18, p. 5877-83, Sep 15 2008. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432.

SHIBOSKI, C. H.; SCHMIDT, B. L.; JORDAN, R. C. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. **Cancer,** v. 103, n. 9, p. 1843-9, May 01 2005. ISSN 0008-543X (Print)

0008-543x.

SHIELD, K. D.; PARRY, C.; REHM, J. Chronic diseases and conditions related to alcohol use. **Alcohol Res,** v. 35, n. 2, p. 155-73, 2013. ISSN 2168-3492 (Print)

2168-3492.

SHIGA, H. et al. Prognostic value of p53, glutathione S-transferase pi, and thymidylate synthase for neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in head and neck cancer. **Clin Cancer Res,** v. 5, n. 12, p. 4097-104, Dec 1999. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432.

SINGH, M. et al. Association of genetic polymorphisms in glutathione S-transferases and susceptibility to head and neck cancer. **Mutat Res,** v. 638, n. 1-2, p. 184-94, Feb 01 2008. ISSN 0027-5107 (Print)

0027-5107.

SLAUGHTER, D. P.; SOUTHWICK, H. W.; SMEJKAL, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. **Cancer,** v. 6, n. 5, p. 963-8, Sep 1953. ISSN 0008-543X (Print)

0008-543x.

STRANGE, R. C.; FRYER, A. A. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. **IARC Sci Publ**, n. 148, p. 231-49, 1999. ISSN 0300-5038 (Print)

0300-5038.

SYRJANEN, S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. **J Clin Virol,** v. 32 Suppl 1, p. S59-66, Mar 2005. ISSN 1386-6532 (Print)

1386-6532.

TERRIER, P. et al. An immunohistochemical study of pi class glutathione S-transferase expression in normal human tissue. **Am J Pathol,** v. 137, n. 4, p. 845-53, Oct 1990. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440.

TEW, K. D.; RONAI, Z. GST function in drug and stress response. **Drug Resist Updat,** v. 2, n. 3, p. 143-147, Jun 1999. ISSN 1368-7646.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene,** v. 22, n. 47, p. 7369-75, Oct 20 2003. ISSN 0950-9232 (Print)

0950-9232.

TREMBLAY, S. et al. Young patients with oral squamous cell carcinoma: study of the involvement of GSTP1 and deregulation of the Fanconi anemia genes. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg,** v. 132, n. 9, p. 958-66, Sep 2006. ISSN 0886-4470 (Print)

0886-4470.

TSUCHIDA, S.; SATO, K. Glutathione transferases and cancer. **Crit Rev Biochem Mol Biol,** v. 27, n. 4-5, p. 337-84, 1992. ISSN 1040-9238 (Print)

1040-9238.

VASIEVA, O. The many faces of glutathione transferase pi. **Curr Mol Med,** v. 11, n. 2, p. 129-39, Mar 2011. ISSN 1566-5240.

VICKERY, L. E. et al. The impact of head and neck cancer and facial disfigurement on the quality of life of patients and their partners. **Head Neck,** v. 25, n. 4, p. 289-96, Apr 2003. ISSN 1043-3074 (Print)

1043-3074.

WANG, Y. et al. Association between glutathione S-transferase p1 polymorphisms and lung cancer risk in Caucasians: a case-control study. **Lung Cancer,** v. 40, n. 1, p. 25-32, Apr 2003. ISSN 0169-5002 (Print)

0169-5002.

WISEMAN, S. M. et al. Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers and nondrinkers: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcomes. **Ann Surg Oncol,** v. 10, n. 5, p. 551-7, Jun 2003. ISSN 1068-9265 (Print)

1068-9265.

XU, C.; LI, C. Y.; KONG, A. N. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. **Arch Pharm Res,** v. 28, n. 3, p. 249-68, Mar 2005. ISSN 0253-6269 (Print)

0253-6269.

YOKOYAMA, A.; OMORI, T. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and risk for esophageal and head and neck cancers. **Alcohol,** v. 35, n. 3, p. 175-85, Apr 2005. ISSN 0741-8329 (Print)

0741-8329.

ZIMNIAK, P. et al. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. **Eur J Biochem,** v. 224, n. 3, p. 893-9, Sep 15 1994. ISSN 0014-2956 (Print)

0014-2956.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA CASOS E CONTROLES TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA OS CASOS

INTRODUÇÃO

O(A) Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo para investigar fatores ambientais e seus efeitos sobre a saúde das pessoas. O estudo está sendo conduzido pelo [*Nome do Local, Centro Colaborador*]. Seu médico nos forneceu seu nome e nos concedeu autorização para convidá-lo a participar deste estudo. Sua participação neste estudo é voluntária. O(A) Sr.(a) pode se recusar a participar ou retirar-se do estudo a qualquer momento, sem que isso afete de forma alguma o tratamento médico que o(a) Sr.(a) está recebendo. Por favor, leia cuidadosamente este formulário de consentimento e esclareça com o coordenador da pesquisa no hospital quaisquer dúvidas que você possa ter sobre o estudo antes de assinar este termo.

EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se você concordar em participar deste estudo, será solicitado que o(a) Sr.(a) participe de uma entrevista e forneça amostras de sangue e de tecido (tumor). Além disso, nós pediremos sua permissão para coletar informações relevantes do seu prontuário médico. Se o(a) Sr.(a) decidir não responder, seja a uma questão específica ou a todas as informações, não sofrerá nenhuma penalidade. Você pode participar da entrevista, mas se recusar a fornecer as amostras biológicas (sangue e tumor), que serão coletadas e armazenadas para finalidades de pesquisa.

Questionário:

Um entrevistador virá aplicar o questionário enquanto o(a) Sr.(a) estiver no hospital. A entrevista tem a duração de aproximadamente uma hora e consiste de questões relacionadas a hábitos, estilo de vida, ambiente e saúde.

Coleta de sangue e amostras biológicas:

Será solicitado que o(a) Sr.(a) doe uma única amostra de sangue enquanto estiver no hospital. Uma enfermeira treinada retirará aproximadamente 10 ml de sangue de uma veia do seu braço, da maneira habitual. Se disponível, nós solicitaremos ao Departamento de Patologia do hospital uma pequena amostra do seu tumor.

ANÁLISE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O sangue e as amostras de tumor serão enviados a laboratórios para análise. Essas amostras serão testadas para as características genéticas e celulares que podem estar relacionadas ao desenvolvimento da doença. Suas amostras serão armazenadas por até 30 anos, para serem utilizadas em investigações genéticas e bioquímicas no presente estudo. Ao concordar em participar da parte de coleta de amostras biológicas deste estudo, o(a) Sr.(a) concede agora a autorização para usos

futuros dessas amostras que se relacionam com o objetivo do presente estudo. Nenhuma destas amostras será testada para detectar o uso de drogas ilegais. Qualquer uso futuro das amostras ou estudo de acompanhamento será aprovado por um comitê de ética.

NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO

As amostras biológicas obtidas serão utilizadas apenas para fins de investigação. Qualquer material que não seja imediatamente utilizado continuará a ser armazenado para ser utilizado no futuro para ajudar os cientistas a aprender mais sobre as relações entre meio ambiente, alterações genéticas e saúde. Os resultados da pesquisa não são adequados para uso em testes clínicos, como parte de seu atendimento médico. Portanto, os resultados desses estudos não estarão disponíveis para o(a) Sr.(a). Não haverá nenhum custo financeiro para o(a) Sr.(a) participar neste estudo e não há nenhuma compensação ou pagamento pelo preenchimento do questionário e fornecimento das amostras biológicas.

DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS

Durante a coleta do sangue, o(a) Sr.(a)pode sentir um pouco de dor ou apresentar um hematoma (mancha roxa) no braço, no local onde for inserida a agulha. É possível, mas não provável, que você apresente inchaço ou sangramento no local da punção. Pode também ocorrer um mal-estar relacionado a agulhas. É improvável que ocorram danos físicos a partir da coleta de sangue. Se estes danos ocorrerem, você será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital.

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

Não haverá benefícios diretos para o(a) Sr.(a) que não a satisfação de participar desta pesquisa para o possível benefício das gerações futuras. Sua participação é muito importante para o sucesso desta pesquisa científica.

GARANTIA DA CONFIDENCIALIDADE

As informações relativas à sua participação no estudo serão mantidas confidenciais e serão usadas apenas para fins científicos, em conformidade com a legislação aplicável do Brasil. Ninguém, exceto os membros da equipe de pesquisa terão acesso às suas respostas e aos resultados de testes. Seu empregador (patrão) não terá acesso a quaisquer resultados ou informações que o(a) Sr.(a) nos fornecer. As amostras biológicas não serão etiquetadas com o seu nome. Seu nome não será usado em nenhum relatório e nem divulgado de forma alguma.

DIREITO A SE RETIRAR DO ESTUDO

A sua participação nesta pesquisa é voluntária e o(a) Sr.(a) pode se recusar a participar e/ou retirar o seu consentimento e interromper a participação a qualquer momento, sem nenhuma penalização ou perda de algum benefício que tenha recebido anteriormente. Se o(a) Sr.(a) inicialmente decidir dar seu consentimento para o armazenamento das amostras biológicas para pesquisas futuras, mas depois mudar de idéia e enviar notificação por escrito para (Nome e endereço do Pesquisador Responsável no Local), todos os remanescentes das suas amostras biológicas serão então destruídos. A sua decisão sobre esse assunto não afetará o seu tratamento médico ou seu emprego.

CERTIFICAÇÃO

Eu li a explicação sobre o estudo e tive a oportunidade de discutir e esclarecer minhas dúvidas. Ao concordar em participar deste estudo, eu não renuncio a nenhum direito que possa ser relativo ao acesso e divulgação dos meus dados. Eu concordo em participar das partes do estudo onde está assinalado "sim" e recuso-me a participar das partes do estudo onde está assinalado "não". Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento.

SIM	NÃO	Parte do estudo
[ ]	[ ]	Entrevista
[ ]	[ ]	Coleta e teste do sangue
[ ]	[ ]	Coleta de amostras de tumor e testes relacionados
[ ]	[ ]	Acesso aos prontuários médicos

---	---	---	---
Assinatura do Participante	Data	Assinatura da testemunha	Data

---	---
Nome do Participante	Nome da testemunha

Nós agradecemos a sua colaboração nesse importante projeto de pesquisa. Se o(a) Sr.(a) tiver dúvidas sobre este estudo, você pode telefonar para o Dr. (Nome do Coordenador Local), no telefone ou o(a) Sr.(a) pode escrever-lhe, no seguinte endereço:

Nome e endereço do Centro Colaborador Local

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA OS CONTROLES

INTRODUÇÃO

O(A) Sr.(a) está sendo convidado a participar de um estudo para investigar fatores ambientais e seus efeitos sobre a saúde das pessoas. O estudo está sendo conduzido pelo [Nome do Centro Colaborador Local]. Sua participação neste estudo é voluntária. O(A) Sr.(a) pode se recusar a participar ou retirar-se do estudo a qualquer momento, sem que isso afete de forma alguma o tratamento médico que o(a) Sr.(a) está recebendo. Por favor, leia cuidadosamente este formulário de consentimento e esclareça com o coordenador da pesquisa no hospital quaisquer dúvidas que o(a) Sr.(a) possa ter sobre o estudo antes de assinar este termo.

EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se o(a) Sr.(a) concordar em participar deste estudo, será solicitado que o(a) Sr.(a) participe de uma entrevista e forneça amostras de sangue. Além disso, nós pediremos sua permissão para coletar informações relevantes do seu prontuário médico. Se o(a) Sr.(a) decidir não responder, seja a uma questão específica ou a todas as informações, não sofrerá nenhuma penalidade. O(A) Sr.(a) pode participar da entrevista, mas se recusar a fornecer a amostra de sangue que será coletada e armazenada para finalidades de pesquisa.

Questionário:

Um entrevistador virá aplicar o questionário enquanto o(a) Sr.(a)estiver no hospital. A entrevista tem a duração de aproximadamente uma hora e consiste de questões relacionadas a hábitos, estilo de vida, ambiente e saúde.

Coleta de sangue e amostras biológicas:

Será solicitado que o(a) Sr.(a) doe uma única amostra de sangue. Uma enfermeira treinada retirará aproximadamente 10 ml de sangue de uma veia do seu braço, da maneira habitual.

ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras de sangue serão enviadas a um laboratório para análise. Essas amostras serão testadas para as características genéticas e celulares que podem estar relacionadas ao desenvolvimento da doença. Suas amostras serão armazenadas por até 30 anos, para serem utilizadas em investigações genéticas e bioquímicas no presente estudo. Ao concordar em participar da parte de coleta de amostras biológicas deste estudo, o(a) Sr.(a) concede agora a autorização para usos futuros dessas amostras que se relacionam com o objetivo do presente estudo. Nenhuma destas amostras será testada para detectar o uso de drogas ilegais. Qualquer uso futuro das amostras ou estudo de acompanhamento será aprovado por um comitê de ética.

NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO

As amostras biológicas obtidas serão utilizadas apenas para fins de investigação. Qualquer material que não seja imediatamente utilizado continuará a ser armazenado para ser utilizado no futuro para ajudar os cientistas a aprender mais sobre as relações entre meio ambiente, alterações genéticas e saúde. Os resultados da pesquisa não são adequados para uso em testes clínicos, como parte de seu atendimento médico. Portanto, os resultados desses estudos não estarão disponíveis para o(a) Sr.(a). Não haverá nenhum custo financeiro para o(a) Sr.(a) participar neste estudo e não há nenhuma compensação ou pagamento pelo preenchimento do questionário e fornecimento das amostras biológicas.

DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS

Durante a coleta do sangue, o(a) Sr.(a) pode sentir um pouco de dor ou apresentar um hematoma (mancha roxa) no braço, no local onde for inserida a agulha. É possível, mas não

provável, que o(a) Sr.(a) apresente inchaço ou sangramento no local da punção. Pode também ocorrer um mal-estar relacionado a agulhas. É improvável que ocorram danos físicos a partir da coleta de sangue. Se estes danos ocorrerem, o(a) Sr.(a) será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital.

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

Não haverá benefícios diretos para o(a) Sr.(a) que não a satisfação de participar desta pesquisa para o possível benefício das gerações futuras. Sua participação é muito importante para o sucesso desta pesquisa científica.

GARANTIA DA CONFIDENCIALIDADE

As informações relativas à sua participação no estudo serão mantidas confidenciais e serão usadas apenas para fins científicos, em conformidade com a legislação aplicável do Brasil. Ninguém, exceto os membros da equipe de pesquisa terão acesso às suas respostas e aos resultados de testes. Seu empregador (patrão) não terá acesso a quaisquer resultados ou informações que o(a) Sr.(a) nos fornecer. As amostras biológicas não serão etiquetadas com o seu nome. Seu nome não será usado em nenhum relatório e nem divulgado de forma alguma.

DIREITO A SE RETIRAR DO ESTUDO

A sua participação nesta pesquisa é voluntária e o(a) Sr.(a) pode se recusar a participar e/ou retirar o seu consentimento e interromper a participação a qualquer momento, sem nenhuma penalização ou perda de algum benefício que tenha recebido anteriormente. Se o(a) Sr.(a) inicialmente decidir dar seu consentimento para o armazenamento das amostras biológicas para pesquisas futuras, mas depois mudar de idéia e enviar notificação por escrito para (Nome e endereço do Pesquisador Responsável no Local), todos os remanescentes das suas amostras biológicas serão então destruídos. A sua decisão sobre esse assunto não afetará o seu tratamento médico ou seu emprego.

CERTIFICAÇÃO

Eu li a explicação sobre o estudo e tive a oportunidade de discutir e esclarecer minhas dúvidas. Ao concordar em participar deste estudo, eu não renuncio a nenhum direito que possa ser relativo ao acesso e divulgação dos meus dados. Eu concordo em participar das partes do estudo onde está assinalado "sim" e recuso-me a participar das partes do estudo onde está assinalado "não". Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento.

SIM	NÃO	Parte do estudo
[ ]	[ ]	Entrevista
[ ]	[ ]	Coleta e testes em amostras de sangue
[ ]	[ ]	Acesso aos prontuários médicos

--- --- --- ---
Assinatura do Participante Data Assinatura da testemunha Data

--- ---
Nome do Participante Nome da testemunha

Nós agradecemos a sua colaboração nesse importante projeto de pesquisa. Se o(a) Sr.(a) tiver dúvidas sobre este estudo, você pode telefonar para o Dr. (Nome do Coordenador Local), no telefone ou o(a) Sr.(a) pode escrever-lhe, no seguinte endereço:

<u>Nome e endereço do Centro Colaborador Local</u>

APÊNDICE 2

Em que cidade/estado/país o(a) sr.(a) nasceu?

Q38 (nacionalidade) - ☐ Brasileiro ☐ Estrangeiro Q39(onde nasceu) - _____ Q40 - UF da cidade: _____ Q41 - descrição da cidade: _____

Q42(onde nasceu) - País : _____

Q43 - O(A) sr.(a) estudou em escola? ☐ Sim ☐ Não

Q44 - Selecione a opção mais elevada quanto ao grau de instrução: ☐ Alfabetizado ☐ Primário Completo

☐ Primário Incompleto ☐ Secundário Completo ☐ Secundário Incompleto ☐ Técnico ☐ Universitário

::.História de Câncer no Entrevistado e na Família

Quantos irmãos o(a) Sr(a) teve? : Q45 - ____

Quantos irmãs o(a) Sr(a) teve? : Q46 - ____

Quantos filhos o(a) Sr(a) teve? : Q47 - ____

Quantos filhas o(a) Sr(a) teve? : Q48 - ____

OBS: Segue as opções de preenchimento : Coloque os números e letras em vermelho correspondentes aos campos nos quadros em branco da tabela anexada abaixo :

Tipo de familiar : Próprio(a) Paciente : 01 Mãe: 02 Pai: 03 Irmão: 04 Irmã : 05 Filho: 06 Filha : 07
Vivo/Morto : Vivo: V Morto: M
Tumor : Sim: S Não: N IGN: I
Tabagismo : Sim: S Não: N IGN: I

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
T1	Tipo de familiar	Vivo/Morto	Idade atual ou da morte	Tumor	Tipo de tumor (CID-10)	Idade no diagnóstico	Tabagista
L1							
L2							
L3							
L4							
L5							
L6							
L7							
L8							
L9							
L10							
L11							
L12							
L13							
L14							
L15							
L16							
L17							
L18							
L19							
L20							
Ln	T1_LnC1	T1_LnC2	T1_LnC3	T1_LnC4	T1_LnC5	T1_LnC6	T1_LnC7

OBS: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (tipo de familiar, vivo/morto, idade atual ou da morte, tipo do tumor, idade no diagnóstico ou tabagista). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T1_L3C2 - Tabela1 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de história familiar, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de Vivo/Morto.

::.História de Tabagismo

Q49 - O(A) Sr.(a) fuma ou já fumou em média 1 cigarro, charuto ou cachimbo, diariamente, pelo menos por 1 ano?

☐ Sim, ainda fuma ☐ Nunca fumou ☐ Somente no passado

(se parou de fumar há menos de 12 meses assinalar(sim, ainda fuma)

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

Nota para o entrevistador: Evite a superposição de anos para consumo do mesmo tipo de cigarro, por exemplo: utilize 30-40, 41-45 ao invés de 30-40, 40-45.

OBS: Segue as opções de preenchimento : Coloque os números em vermelho correspondentes aos campos nos quadros em branco da tabela anexada abaixo : Tipo de Tabaco : Cigarro : 01 Charuto : 02 Cachimbo : 03 Cigarro de palha: 04

Que tipo de tabaco o(a) sr./(a) fuma ou já fumou?

	C1	C2	C3	C4
T2	Tipo de Tabaco	Idade de Início	Idade que Parou	Nº por Dia
L1				
L2				
L3				
L4				
L5				
Ln	T2_LnC1	T2_LnC2	T2_LnC3	T2_LnC4

OB 8: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (tipo de tabaco,idade de início, idade que parou, nº por dia). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T2_L3C2 - Tabela2 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de tabaco, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de idade de início.

::.Hábitos de Bebida

Q50 - O(A) Sr(a) já tomou (ingeriu) bebidas alcoólicas pelo menos 1 vez por mês?

☐ Sim, ainda bebe ☐ Nunca ☐ Só no passado

(se parou nos últimos 12 meses, a resposta é (sim ainda bebe)

Q51 - Quando o(a) Sr(a) costuma beber(ou bebia)?

☐ Nas refeições ☐ Entre as refeições ☐ Aos finais de semana ☐ Ambos

Descreva os períodos de sua vida durante os quais o(a) tomou bebidas alcoólicas. Por favor, tente resumir as mudanças mais importantes em sua vida em relação à quantidade e tipo de bebida. Ignore quaisquer mudanças ocorridas durante curtos períodos de tempo(menos de 1 ano). ou bebidas consumidas ocasionalmente.

NOTA PARA O ENTREVISTADOR: Evite a superposição de anos de consumo de uma mesma bebida, por exemplo: utilize 30-40,41-45ao invés de 30-40,40-45. perguntar separadamente para cada bebida. OBS. Destilados: uísque, conhaque, cachaça e vodca.

OBS: Segue as opções de preenchimento : Coloque os números em vermelho correspondentes aos campos nos quadros em branco da tabela anexada abaixo :

Bebida : Vinho : 01 Cerveja : 02 Destilados : 03
Unidade: Copo pequeno - 50ml: 01 Copo médio -100ml: 02 Copo grande -250ml: 03 1/2 garrafa pequena ou lata - 330ml: 04
Garrafa 700-750ml : 05 Garrafa - 1L : 06
Por : Dia : 01 Semana : 02 Mês : 03

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
T3	Bebida	Idade de Início	Idade que Parou	Unidade	Unidade Consumidas	Por
L1						
L2						
L3						
L4						
L5						
Ln	T3_LnC1	T3_LnC2	T3_LnC3	T3_LnC4	T3_LnC5	T3_LnC6

OB 8: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (tipo de bebida,idade de início, idade que parou, unidade,unidade consumida e por). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T3_L3C4 - Tabela3 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de bebida, e da 4ª coluna (C4) que representa o campo com informações de unidade.

APÊNDICE 3

FORMULÁRIO DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS: CABEÇA E PESCOÇO

Q0 - Nº de Identificação: _____ Nome do Paciente: _____

::.Dados Clínicos e Laboratoriais ao Diagnóstico de Cabeça e Pescoço

PRIMEIRA CONSULTA

QUEIXA E DURAÇÃO

Q201-Nome da Mãe: _____

Q1 -Peso habitual antes da doença: _____ (KG)

Q2 -Altura: _____ (cm)

Q3 -Perda de Peso: ☐ Sim ☐ Não Q4 - _____ (KG) Q5 - _____ (%) Q6 - _____ (meses)

Q7 -IMC: _____

Q8 -Alterações Visuais: ☐ Sim ☐ Não Q9 - _____ (dias)

Q10 -Dificuldade Respiratória/Dispnéia: ☐ Sim ☐ Não Q11 - _____ (dias)

Q12 -Traqueostomia: ☐ Sim ☐ Não - Q13-Data Realização: _____ dd/mm/aaaa

Q14 -Disfagia: ☐ Sim ☐ Não Q15 - _____ (dias)

Q16 -Disfonia: ☐ Sim ☐ Não Q17 - _____ (dias)

Q18 -Dor: ☐ Sim ☐ Não Q19- _____ (dias)

Q20 -Feridas: ☐ Sim ☐ Não Q21 - _____ (dias) Q22 -Localização: _____

Q23 -Lesões externas visíveis: ☐ Sim ☐ Não Q24 - _____ (dias) Q25 - Localização: _____

Q26 -Nódulos ou massas:: ☐ Sim ☐ Não Q27 - _____ (dias) Q28 -Localização: _____

Q29 -Obstrução Nasal: ☐ Sim ☐ Não Q30 - _____ (dias) Q31 -Lado: ☐ Esquerda ☐ Direita

Q32 -Odinofagia: ☐ Sim ☐ Não Q33 - _____ (dias)

Q34 -Otalgia: ☐ Sim ☐ Não Q35 - _____ (dias)

Q36 -Rinorréia: ☐ Sim ☐ Não Q37 - _____ (dias)

Q38 -Sangramentos: ☐ Sim ☐ Não Q39 - _____ (dias)

Q40 -Sensação de corpo estranho: ☐ Sim ☐ Não Q41 - _____ (dias) Q42 - Localização: _____

Q43 -Tosse: ☐ Sim ☐ Não Q44 - _____ (dias) Q45 - Outras Queixas: _____

LOCALIZAÇÃO DA LESÃO
CID-10

Q46 - ☐ C00 - Neoplasia maligna do lábio

Q47 - ☐ C00.0 - Lábio superior externo

Q48 - ☐ C00.1 - Lábio inferior externo

Q49 - ☐ C00.2 - Lábio externo, não especificado

Q50 - ☐ C00.3 - Lábio superior, face interna

Q51 - ☐ C00.4 - Lábio inferior, face interna

Q52 - ☐ C00.5 - Lábio, sem especificação, face interna

Q53 - ☐ C00.6 - Comissura labial

Q54 - ☐ C00.8 - Lesão invasiva do lábio

Q55 - ☐ C00.9 - Lábio, não especificado

Q56 - ☐ C01 - Neoplasia maligna de base de língua

Q57 - ☐ C02 - Neoplasia maligna de outras partes e partes não especificadas de língua

Q58 - ☐ C02.0 - Face dorsal da língua

Q59 - ☐ C02.1 - Borda de língua

Q60 - ☐ C02.2 - Face ventral da língua

Q61 - ☐ C02.3 - Dois terços anteriores da língua, parte não especificada

Q62 - ☐ C02.4 - Amígdala lingual

Q63 - ☐ C02.8 - Lesão invasiva da língua

Q64 - ☐ C02.9 - Língua, não especificada

Q65- ☐ C03 - Neoplasia maligna de gengiva

Q66 - ☐ C03.0 - Gengiva superior

Q67 - ☐ C03.1 - Gengiva inferior

Q68 - ☐ C03.9 - Gengiva, não especificada

Q69 - ☐ C04 - Neoplasia maligna de assoalho da boca

Q70 - ☐ C04.0 - Assoalho anterior da boca

Q71 - ☐ C04.1 - Assoalho lateral da boca

Q72 - ☐ C04.8 - Lesão invasiva do assoalho da boca

Q73 - ☐ C04.9 - Assoalho da boca, não especificado

Q74 - ☐ C05 - Neoplasia maligna de palato

Q75 - ☐ C05.0 - Palato duro

Q76 - ☐ C05.1 - Palato mole

Q77 - ☐ C05.2 - Úvula

Q78 - ☐ C05.8 - Lesão invasiva do palato

Q79 - ☐ C05.9 - Palato não especificado

Q80 - ☐ C06 - Neoplasia maligna de outras partes e de partes não especificadas da boca

Q81 - ☐ C06.0 - Mucosa oral

Q82 - ☐ C06.1 - Vestíbulo da boca

Q83 - ☐ C06.2 - Área retromolar

Q84 - ☐ C06.8 - Lesão invasiva de outras partes e de partes não especificadas da boca

Q85 - ☐ C06.9 - Boca, não especificada

Q86 - ☐ C09 - Neoplasia maligna da amígdala

Q87 - ☐ C09.0 - Fossa amigdaliana

Q88 - ☐ C09.1 - Pilar amigdaliano(anterior)(posterior)

Q89 - ☐ C09.8 - Lesão invasiva da amígdala

Q90 - ☐ C09.9 - Amígdala, não especificada

Q91 - ☐ C10 - Neoplasia maligna da orofaringe

Q92 - ☐ C10.0 - Vallécula

Q93 - ☐ C10.1 - Face anterior da epiglote

Q94 - ☐ C10.2 - Parede lateral da orofaringe

Q95 - ☐ C10.3 - Parede posterior da orofaringe

Q96 - ☐ C10.4 - Fenda branquial

Q97 - ☐ C10.8 - Lesão invasiva da orofaringe

Q98 - ☐ C10.9 - Orofaringe, não especificada

Q99 - ☐ C11 - Neoplasia maligna da nasofaringe

Q100 - ☐ C11.0 - Parede superior da nasofaringe

Q101 - ☐ C11.1 - Parede posterior da nasofaringe

Q102 - ☐ C11.2 - Parede lateral da nasofaringe

Q103 - ☐ C11.3 - Parede anterior da nasofaringe

Q104 - ☐ C11.8 - Lesão invasiva da nasofaringe

Q105 - ☐ C11.9 - Nasofaringe, não especificada

Q106 - ☐ C12 - Neoplasia maligna do seio piriforme

Q107 - ☐ C13 - Neoplasia maligna da hipofaringe

Q108 - ☐ C13.0 - Região pós-cricóidea

Q109 - ☐ C13.1 - Prega ariepiglótica, face hipofaríngea

Q110 - ☐ C13.2 - Parede posterior da hipofaringe

Q111 - ☐ C13.8 - Lesão invasiva da orofaringe

Q112 - ☐ C13.9 - Hipofaringe, não especificada

Q113 - ☐ C14 - Neoplasia maligna de outras localidades e de localidades mal definidas do lábio cavidade oral e faringe

Q114 - ☐ C14.0 - Faringe, não especificada

Q115 - ☐ C14.1 - Laringofaringe, descrita como tal

Q116 - ☐ C14.2 - Anel de Waldeyer

Q117 - ☐ C14.8 - Lesão invasiva do lábio, cavidade oral e faringe

Q118 - ☐ C30 - Neoplasia maligna da cavidade nasal e do ouvido médio

Q119 - ☐ C30.0 - Cavidade nasal

Q120 - ☐ C30.1 - Ouvido médio

Q121 - ☐ C31 - Neoplasia maligna dos seios da face

Q122 - ☐ C31.0 - Seio maxilar

Q123 - ☐ C31.1 - Seio etmoidal

Q124 - ☐ C31.2 - Seio frontal

Q125 - ☐ C31.3 - Seio esfenoidal

Q126 - ☐ C31.8 - Lesão invasiva dos seios da face

Q127 - ☐ C31.9 - Seio da face, não especificado

Q128 - ☐ C32 - Neoplasia maligna da laringe

Q129 - ☐ C32.0 - Glote

Q130 - ☐ C32.1 - Região supraglótica

Q131 - ☐ C32.2 - Região subglótica

Q132 - ☐ C32.3 - Cartilagens da laringe

Q133 - ☐ C32.8 - Lesão invasiva da laringe

Q134 - ☐ C32.9 - Laringe não especificada

Q135 - ☐ C77.0 - Neoplasia maligna secundária e não especificada dos gânglios linfáticos

Q136 - ☐ C44.9 - Neoplasia maligna da pele

TAMANHO DO TUMOR

Tamanho: Q137 - ____ cm X Q138 - ____ cm X Q139 - ____ cm

LINFONODOS COMPROMETIDOS CLINICAMENTE

Q140 - E1 NIVEL I D: ☐ Sim ☐ Não Q141 - Nº de Linfonodos: ____ Q142 - Maior Linfonodo ____ cm

Q143 - E2 NIVEL II D: ☐ Sim ☐ Não Q144 - Nº de Linfonodos: ____ Q145 - Maior Linfonodo ____ cm

Q146 - E3 NIVEL III D: ☐ Sim ☐ Não Q147 - Nº de Linfonodos: ____ Q148 - Maior Linfonodo ____ cm

Q149 - E4 NIVEL IV D: ☐ Sim ☐ Não Q150 - Nº de Linfonodos: Q151 - Maior Linfonodo: cm

Q152 - E5 NIVEL V D: ☐ Sim ☐ Não Q153 - Nº de Linfonodos: Q154 - Maior Linfonodo: cm

Q155 - E6 NIVEL I E: ☐ Sim ☐ Não Q156 - Nº de Linfonodos: Q157 - Maior Linfonodo: cm

Q158 - E7 NIVEL II E: ☐ Sim ☐ Não Q159 - Nº de Linfonodos: Q160 - Maior Linfonodo: cm

Q161 - E8 NIVEL III E: ☐ Sim ☐ Não Q162 - Nº de Linfonodos: Q163 - Maior Linfonodo: cm

Q164 - E9 NIVEL IV E: ☐ Sim ☐ Não Q165 - Nº de Linfonodos: Q166 - Maior Linfonodo: cm

Q167 - E10 NIVEL V E: ☐ Sim ☐ Não Q168 - Nº de Linfonodos: Q169 - Maior Linfonodo: cm

Q170 - E11 NIVEL VI: ☐ Sim ☐ Não Q171 - Nº de Linfonodos: Q172 - Maior Linfonodo: cm

Q173 - E12 NIVEL VII: ☐ Sim ☐ Não Q174 - Nº de Linfonodos: Q175 - Maior Linfonodo: cm

METÁSTASES À DISTÂNCIA

Q176 - SNC: ☐ Sim ☐ Não Q177 - Data: dd/mm/aaaa

Q178 - Pulmão: ☐ Sim ☐ Não Q179 - Data: dd/mm/aaaa

Q180 - Fígado: ☐ Sim ☐ Não Q181 - Data: dd/mm/aaaa

Q182 - Ossos: ☐ Sim ☐ Não Q183 - Data: dd/mm/aaaa Q184 - Qual ?:

Q185 - Outros órgãos: ☐ Sim ☐ Não Q186 - Data: dd/mm/aaaa Q187 - Qual ?:

TMN Clínico: Q188 - T Q189 - N Q190 - M

INFORMAÇÕES TERAPÊUTICAS

Q191 - Cirurgia realizada: ☐ Sim ☐ Não Q192 - Data: dd/mm/aaaa

Q193 - Notas:

Q194 - Radioterapia: ☐ Sim ☐ Não Q195 - Data Início: dd/mm/aaaa Q196 - Data término:

Q197 - Tipo de Radioterapia:

Q198 - Dose: cGy

Q199 - Quimioterapia: ☐ Sim ☐ Não

(Preencha a tabela abaixo somente se a sua resposta em Quimioterapia for Sim)

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
T1	Drogas	Dose	Nº Dias	Ciclos	Data Ini.	Data Fim
L1						
L2						
L3						
L4						
L5						
Ln	T1_LnC1	T1_LnC2	T1_LnC3	T1_LnC4	T1_LnC5	T1_LnC6

OBS: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (drogas,dose,nº dias,ciclos, data início ou data fim). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T1_L3C2 - Tabela1 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de quimioterapia, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de dose.

Q200 - Tipo de Quimioterapia (especificar):

APÊNDICE 4

FORMULÁRIO ANÁTOMO PATOLÓGICO: CABEÇA E PESCOÇO

OBS: Ao utilizar o banco de dados relativo a este formulário, deve-se verificar que há um código formado pela letra "U" seguido de um número, antes do código de cada questão. Como para um mesmo paciente pode haver mais de um anátomo patológico, este código inicial com a letra "U" indica o número do formulário de anátomo patológico inserido no sistema. Suponha o exemplo U2_Q01 "U2" indica o o segundo formulário de anátomo patológico e "Q01" a primeira questão deste formulário.

Q0 - Nº de Identificação: _____ Nome do Paciente: _____

::: Protocolo Anátomo Patológico Cabeça e Pescoço

1) TIPO DE MATERIAL

Nota: Preencher o campo biópsia e as informações subsequentes somente para os casos em que o paciente não foi submetido a cirurgia.

Q1 - ☐ Biópsia ☐ Peça Cirúrgica - Q2 - data do exame: _____ dd mm aaaa

2) EXAME MACROSCÓPICO

Tamanho do Tumor - dimensão máxima em centímetros

(maiores diâmetros e espessura tomada a partir da superfície mucosa normal)

Q3 - _____ cm X Q4 - _____ cm X Q5 - _____ cm Q6 - ☐ Não-avaliável

Q7 - Crescimento: ☐ Exofítico ☐ Endofítico ☐ Não-avaliável

Q8 - Áreas de comprometimento do tumor

3) EXAME MICROSCÓPICO

Tipo Histológico - Carcinoma Epidermóide

Q9 - Carcinoma espinocelular (CEC): ☐ Sim ☐ Não ☐ Não informado

Q9 - Variante Morfológica: ☐ Verrucoso ☐ Adenoescamoso ☐ Linfoepitelial ☐ Escamoso Basaloide ☐ Escamoso Adenóide ☐ Fusocelular (Sarcomatóide) ☐ Não-avaliável ☐ Outro

Q10 _____

Q11 - Grau de diferenciação: ☐ Bem diferenciado ☐ Moderadamente ☐ Pouco Diferenciado ☐ Não-avaliável

Para microinvasão (o componente in situ predomina, com invasão focal da lâmina própria)

☐ Microinvasão ☐ Lâmina Própria ☐ Plano Muscular ☐ Cartilagem ☐ Outras Estruturas

Q12 - Profundidade de invasão do tumor:

☐ Não-avaliável

Infiltração Vascular

Q13 - Sanguínea: ☐ Ausente ☐ Presente ☐ Não-avaliável

Q14 - Linfática: ☐ Ausente ☐ Presente ☐ Não-avaliável

Q15 - Invasão Peri-neural: ☐ Ausente ☐ Presente ☐ Não-avaliável

Q16 - Infiltrado inflamatório peri-tumoral: ☐ Ausente ☐ Escasso ☐ Moderado ☐ Intenso ☐ Não-avaliável

Q17 - Margens Cirúrgicas:

☐ Com displasia de alto grau (especificar o local): Q18 _____

☐ Envolvida por tumor invasivo (especificar o local): Q18 _____

☐ Com carcinoma in situ (especificar o local): Q18 _____

☐ Não avaliável Q18 _____

☐ Livres de tumor

Q19 - Lesões em órgãos adjacentes

_____

Linfonodos

NÍVEL I D

Q20 - Nº dissecado _____ Q21 - nº comprometido _____ Q22 - Invasão extracapsular _____

NÍVEL II D

Q23 - Nº dissecado _____ Q24 - nº comprometido _____ Q25 - Invasão extracapsular _____

NÍVEL III D

Q26 - Nº dissecado _____ Q27 - nº comprometido _____ Q28 - Invasão extracapsular _____

NÍVEL IV D

Q29 - Nº dissecado _____ Q30 - nº comprometido _____ Q31 - Invasão extracapsular _____

NÍVEL V D

Q32 - Nº dissecado _____ Q33 - nº comprometido _____ Q34 - Invasão extracapsular _____

NÍVEL I E

Q35 - Nº dissecado _____ Q36 - nº comprometido _____ Q37 - Invasão extracapsular _____

NÍVEL II E

Q38 - Nº dissecado _____ Q39 - nº comprometido _____ Q40 - Invasão extracapsular _____

NÍVEL III E

Q41 - Nº dissecado _____ Q42 - nº comprometido _____ Q43 - Invasão extracapsular _____

NÍVEL IV E

Q44 - Nº dissecado _____ Q45 - nº comprometido _____ Q46 - Invasão extracapsular _____

NÍVEL V E

Q47 - Nº dissecado _____ Q48 - nº comprometido _____ Q49 - Invasão extracapsular _____

NÍVEL VI

Q50 - Nº dissecado _____ Q51 - nº comprometido _____ Q52 - Invasão extracapsular _____

NÍVEL VII

Q53 - Nº dissecado _____ Q54 - nº comprometido _____ Q55 - Invasão extracapsular _____

Estadiamento Patológico: Q56 - T _____ cm X Q57 - N _____ cm X Q58 - M _____ cm Q59 - ☐ Não-avaliável

APÊNDICE 5

FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO: CABEÇA E PESCOÇO

OBS: Ao utilizar o banco de dados relativo a este formulário, deve-se verificar que há um código formado pela letra "A" seguido de um número, antes do código de cada questão. Como para um mesmo paciente pode haver mais de um acompanhamento, este código inicial com a letra "A" indica o número do formulário de acompanhamento inserido no sistema. Suponha o exemplo A2_Q3: "A2" indica o o segundo formulário de acompanhamento e "Q3" a terceira questão deste formulário.

Q0 - Nº de Identificação: _____ Nome do Paciente: _____

Obs: Para cada retorno do paciente ao acompanhamento, deverá ser aberto um novo questionário de acompanhamento.

::Acompanhamento de Cabeça e Pescoço

Q1- ☐ Sem evidências de doenças - Q2- Data: _____ dd/mm/aaaa

Q3- ☐ Recidiva loco-regional ou residual

Q4- ☐ Metástase à distância

Q5- ☐ 2º Tumor primário

Q6- ☐ Óbito

Q7- ☐ Paciente perdido do acompanhamento - Q8- Data: _____ dd/mm/aaaa

Q9- ☐ Outras situações Q10- Data: _____ dd/mm/aaaa

Se Sim, qual? Q11- ☐ Acompanhamento em outro hospital ☐ Mudou de cidade ☐ Outra - Qual? Q12- _____

Comentários referente aos campos mencionados acima:

Sem evidências de doenças - Ao clicar neste tópico será aberto somente o campo de inclusão de data de retorno dos paciente, ocultando os demais itens do questionário;

Recidiva loco-regional ou residual - Ao clicar neste tópico será aberto somente os itens A e B deste questionário, demais serão ocultados;

Metástase à distância - Ao clicar neste tópico será aberto somente os itens C e D deste questionário, demais serão ocultados;

2º Tumor primário - Ao clicar neste tópico será aberto somente os itens E e F deste questionário, demais serão ocultados;

Óbito - Ao clicar neste tópico será aberto somente o item G deste questionário, demais serão ocultados.

Paciente perdido do acompanhamento - Ao clicar neste tópico será aberto somente o campo de inclusão de data. Incluir tela de alerta: "Esta opção somente deverá ser escolhida na condição da busca de informações sobre o paciente terem sido esgotadas".

OBS: Se mais de uma opção for escolhida, serão abertos na tela os tópicos relacionados ao itens da opção: Ex: Paciente retornou para acompanhamento, mas teve uma recidiva e veio a óbito, os tópicos a serem marcados serão: ☑ Recidiva loco-regional ou residual ☑ Óbito, esta propriedade não se aplica para os casos da opção escolhida ser : "Paciente Perdido".

A) RECIDIVA 8 - Recidiva loco-regional ou residual

Q13- Tumor Residual (tumor primário): ☐ Sim ☐ Não Q14- Data: _____ dd/mm/aaaa

Q15- Recidiva Local: ☐ Sim ☐ Não Q16- Data: _____ dd/mm/aaaa

Q17- Tumor Residual (doença regional): ☐ Sim ☐ Não Q18- Data: _____ dd/mm/aaaa

Q19 Recidiva Regional - Cervical: ☐ Sim ☐ Não Q20 Data: _____ dd/mm/aaaa

Q21-Nível: _____ Q22- ☐ Direito ☐ Esquerdo

Q23-Nível: _____ Q24- ☐ Direito ☐ Esquerdo

Q25-Nível: _____ Q26- ☐ Direito ☐ Esquerdo

B) TRATAMENTO REALIZADO PARA A RECIDIVA - Recidiva loco-regional ou residual

Q27- Notas: _____

Q28-Cirurgia: ☐ Sim ☐ Não Q29-Se sim, Data: dd/mm/aaaa

Q30-Notas:

Q31-Radioterapia: ☐ Sim ☐ Não Q32- Se sim, Data Início: dd/mm/aaaa Q33- Data Fim:

Q34-Se sim, tipo de Radioterapia:

Q35-Se sim, Dose:

Q36-Quimioterapia: ☐ Sim ☐ Não

T1	C1 Drogas	C2 Dose	C3 Ciclos	C4 Data Início	C5 Data Término
L1					
L2					
L3					
L4					
L5					
L6					
L7					
L8					
Ln	T1_LnC1	T1_LnC2	T1_LnC3	T1_LnC4	T1_LnC5

OB 8: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (drogas,dose,nº dias,ciclos, data início ou data fim). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T1_L3C2 - Tabela1 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de quimioterapia da recidiva, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de dose.

Q37 - Tipo de Quimioterapia (especificar):

C) METÁSTASES À DISTÂNCIA

Q38 -SNC: ☐ Sim ☐ Não Q39-Data: dd/mm/aaaa

Q40-Pulmão: ☐ Sim ☐ Não Q41-Data: dd/mm/aaaa

Q42-Fígado: ☐ Sim ☐ Não Q43-Data: dd/mm/aaaa

Q44-Ossos: ☐ Sim ☐ Não Q45-Data: dd/mm/aaaa Q46- Qual ?:

Q47-Outros órgãos: ☐ Sim ☐ Não Q48-Data: dd/mm/aaaa Q49-Qual ?:

D) TRATAMENTO REALIZADO PARA A METÁSTASES À DISTÂNCIA

Q50-Notas:

Q51-Cirurgia: ☐ Sim ☐ Não Q52- Se sim, Data: dd/mm/aaaa

Q53-Notas:

Q54-Radioterapia: ☐ Sim ☐ Não Q55-Se sim, Data Início: dd/mm/aaaa Q56- Data Fim:

Q57-Se sim, tipo de

Radioterapia:

Q58-Se sim, Dose:

Q59-Quimioterapia: ☐ Sim ☐ Não

T2	C1 Drogas	C2 Dose	C3 Ciclos	C4 Data Início	C5 Data Término
L1					
L2					
L3					
L4					
L5					
L6					
L7					
L8					
Ln	T2_LnC1	T2_LnC2	T2_LnC3	T2_LnC4	T2_LnC5

OB 8: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (drogas,dose,nº dias,ciclos, data início ou data fim). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T2_L3C2 - Tabela2 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de quimioterapia de metástase, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de dose.

Q60-Tipo de Quimioterapia (especificar):

E) SEGUNDA LESÃO - 2º Tumor primário

Q61-Cavidade oral: ☐ Sim ☐ Não Q62-Data: dd/mm/aaaa

Q63-Orofaringe: ☐ Sim ☐ Não Q64-Data: dd/mm/aaaa

Q65-Hipofaringe: ☐ Sim ☐ Não Q66-Data: dd/mm/aaaa

Q67-Laringe: ☐ Sim ☐ Não Q68-Data: dd/mm/aaaa

Q69-Esôfago: ☐ Sim ☐ Não Q70-Data: dd/mm/aaaa

Q71-Pulmão: ☐ Sim ☐ Não Q72-Data: dd/mm/aaaa

Q73-Outros: ☐ Sim ☐ Não Q74-Data: dd/mm/aaaa Q75-Qual ?:

F) TRATAMENTO DA SEGUNDA LESÃO - 2º Tumor primário

Q76-Notas:

Q77-Cirurgia: ☐ Sim ☐ Não Q78-Se sim, Data: dd/mm/aaaa

Q79-Notas:

Q80-Radioterapia: ☐ Sim ☐ Não Q81-Se sim, Data Início: dd/mm/aaaa Q82-Data Fim:

Q83-Se sim, tipo de Radioterapia:

Q84-Se sim, Dose:

Q85-Quimioterapia: ☐ Sim ☐ Não

T3	C1 Drogas	C2 Dose	C3 Ciclos	C4 Data Início	C5 Data Término
L1					
L2					
L3					
L4					
L5					
L6					
L7					
L8					
Ln	T3_LnC1	T3_LnC2	T3_LnC3	T3_LnC4	T3_LnC5

OB 8: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (drogas,dose,nº dias,ciclos, data início ou data fim). Desta forma, o L y é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T3_L3C2 - Tabela3 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de quimioterapia da segunda lesão, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de dose .

Q86-Tipo de Quimioterapia (especificar):

G) INFORMAÇÕES SOBRE O ÓBITO

Q87-Óbito: ☐ Sim ☐ Não (preencha os itens abaixo somente se for sim)

Q88-Data Óbito: dd/mm/aaaa

Q89-Tipo de Óbito: ☐ Outra causa ☐ Óbito pela neoplasia

Q90-Se por outra causa, informe qual: