UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FCF / FEA / FSP
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Nutrição Humana Aplicada - PRONUT

SUZANA BRESSAN

Polimorfismos no gene da cobre, zinco - superóxido dismutase, estado
nutricional relativo ao zinco e estresse oxidativo em pacientes com câncer da
cavidade oral e orofaringe

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientador: Prof. Dr. Thomas Prates Ong
Co-orientadora: Profa. Dra. Sílvia M. Franciscato Cozzolino

São Paulo
2010

SUZANA BRESSAN

Polimorfismos no gene da cobre, zinco - superóxido dismutase, estado
nutricional relativo ao zinco e estresse oxidativo em pacientes com câncer da
cavidade oral e orofaringe

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientador: Prof. Dr. Thomas Prates Ong

Co-orientadora: Profa. Dra. Sílvia M. Franciscato Cozzolino

São Paulo

2010

SUZANA BRESSAN

Polimorfismos no gene da cobre, zinco - superóxido dismutase, estado
nutricional relativo ao zinco e estresse oxidativo em pacientes com câncer da
cavidade oral e orofaringe

Comissão Julgadora
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Thomas Prates Ong
(Orientador/Presidente)

1° Examinador

2° Examinador

São Paulo, ____ de _____ 2010.

DEDICATÓRIA

À **Deus**, pois suas mãos me fizeram e me formaram. Os teus olhos viram o meu embrião; todos os dias determinados para mim foram escritos no teu livro antes de qualquer deles existir.

Aos meus **pais**, por todo amor sincero, por terem acreditado em mim e lutado para permitir esse momento.

À minha **irmã**, tão querida, que me faz refletir com suas palavras. Obrigada por todo amor e carinho.

Ao meu amado **sobrinho**, que eu não tenho palavras para expressar o meu amor, é simplesmente um anjo que Deus colocou em minha família. Sendo ainda criança, sempre me surpreende com seu carinho sincero e sabedoria.

À Professora, amiga e “mãe” **Semíramis M. A. Domene** que sempre estimulou em mim o desejo de fazer algo diferente e de uma forma especial. Sua sabedoria é única, e é uma pessoa que tenho como exemplo de força, dedicação e disciplina.

À amiga e “mãe” **Marlene** que sempre foi um anjo em minha vida. Sempre me incentivou a acreditar e lutar por meus sonhos. E faz sempre questão de estar presente em todos os momentos da minha vida. Sou muito grata e honrada por tanto carinho e dedicação.

Ao meu jovem amigo **Yuri**, que faleceu por câncer.

À minha **família inteira**, meu bem mais valioso, que me justifica, me fortalece, me impulsiona e me conduz em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor **Thomas Prates Ong**, que me aceitou e possibilitou a realização de um sonho. Obrigada pela paciência e por todos os conselhos de “pai”. Desde a primeira conversa, percebi que se tratava de uma pessoa que merece respeito e admiração.

À Professora **Sílvia M. F. Cozzolino**, por ter me orientado, por ser um exemplo de profissional e de caráter. É o tipo de pessoa que me impulsiona a seguir em frente com meu sonho, e que me deixa perplexa com sua sabedoria, capacidade e humildade.

A Professora **Inar Alves de Castro**, por toda ajuda, atenção e colaboração para realização deste trabalho.

Ao Professor **Fernando Salvador Moreno**, por todos os ensinamentos dedicados durante o mestrado e sugestões feitas no exame de qualificação.

Ao **Dr. Marcos Brasilino de Carvalho**, pelo exemplo de humildade, pela dedicação com o projeto de pesquisa, por todas as reuniões e críticas construtivas feitas durante o desenvolvimento do trabalho e por toda contribuição no exame de qualificação.

Ao **Dr. José Francisco de Sales Chagas** que sempre acreditou no trabalho e foi essencial para o desenvolvimento do trabalho realizado, sempre disposto a ajudar com a coleta de pacientes.

Ao amigo **Luis Antonio** e toda a equipe de saúde do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital e Maternidade Celso Pierro. Obrigada por toda dedicação e empenho na seleção de participantes para realização do trabalho.

À **Dra. Adriana M. A. da Silva** por todas as sugestões durante a elaboração do projeto de pesquisa, por todo entusiasmo na realização das análises.

À **Dra. Rosana S. Brasileiro**, por ser exemplo de profissional, por toda ajuda no contato com os pacientes, e para realização do trabalho.

Aos **participantes** da pesquisa. Obrigada por acreditarem no trabalho, pela compreensão, aprendizado e por serem exemplos de força e coragem.

À professora **Paula Andrea Martins**, exemplo de humildade e dedicação. Obrigada pela amizade e incentivo.

À professora **Lilia Z. F. dos Santos**, pela amizade, apoio e incentivo para buscar a realização dos meus sonhos.

À professora **Kátia C. P. McLellan**, pela amizade, incentivo e exemplo de determinação.

À professora **Maria Angélica T. Medeiros**, por todas as conversas, e por se emocionar junto comigo, no momento em que eu soube que havia passado na seleção do mestrado.

À amiga **Patrícia Borges Botelho**, muito obrigada pela amizade, por me apoiar e por toda ajuda nas análises realizadas.

Ao amigo **Juvenal**, obrigada pela amizade.

À minha **tia Isabel**, que me alfabetizou na primeira série. Sempre me apoiou e acreditou em mim como uma mãe acredita em uma filha. Obrigada por todo amor, carinho e dedicação.

Às primas **Mari, Carol, Fê e Flávia**, são como irmãs que estiveram comigo me apoiando. Obrigada por todos os momentos, por todas as palavras, por todo amor e carinho dedicado.

Ao **Rafael R. Watanabe**, uma pessoa muito especial que tive o privilégio de conhecer. Obrigada por todo carinho, compreensão e sabedoria.

À amiga **Luciana S. Nishimura**, que esteve comigo durante todo o período do mestrado, nas etapas de trabalho. Obrigada pela amizade, por todos os momentos de aprendizado e por toda dedicação.

À amiga **Liliane V. Pires**, um anjo que ilumina o laboratório com sua luz. É um exemplo de amizade, perseverança e dedicação.

À amiga **Fernanda C. C. Guilherme**, por sua amizade sincera, e seu jeito cuidadoso de uma irmã mais velha.

À amiga **Janáina**, (Janis Joplin), pela amizade, alegria e carinho.

As amigas, **Kátia Callou e Kaluce Gonçalves**, pela amizade e carinho sincero.

Aos amigos do laboratório de Nutrição e Minerais, **Ariana, Camila, Rafael, Bárbara, Cris e Maritsa**, por todas as conversas, amizade, risadas, ajuda durante as análises no laboratório, e por serem exemplos de profissionais.

Ao técnico do laboratório de Nutrição e Minerais **Alexandre Pimental**, por toda ajuda para realização do trabalho realizado, por todas as conversas e pela amizade.

Aos alunos de iniciação científica, **Estefan, Leila, Verônica, Luciene, e Graziela**, por contribuírem com a realização do trabalho cotidiano e por deixarem o ambiente de trabalho mais agradável, alegre e harmonioso.

As amigas do laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer, **Fábia, Juliana, Letícia e Roberta**, por toda contribuição e amizade.

À **Lurdinha**, por todas as conversas logo cedo. Obrigada pela amizade.

Aos colaboradores **Mônica, Cléo e Edilson**, pela amizade e dedicação.

Aos amigos do departamento de **Alimentos e Nutrição Experimental** que deixaram os dias mais alegres e que tornaram o ambiente de trabalho mais alegre.

Aos amigos da família **Carvalho e Juncioni**, por toda ajuda, incentivo, carinho e amizade construída.

Ao amigo **Jean**, do laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis, pela amizade, por todas as discussões em relação ao projeto de pesquisa, por todos os ensinamentos, paciência e dedicação.

À amiga **Lili**, do laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis, pela amizade e dedicação durante a realização das análises.

Ao amigo **Marcelo**, do laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis, pela amizade, por todo empenho e dedicação com o projeto de pesquisa.

À amiga **Mariana**, do laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis, por toda amizade, carinho e ajuda com a seleção de novos pacientes.

As amigas do laboratório de Biologia Molecular do Hospital Helipolis **Diana, Ceci e Carol** pelos agradáveis momentos durante as análises.

A todas as minhas amigas e amigos que de alguma forma me apoiaram e me incentivaram.

Aos **docentes e colaboradores** do departamento de alimentos e nutrição experimental da FCF/USP.

À **Elaine e Jorge** da pós graduação, por todo auxílio e paciência desde o início do mestrado.

Ao revisor da FAPESP, por todas as considerações feitas durante o mestrado.

À agência de fomento **FAPESP**, pela bolsa para realização do mestrado.

RESUMO

BRESSAN, S. **Polimorfismos no gene da Cu, Zn-superóxido dismutase, estado nutricional relativo ao Zn e estresse oxidativo em pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe**. São Paulo, 2010. Defesa de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

O zinco (Zn) é um mineral que participa de diversas funções biológicas no organismo. É necessário para cerca de 300 enzimas, dentre elas a enzima Cu, Zn - superóxido dismutase (SOD1) que desempenha ações importantes no controle do estresse oxidativo e no processo de carcinogênese. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene para a SOD1 poderiam favorecer o aumento do estresse oxidativo e o surgimento do câncer. Este trabalho tem como objetivo avaliar a influência dos SNPs A35C (rs 2234694) e G2809A (rs 4998557) no gene da SOD1 no risco do câncer da cavidade oral e orofaringe (Estudo I) e associação entre esses SNPs, estado nutricional relativo ao zinco e estresse oxidativo em pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe (Estudo II). No Estudo I incluíram-se 169 homens com câncer da cavidade oral e orofaringe (casos) e 181 homens sem a doença (controles). A distribuição da frequência dos genótipos para o SNP A35C, para o grupo caso, foi de 91% de AA, 8% de AC e 1% de CC. Em relação ao genótipo para o SNP G2809A, no grupo caso observaram-se 66% de GG, 29% de GA e 5% de AA, e no grupo controle observaram-se 62% de GG, 34% de GA e 4% de AA. No estudo II incluíram-se 29 homens com câncer da cavidade oral e orofaringe. O consumo alimentar de Zn foi de $10,02 \pm 4,81$ mg/dia [média $\pm$ desvio-padrão (dp)]. Observaram-se concentrações plasmáticas e eritrocitárias de Zn de $76,80 \pm 23,77$ µg/dL e $44,26 \pm 4,79$ µg/g de hemoglobina (média $\pm$ dp); atividade da SOD total no eritrócito de $1.629,57 \pm 675,25$ U/g de hemoglobina (média $\pm$ dp); concentrações plasmáticas de malondialdeído (MDA) de $1,65 \pm 0,58$ nmol/dL (média $\pm$ dp); concentração de ORAC de $2607,89 \pm 440,60$ µmol TE/L. O SNP G2809A parece não ter influência no risco no câncer da cavidade oral e orofaringe. Os dados sugerem pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe apresentam deficiência no estado nutricional relativo ao Zn e aumento do estresse oxidativo.

Palavras-chave: zinco, câncer de cabeça e pescoço, superóxido dismutase, polimorfismos, estado nutricional, estresse oxidativo, nutrigenômica.

ABSTRACT

BRESSAN, S. **Polimorfismos no gene da Cu, Zn-superóxido dismutase, estado nutricional relativo ao Zn e estresse oxidativo em pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe.** São Paulo, 2010. Defesa de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

Zinc (Zn) is a mineral with diverse biological functions. It is necessary for 300 enzymes, including Cu, Zn – superoxide dismutase (SOD1) that displays important roles in oxidative stress control and in carcinogenesis. Single nucleotide polymorphisms (SNP) in SOD1 gene could lead to increased oxidative stress and cancer development. We aimed at investigating the influence of the A35C (rs 2234694) and G2809A (rs 4998557) SNPs in SOD1 gene on oral and orofaryngeal cancer risk (Study I) and the association between these SNPs, Zn nutritional status and oxidative stress in oral and orofaryngeal cancer patients (Study II).

169 men with oral and orofaryngeal cancer (cases) and 181 men without the disease (controls) were included in Study I. Genotype frequency distribution for SOD1 A35C was the following: 91% AA, 8% AC and 1% CC (cases). Genotype frequency distribution for SOD1 G2809A was the following: 66% GG, 29% GA and 5% AA (cases) and 62% GG, 34% GA and 4% AA (controls). 29 men with oral and orofaryngeal cancer were included in Study II. Dietary Zn consumption was $10,02 \pm 4,8$ mg/day. Zn plasma and erythrocyte concentrations were $76,80 \pm 23,77 \mu\text{g/dL}$ and $44,26 \pm 4,79 \mu\text{g/g}$ hemoglobin; total SOD activity in the erythrocyte was $1.629,57 \pm 675,25$ U/g hemoglobin; malondialdehyde (MDA) plasmatic concentration was $1,65 \pm 0,58$ nmol/dL and ORAC was $2607,89 \pm 440,60 \mu\text{mol TE/L}$. SOD1 G2809A does not seem to increase oral and orofaryngeal cancer risk. Furthermore oral and orofaryngeal cancer patients seem to present deficiency in Zn nutritional status and increased oxidative stress.

Key-words: oral and orofaryngeal cancer, zinco, superoxide dismutase 1, polymorphisms, oxidative stress.

LISTA DE FIGURA

Figura1.	Esquema representativo dos mecanismos de absorção, distribuição para tecidos periféricos e excreção de zinco proveniente da dieta._____	18
Figura 2.	Representação da ação da enzima superóxido dismutase (SOD) que compõe a 1ª linha de defesa antioxidante contra ERO._____	20
Figura 3.	Sequência parcial de nucleotídeos do gene da SOD1, na qual a letra M representa a posição 35, onde ocorre a troca da base A por C._____	28
Figura 4.	Sequência parcial de nucleotídeos no gene da SOD1, na qual a letra R representa a posição 2809 onde ocorre a troca da base G por A._____	28
Figura 5.	Gel de agarose (1%) corado em brometo de etídio que apresenta amplificação de fragmento de 173 pb correspondente ao <i>amplicon</i> do gene SOD1 contendo o SNP A35C._____	41
Figura 6.	Gel de agarose (1%) corado em brometo de etídio que apresenta amplificação do fragmento de 221 pb correspondente ao <i>amplicon</i> do gene da SOD1 contendo o SNP G2809A._____	42
Figura 7.	Gel de agarose (2%) corado com gel red que apresenta o padrão de restrição de <i>amplicon</i> do gene SOD1 com a enzima HhaI._____	43
Figura 8.	Gel de agarose 2% corado com gel red que apresenta o padrão de restrição de <i>amplicon</i> do gene SOD1 com a enzima Cac8I._____	44
Figura 9.	Eletroferograma correspondente a paciente com câncer de cavidade oral e orofaringe classificado como homozigoto de referência para o polimorfismo G2809A no gene da SOD1._____	45
Figura10.	Eletroferograma correspondente a paciente com câncer de cavidade oral e orofaringe classificado como heterozigoto para o polimorfismo G2809A no gene da SOD1._____	46
Figura11.	Eletroferograma correspondente a paciente com câncer de cavidade oral e orofaringe classificado como homozigoto polimórfico para o polimorfismo G2809A no gene da SOD1._____	46
Figura12.	Distribuição percentual do IMC (Índice de Massa Corporal) de indivíduos adultos com câncer da cavidade oral e orofaringe, atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro._____	52

Figura13.	Distribuição percentual do IMC de indivíduos idosos com câncer de cavidade oral e orofaringe, atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro._____	53
Figura14.	Distribuição percentual dos pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro, de acordo com a adequação do consumo energético._____	55
Figura15.	Distribuição percentual dos pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro, de acordo com a adequação do consumo de Zn._____	55
Figura16.	Distribuição percentual do MDA de pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro_____	57
Figura17.	Distribuição percentual da SOD no eritrócito de pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro._____	58
Figura18.	Distribuição percentual de Zn plasmático de pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro.- _____	58
Figura19.	Distribuição percentual de Zn no eritrócito de pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro._____	59

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Sequências de *primers* utilizados para determinação do SNP A35C e G2809A no gene da SOD1 e tamanho do respectivo fragmento amplificado._ **29**
- Quadro 2.** Valores de referência das concentrações de Zn no plasma e eritrócito._____ **36**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição percentual de características sociais e demográficas de casos e controles._____	27
Tabela 2.	Distribuição da frequência do SNP A35C no gene da SOD1 em indivíduos do grupo caso, atendidos no Hospital Heliópolis, (n;%)._____	47
Tabela 3.	Distribuição do genótipo para o polimorfismo G2809A no gene da SOD1 de indivíduos dos grupos caso e controle, atendidos no Hospital Heliópolis, (n;%)._	47
Tabela 4.	Distribuição do genótipo para o polimorfismo <i>SOD1</i> G2809A nos grupos caso e controle, estratificados de acordo com a utilização de tabaco._____	48
Tabela 5.	Distribuição do genótipo para o polimorfismo <i>SOD1</i> G2809A nos grupos caso e controle, estratificados de acordo com a ingestão de álcool._____	49
Tabela 6.	Número e porcentagem de características sociais, demográficas e clínicas de casos com câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe._____	50
Tabela 7.	Parâmetros antropométricos de indivíduos com câncer da cavidade oral e orofaringe atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro._____	51
Tabela 8.	Valores da ingestão de energia, macronutrientes e zinco de indivíduos com câncer da cavidade oral e orofaringe, atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro._____	54
Tabela 9.	Concentrações de MDA, Zn e ORAC no plasma e atividade da SOD no eritrócito e Zn no eritrócito, em pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe, Hospital e Maternidade Celso Pierro._____	56
Tabela10.	Distribuição da frequência do SNP G2809A no gene da SOD 1 entre indivíduos do grupo caso, atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro._____	60
Tabela11.	Caracterização bioquímica e antropométrica dos Clusters (grupos) formados pela análise multivariada, de pacientes com câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe._____	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AMDR - *Acceptable macronutrient distribution range*

CAT - Catalase

CC - Circunferência da Cintura

CRIP's - Proteínas Intestinais Ricas em Cisteína

DNA - Ácido Desoxiribonucleico

DRI - *Dietary Reference Intake*

EAR - Necessidade Média Estimada

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio

GC - Gordura Corporal

GPX - Glutathione peroxidase

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IOM - *Institute of Medicine*

IMC - Índice de Massa Corpórea

QFA - Questionário de Frequência Alimentar

RNA - Ácido Ribonucléico

MDA - Malondialdeído

MT - Metalotioneína

ORAC - *Oxygen Radical Absorbance Capacity*

PCR-RFLP - *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*

PGH - Projeto Genoma Humano

RDA - *Recommended Dietary Allowance*

SNP - Polimorfismo de nucleotídeo único

SOD - Superóxido dismutase

Zn - Zinco

Znt - Zinc transporter

Zip - Zrt- and Irt-like proteins

UL - Upper Limit

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
2.1. ZINCO	16
2.2. ESTRESSE OXIDATIVO E PAPEL ANTIOXIDANTE DO ZINCO	19
2.3. POLIMORFISMOS NO GENE QUE CODIFICA PARA A ENZIMA SOD1.	21
2.4. ZINCO E CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO	22
3. OBJETIVOS	25
OBJETIVO GERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	26
4.1. ESTUDO I	26
4.1.1. SELEÇÃO DOS PACIENTES	26
4.1.2. DETERMINAÇÃO DOS POLIMORFISMOS A35C E G2809A NO GENE DA SOD1 EM CASOS E CONTROLES	30
4.1.3. DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO SOD1 G2809A POR SEQUENCIAMENTO	30
4.2. ESTUDO II	31
4.2.1. SELEÇÃO DOS PACIENTES	31
4.2.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	31
4.2.3. COLETA DE DADOS PESSOAIS E AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA	31
4.2.4. AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR	33
4.2.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	34
4.2.5.1. COLETA DE SANGUE	34
4.2.5.2. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICA E ERITROCITÁRIA DE ZN	34
4.2.5.2.1. CONCENTRAÇÃO DE ZN NO PLASMA	34
4.2.5.2.2. CONCENTRAÇÃO DE ZN NO ERITRÓCITO	35
4.2.5.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SOD	36
4.2.5.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE MDA	36
4.2.5.5. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO PLASMA PELA TÉCNICA DE ORAC (<i>OXYGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY</i>)	37
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5. RESULTADOS	40
5.1 ESTUDO I	40
5.1.1 ANÁLISE DO POLIMORFISMO A35C E G2809A NO GENE DA SOD1 EM PACIENTES COM CÂNCER DA CAVIDADE ORAL E OROFARINGE (CASOS) E SEM A DOENÇA (CONTROLES).	40
5.2 ESTUDO II	49
5.2.1 VARIÁVEIS SOCIAIS, DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DE PACIENTES COM CÂNCER DA CAVIDADE ORAL E OROFARINGE.	49
5.2.2. CLASSIFICAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL DE INDIVÍDUOS COM CÂNCER DA CAVIDADE ORAL E OROFARINGE DE ACORDO COM VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS.	51
5.2.3. CLASSIFICAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL DE INDIVÍDUOS COM CÂNCER DE CAVIDADE ORAL E OROFARINGE DE ACORDO COM O IMC.	52
5.2.4. CONSUMO ALIMENTAR, DE ACORDO COM O MÉTODO DO RECORDATÓRIO DE 24 HORAS, DE INDIVÍDUOS COM CÂNCER DE CAVIDADE ORAL E OROFARINGE.	53
5.2.5. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	56
5.2.6.DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO G2809A NO GENE DA SOD1 POR SEQUENCIAMENTO	60
5.2.7. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ANTROPOMÉTRICA DOS CLUSTERS FORMADOS PELA ANÁLISE MULTIVARIADA DE PACIENTES COM CÂNCER EPIDERMÓIDE DA CAVIDADE ORAL E OROFARINGE.	61
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8. ANEXOS	81

1. INTRODUÇÃO

O câncer é considerado um importante problema de saúde pública em todo o mundo, (GARÓFOLO et al., 2004), sendo causado por uma amplitude de fatores que modulam o processo de carcinogênese, tais como o estilo de vida, exposição ambiental a carcinógenos, suscetibilidade genética, estresse oxidativo e alimentação (KLAUNIG et al., 2004; KAYNAR et al., 2005; DURSUN et al., 2006; BENTZ, 2007).

A relação entre nutrição e câncer tem sido evidenciada na literatura, especialmente a partir das décadas de 1960 e 1970 (KEY et al., 2002). Estima-se que a dieta está relacionada com 35% a 55% dos casos de câncer em humanos (TAGHAVI et al., 2007; SINGH et al., 2008). Micronutrientes constituintes da dieta, como o zinco (Zn), podem apresentar ações relacionadas a modulação da carcinogênese, como no controle do estresse oxidativo, por exemplo (SLIWINSKI et al., 2009; GARAVELLO et al., 2009).

O Zn apresenta diversas funções no organismo humano, sendo divididas em estrutural, enzimática e reguladora. Participa como componente essencial para ação catalítica de cerca de 300 enzimas; além disso, merece destaque seu papel na regulação da expressão gênica (VALLEE et al., 1993; MAFRA & COZZOLINO, 2004; STEFANIDOU et al., 2006).

Por conferir função estrutural a proteínas antioxidantes, como a enzima superóxido dismutase 1 (SOD1), ou Cu-Zn,SOD, o Zn exerce importante papel no controle do estresse oxidativo, que por sua vez está relacionado com doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer (SUBAPRIYA et al., 2002; EIDE, 2006; TAYSI et al., 2008; SLIWINSKI et al., 2009).

A SOD1 desempenha função importante no processo de carcinogênese (YOKOE et al., 2009) e é considerada a primeira linha de defesa antioxidante contra o dano oxidativo, (BEEVI et al., 2004; DIMAYUGA et al., 2007). Merece destaque a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene que codifica a SOD1, tais como o SNP A35C e G2809A (FLEKAC et al., 2008; CEBRIAN et al., 2006). Apesar de serem restritas informações a respeito da consequência funcional desses polimorfismos, verificou-se que o SNP SOD1 A35C resultou em redução da atividade da enzima codificada em indivíduos saudáveis e diabéticos (FLEKAC et al., 2008), não existindo descrições similares em pacientes com câncer. O SNP SOD1 G2809A, por sua vez, foi avaliado apenas em pacientes com câncer de mama, observando-se que essa variação genética aumentou marginalmente o risco da doença (CEBRIAN et al., 2006; UDLER et al., 2007).

O câncer de cabeça e pescoço acomete o aparelho aerodigestivo superior e tem origem multifatorial, entre os quais se destacam o fator genético, estilo de vida, exposição a agentes carcinogênicos, como tabaco e álcool, e alimentação deficiente em micronutrientes antioxidantes, como o Zn (BUNTZEL et al., 2003; GUERRA et al., 2005; BOCCIA et al., 2008; ARGIRIS et al., 2008).

Estado nutricional deficiente relativo ao Zn foi correlacionado com tamanho aumentado e estágio avançado de tumores de cabeça e pescoço (PRASAD et al., 1998). Em pacientes com câncer de cavidade oral, um sistema de defesa antioxidante comprometido tornaria células da mucosa mais suscetíveis às ações deletérias de espécies reativas de oxigênio, favorecendo a progressão da doença (BEEVI et al., 2004). Pacientes com esse tipo de câncer apresentaram no plasma e eritrócito níveis aumentados do marcador de estresse oxidativo malondialdeído (MDA) e redução da atividade da enzima SOD1, quando comparados ao grupo controle de indivíduos sem a doença (MANOHARAN et al., 2005).

Apesar da importância do Zn no câncer de cabeça e pescoço, não se conhece o impacto dos polimorfismos A35C e G2809A na SOD1 no contexto da doença. Nesse sentido, este trabalho tem como objetivo avaliar a influência desses SNPs no gene da SOD1 no risco do câncer da cavidade oral e orofaringe (Estudo I) e associação entre esses SNPs, estado nutricional relativo ao zinco e estresse oxidativo em pacientes com esse câncer (Estudo II).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Zinco

O Zn é o segundo elemento-traço mais abundante no corpo humano, cuja essencialidade foi demonstrada na década de 1960 (PRASAD et al., 2007; WALKER et al., 2009). Apresenta diversas funções, que podem ser divididas em três categorias: estrutural, reguladora, e enzimática (VALLEE et al., 1993).

Este mineral participa da estrutura de enzimas e proteínas, bem como da estabilização de proteínas ligadas ao DNA. É um componente essencial para atividade de cerca de 300 enzimas, e contribui para ação catalítica de metaloenzimas dependentes de Zn, tais como a Cu, Zn-superóxido dismutase (Cu, Zn-SOD ou SOD1) e álcool desidrogenase. Atua na regulação da atividade neuronal e na memória, e está envolvido na estabilidade e expressão genética, pois participa da estrutura da cromatina, replicação e transcrição do DNA, através da atividade das enzimas DNA e RNA polimerase. Além disso, está envolvido no reparo do DNA e na apoptose celular (STEFANIDOU et al., 2006; HAMBIDGE & KREBS, 2007; SUN et al., 2007)

Este micronutriente participa do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. É essencial para a reprodução, crescimento, desenvolvimento, formação óssea, sistema imunológico e cicatrização. O organismo humano contém cerca de 1,5 a 2,5g de Zn presente em todos os órgãos, especialmente nos músculos, ossos, pele, cérebro, rins, fígado, pâncreas, coração, cabelo, próstata e plasma sanguíneo (MOCCHEGIANI & CONSORTIUM, 2008; HOGSTRAND et al., 2009).

Entre os alimentos considerados fontes de Zn destacam-se os produtos de origem animal, como as carnes vermelhas, fígado, ostras, ovos, caranguejo e carnes de aves que apresentam maior biodisponibilidade deste mineral quando comparado aos alimentos de origem vegetal. Vale destacar que a absorção de Zn é relativamente baixa e sujeita à influência de fatores fisiológicos e componentes dietéticos, tais como o fitato e o cobre que inibem a sua absorção, enquanto que a presença de proteína animal aumenta a absorção do mesmo (MAFRA & COZZOLINO, 2004; PERSON et al., 2006; DEVIRGILIIS et al., 2007).

As necessidades diárias de Zn são estabelecidas de acordo com a idade e o estágio de vida. Segundo o Institute of Medicine (IOM-FNB) (2001), para homens saudáveis e com idade acima de 19 anos, a ingestão dietética recomendada de zinco (RDA) é de 11 mg/dia e o limite superior tolerável (UL) para se evitar efeitos adversos é de 40 mg/dia.

A deficiência de Zn foi primeiramente descrita por Prasad et al., (1963) em meninos adolescentes com retardo do crescimento. Estima-se que sua prevalência na população mundial ultrapassa os 20%, acometendo mais de 2 bilhões de pessoas em países em desenvolvimento. Alguns fatores podem desencadear esta deficiência, tais como dieta deficiente em Zn ou com baixa biodisponibilidade do mineral, baixo consumo de alimentos de origem animal, dieta com alto teor de fitato, desnutrição, anemia falciforme, síndrome de má absorção, cirrose, doença renal crônica, infecções, alcoolismo, cirurgia e perda sanguínea (PRASAD, 1985; PRASAD, 2008; TUEK & FAZEL, 2009). De acordo com a gravidade, a deficiência de Zn pode afetar os sistemas nervoso central, gastrointestinal, esquelético, reprodutivo e imunológico, ocorrendo assim o retardo do crescimento, perda de peso, diminuição da função imune, diarreia, hipogonadismo, alopecia, anorexia e má absorção (WALKER & BLACK, 2004; TUEK & FAZEL, 2009).

Por outro lado, a fim de se evitar efeitos adversos provenientes do consumo excessivo de Zn, o valor de UL deve ser considerado (CUEVAS & KOIANAGI, 2005). Observou-se que doses muito altas, acima de 150 mg, resultaram em disfunção do sistema imunológico e sintomas clínicos como gosto metálico, náuseas e vômitos (CHARDRA, 1984; CUEVAS & KOIANAGI, 2005). Além disso, homens que consumiram mais de 100 mg/dia tiveram risco aumentado para o câncer de próstata (LEITZMANN et al., 2003).

A captação do Zn, orgânico ou inorgânico, ocorre na borda em escova do enterócito por mecanismos de difusão ativa ou passiva. Na presença de baixa concentração de Zn proveniente da dieta, ocorre aumento da capacidade de transportadores que agem como mediadores do processo de absorção, e a difusão passiva ocorre diante da alta ingestão do mineral. De forma geral cerca de 20 a 30% da quantidade ingerida é absorvida principalmente no intestino delgado, enquanto que no estômago e intestino grosso a absorção é bastante reduzida. O Zn é transportado ao fígado com auxílio da albumina. Deste órgão é distribuído para outros tecidos ligado à albumina, aminoácidos, ou α -2-macroglobulina (MAFRA & COZZOLINO, 2004; PERSON et al., 2006).

No interior da célula da mucosa intestinal, a homeostase de Zn é regulada por proteínas que se ligam a metais, como a metalotioneína (MT), uma proteína de baixo peso molecular que na presença de baixas concentrações de Zn libera o mineral de seu interior; e proteínas intestinais ricas em cisteína (CRIP's) que se ligam ao Zn exercendo o papel de carreadores celulares, aumentando assim a velocidade de absorção (Figura 1). Existe ainda uma grande família de transportadores de Zn, denominadas ZnT e Zip. Estes transportadores exercem funções opostas na homeostase celular, uma vez que os transportadores ZnT

reduzem o Zn intracelular, através do efluxo do mineral para fora da célula ou para o interior de organelas celulares, enquanto que os transportadores Zip aumentam o influxo celular de Zn e também promove a sua saída do interior de organelas para o citoplasma (COUSINS et al., 2006; SUN et al., 2007). O Zn não absorvido é excretado pelas fezes.

O estado nutricional relativo ao Zn pode ser analisado através das concentrações deste mineral no plasma sanguíneo, eritrócitos, saliva, glóbulos brancos, urina, pêlo, cabelo e atividade de metaloenzimas como anidrase carbônica, fosfatase alcalina e carboxipeptidases (HENRIQUES et al., 2003; SALIBA et al., 2006). Dentre os diversos biomarcadores para avaliação do estado nutricional relativo ao Zn, a concentração de Zn plasmático é uma medida bioquímica bastante utilizada e aceita, apesar de apresentar baixa sensibilidade por ser afetada por fatores fisiológicos. Assim, deve-se considerar outro biomarcador além da concentração plasmática, como o Zn no eritrócito que não reflete mudanças recentes e indica o estado nutricional relativo ao Zn de prazo mais longo (MAFRA & COZZOLINO, 2004; SALIBA et al., 2006).

Figura 1. Esquema representativo dos mecanismos de absorção, distribuição para tecidos periféricos e excreção de zinco proveniente da dieta (Adaptado de HENRIQUES et al., 2003). **Zn:** zinco, **TGI:** trato gastro intestinal, **MT's:** metalotioneínas, **CRIP's:** proteínas intestinais ricas em cisteína, **ZnT** e **ZIP:** transportadores de Zn.

2.2. Estresse oxidativo e papel antioxidante do zinco

O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre o sistema oxidante e antioxidante. O sistema oxidante é composto pelo aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Estas moléculas são instáveis, altamente reativas e danificam macromoléculas como carboidrato, lipídios, proteínas, DNA e também a membrana celular. Destaca-se que ainda não existe um marcador de estresse oxidativo validado como ideal, portanto, não há um consenso do melhor biomarcador a ser utilizado, porém, especificamente em relação a peroxidação lipídica, grande ênfase é dada ao malondialdeído (MDA). O MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica, e é um dos marcadores mais utilizados para determinação do estresse oxidativo no plasma humano (VASCONCELOS et al., 2007). Estresse oxidativo tem sido associado a diversas doenças como diabetes mellitus, aterosclerose, artrite reumatóide, doenças neurodegenerativas e câncer (PRASAD et al., 2009).

O sistema antioxidante abrange componentes enzimáticos, como a SOD, a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e antioxidantes não enzimáticos como a vitamina C, vitamina E, carotenóides e flavonóides (WARD, 2002; KOURY et al., 2003, KAYNAR et al., 2005; VALKO et al., 2006). Existem ainda diversos tipos de ensaios para se estimar a capacidade antioxidante do organismo. Dentre eles destaca-se o ORAC (*Oxygen-Radical Absorbancy Capacity*), deve-se ressaltar que este ensaio foi recentemente validado para uso em análises no plasma e soro por Prior et al., (2003). Caple e colaboradores (2010) observaram que indivíduos com dano no DNA apresentam capacidade antioxidante limitada e que o dano pode ser reduzido através de compostos antioxidantes provenientes da dieta.

A ação antioxidante do Zn está relacionada a diversos fatores. Este micronutriente é um componente estrutural da enzima antioxidante SOD1; exerce papel antagônico na atividade redox de metais de transição, como o cobre e ferro, que provocam a oxidação de grupos sulfidril de proteínas. Além disso, age na regulação do metabolismo da MT, uma proteína que desempenha importante atividade antioxidante e participa da homeostase do Zn (HO, 2004; MOCHEGANI & CONSORTIUM, 2008).

Além do papel antioxidante, o Zn pode ter ação antiinflamatória através da inibição do NF- κ B, um fator de transcrição pro inflamatório que está relacionado no desenvolvimento de doenças crônicas, como o câncer (SETHI et al., 2008; PRASAD, 2009).

A enzima SOD1 desempenha ação importante no processo de carcinogênese (YOKOE et al., 2009). Está presente no interior do citoplasma, compartimentos do núcleo e lisossomos das células de mamíferos. Seu gene localiza-se no cromossomo 21, na região 21q22 (ZELCO et al., 2002, MIAO & CLAIR, 2009). É considerada a primeira linha de defesa do sistema antioxidante contra as EROs, (Figura 3) e tem como função catalisar a conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio que ao final é dissociado em água e oxigênio pelas enzimas GPx e CAT, transformando assim, uma espécie altamente reativa em uma forma menos nociva às células (BEEVI et al., 2004; DIMAYUGA et al., 2007; YOKOE et al., 2009).

Figura 2. Representação da ação da enzima superóxido dismutase (SOD) que compõe a 1ª linha de defesa antioxidante contra ERO (Adaptado de CEBRIAN et al., 2006). $O_2^{\cdot -}$: radical superóxido, SOD: superóxido dismutase, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, CAT: catalase, GPX: glutatona peroxidase, GSSG: glutatona oxidada, GSR: glutatona redutase, GSH: glutatona reduzida, H_2O : água.

Além da SOD1 existem ainda, a SOD2, dependente de manganês e encontrada na mitocôndria, e a SOD3, dependente de ferro e localizada no meio extracelular (ZELKO et al., 2002; JOHNSON & GIULIVI, 2005). A SOD1 é o membro mais abundante dessa família de enzimas antioxidantes, representando cerca de 90% do total de SODs (NOOR et al., 2002). Deficiências dietéticas de Cu, Zn e Mn associaram-se à redução da atividade de SOD e aumento do dano oxidativo (FANG et al., 2002). Observou-se em células tumorais redução da atividade das enzimas SOD1 e SOD2 (OBERLEY, 2001). Em outro estudo observou-se redução na expressão da SOD1 no epitélio com invasão tumoral quando comparado ao tecido

não acometido (PIYATHILAKE et al., 2002). Elucidou-se *in vitro* o efeito protetor da super expressão da SOD1 no tratamento dos efeitos colaterais da radiação (VELDWIJK et al., 2009).

2.3. Polimorfismos no gene que codifica para a enzima SOD1.

A amplitude de estudos que hoje são direcionados para o entendimento da interação entre o genoma humano e o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer, teve seu início em 1953, quando James Watson e Francis Crick elucidaram a estrutura da molécula do ácido desoxirribonucleico (DNA). Com esta descoberta, em conjunto com a conclusão do projeto genoma humano (PGH) iniciou-se em 2003 uma verdadeira revolução na área do conhecimento humano (FARAH, 2007).

Entre os objetivos alcançados com o término do PGH destaca-se a determinação do número de genes no genoma humano estimado entre 30.000 e 35.000 genes, antes previsto em 100.000 genes. Observou-se também que a sequência do DNA apresenta similaridade de 99,9% entre os seres humanos. Esta diferença de 0,1% se deve à presença de variações, entre elas os polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism*-SNP; pronunciam-se “snips”). Estas variações envolvem apenas um par de base (pb) do DNA e ocorrem aproximadamente a cada 300 pb. Estima-se a presença de 10 milhões de SNPs no total de 3 bilhões de pb existentes no genoma humano. Ao final do PGH cerca de 3,7 milhões de SNPs foram mapeados, o que possibilitou a identificação de genes associados a doenças, como o câncer, a doença cardiovascular e o diabetes mellitus (FARAH, 2007).

De forma geral, os SNPs podem ser definidos como alterações genéticas presentes em mais de 1% da população e podem ocorrer em sequências não codificadoras, não tendo provavelmente efeito sobre a função da proteína. Em sequências codificadoras, podem resultar em proteínas com alterações, tais como diminuição da expressão ou atividade de proteínas, e assim possibilitar o aparecimento de doenças e do próprio câncer (LIMA et al., 2006). Destaca-se a presença de SNPs no gene que codifica a SOD1, tais como o SNP A35C e o SNP G2809A (FLEKAC et al., 2008; CEBRIAN et al., 2006). Observou-se maior prevalência do SNP *SOD1* A35C em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 em comparação aos indivíduos controle, sem a doença. Nesse caso, esse SNP esteve associado à redução da atividade da enzima SOD1 (FLECAK et al., 2008).

No contexto do câncer, ainda são poucos os estudos em que se avaliou o impacto de polimorfismos nesse gene (CEBRIAN et al., 2006; UDLER et al., 2007). Assim, por exemplo, observou-se que o SNP *SOD1* G2809A esteve marginalmente associado ao risco de câncer de mama (CEBRIAN et al., 2006). Por outro lado, polimorfismos na *SOD1* não influenciaram a sobrevida de pacientes com esse mesmo câncer (UDLER et al., 2007).

Sugere-se que variações genéticas nos genes relacionados com o estado redox poderiam modular o risco para o câncer da cavidade oral. Deste modo, alguns polimorfismos genéticos poderiam aumentar o risco para o câncer (WU et al., 2010).

2.4. Zinco e câncer de cabeça e pescoço

Grande interesse tem sido voltado para o Zn como fator protetor contra o câncer (FRANKLIN & COSTELLO, 2007; SILVEIRA & ROHAN, 2007; SLIWINSKI et al., 2009). As ações anticarcinogênicas desse mineral envolvem diferentes mecanismos, como inibição da proliferação celular e angiogênese, indução da apoptose, manutenção da integridade do DNA e prevenção para formação de radicais livres (STEFANIDOU et al., 2006; FRANKLIN & COSTELLO, 2007). Dietas deficientes em Zn poderiam elevar o estresse oxidativo e dano no DNA, aumentando o risco de desenvolvimento do câncer (HO, 2004).

O câncer é considerado um importante problema de saúde pública devido à elevada prevalência e aumento constante da mortalidade por esta doença (GARÓFOLO et al., 2004). No mundo, o câncer é responsável por uma em cada oito mortes, e segundo relatos da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC/OMS), o número de casos novos mais que duplicou nos últimos 30 anos (STRATTON et al., 2009; World Cancer Report, 2008). Somente no Brasil as estimativas para 2010 apontam para a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer, sendo esperados 236.240 casos no sexo masculino e 253.030 para o sexo feminino (INCA, 2010).

O surgimento do câncer está relacionado com alguns fatores, tais como aumento da expectativa de vida da população, industrialização, exposição a agentes cancerígenos, suscetibilidade genética, dieta e estresse oxidativo (KLAUNIG et al., 2004; BENTZ, 2007; DURSUN et al., 2006). Estes fatores atuam no processo de carcinogênese modulando as

etapas de iniciação, promoção e progressão do câncer (FREITA et al., 2005; KAYNAR et al., 2005).

O câncer de cabeça e pescoço acomete todo o aparelho aerodigestivo superior, especificamente as regiões dos seios paranasais, cavidade nasal, cavidade oral, laringe e faringe (ARGIRIS et al., 2008). Cerca de 40% dos tipos de câncer de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade oral, 15% na faringe e 25% na laringe. O tipo histológico mais frequente, em 90% dos casos, é o carcinoma de células escamosas ou espinocelular, (BISELLI et al., 2006; CHISHOLM et al., 2007, HADDAD et al., 2008; ALVARENGA et al., 2008).

No mundo, constitui a sexta causa de morte por câncer e é responsável por mais de 500.000 casos novos e cerca de 350.000 mortes todo ano. A taxa de sobrevida para este câncer é de cinco anos em 40 a 50%, para os casos com diagnóstico precoce (AN et al., 2007; WERBROUCK et al., 2008; GOON et al., 2009). No Brasil, a incidência do câncer de cavidade oral estimada para o ano de 2010 é de 10.330 casos novos para homens e 3.790 casos novos para mulheres (INCA, 2010).

O câncer de cabeça e pescoço tem origem multifatorial ocasionada pela suscetibilidade genética que se relaciona com modificações do estilo de vida da população, exposição a agentes carcinogênicos, podendo ser físicos, químicos e biológicos. Além disso, a alimentação pouco saudável, como o baixo consumo de frutas e hortaliças, por exemplo, pode ter um papel importante na etiologia desta neoplasia (GUERRA et al., 2005; BOCCIA et al., 2008).

O consumo de tabaco, álcool e dietas deficientes em micronutrientes antioxidantes, tem sido associado ao aparecimento de tumores da cavidade oral e orofaringe (BIDOLI et al., 2003; BEEVI et al., 2004; FREEDMAN et al., 2007). Estudos epidemiológicos mostram que o risco de desenvolvimento do câncer oral é de 5 a 9 vezes maior em tabagistas do que em não tabagistas, sendo diretamente proporcional a quantidade consumida. O etilismo é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer das vias aerodigestivas superiores e potencializa a ação do tabaco (FORASTIERE et al., 2001). Também está descrita a associação entre a condição socioeconômica e o aparecimento do tumor (BREEN et al., 2001).

A deficiência de Zn tem sido associada ao câncer de cabeça e pescoço (PRASAD et al., 1998; YADAV et al., 2002; BUNTZEL et al., 2003). Comparados com controles, pacientes com diferentes tipos de câncer apresentam estado nutricional relativo ao Zn comprometido (PRASAD & KUCUK, 2002).

Estado nutricional deficiente em Zn foi correlacionado com tamanho aumentado e estágio avançado de tumores de cabeça e pescoço (PRASAD et al., 1998). Observou-se em pacientes com câncer de cabeça e pescoço que a suplementação com Zn diminuiu a gravidade de dermatites e mucosite causada pela radioterapia (LIN et al., 2006).

Em pacientes com câncer da cavidade oral, um sistema de defesa antioxidante comprometido tornaria células da mucosa mais suscetíveis às ações deletérias de EROs, criando ambiente mais favorável para danos no DNA e progressão da doença (BEEVI et al., 2004). Aumento dos níveis plasmáticos de marcadores de estresse oxidativo, como o MDA, hidroperóxidos lipídicos e redução da atividade eritrocitária da SOD foram observados em pacientes do grupo caso quando comparado a indivíduos controle (BEEVI et al., 2004). A suplementação de pacientes idosos saudáveis com Zn resultou na diminuição de marcadores de estresse oxidativo e citosinas inflamatórias quando comparado ao grupo placebo (PRASAD et al., 2008). Entretanto, ainda, não é claro, o benefício da suplementação nutricional com objetivo de redução do estresse oxidativo em pacientes com câncer (BEEVI et al., 2004).

Em comparação a indivíduos saudáveis, pacientes com câncer da cavidade oral apresentaram no plasma e eritrócito níveis aumentados de MDA, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, e redução na atividade da enzima SOD1 (MANOHARAN et al., 2005). Além disso, observou-se aumento do estresse oxidativo e diminuição da atividade dessa enzima antioxidante em pacientes com tumores bucais de estágio II a IV (MANOHARAN et al., 2005).

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar a influência dos polimorfismos A35C e G2809A no gene da enzima antioxidante SOD1 no risco de câncer de cabeça e pescoço, especificamente da cavidade oral e orofaringe;
- Avaliar em pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe, associação entre estado nutricional relativo ao Zn, polimorfismo G2809A no gene da enzima SOD1 e estresse oxidativo;

Objetivos específicos

- Avaliar o consumo alimentar de Zn em pacientes com câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe;
- Avaliar a atividade da enzima antioxidante SOD em pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente projeto de mestrado é constituído de dois estudos. O **Estudo I**, caso-controle, tem como enfoque verificar a influência dos polimorfismos A35C e G2809A no gene para enzima antioxidante SOD1 no risco de câncer da cavidade oral e orofaringe. O **Estudo II**, caso-caso, tem como enfoque verificar a associação entre estado nutricional relativo ao Zn, polimorfismos A35C e G2809A no gene SOD1 e estresse oxidativo, em pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe. Os **Estudos I e II** foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em 20/10/2008 (protocolo 481 - CAAE 0048.0.264.018-08 - Anexo 1) e do Hospital Heliópolis em 09/12/2008 (protocolo CEP: 657 – Anexo 2). O **Estudo II** também foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital e Maternidade Celso Pierro em 04/02/2009 (protocolo 908/08) (Anexo 3).

4.1. Estudo I

4.1.1. Seleção dos pacientes

Para avaliar a influência de polimorfismos no gene para a enzima antioxidante SOD1 no risco do câncer da cavidade oral e orofaringe, foram utilizadas, após autorização do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis (protocolo CEP: 657), amostras de DNA genômico previamente extraídas de pacientes com esse câncer (grupo caso) e de indivíduos sem câncer (grupo controle), armazenadas no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis.

O grupo caso foi composto por 169 pacientes, do gênero masculino, com diagnóstico de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe, acompanhados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis a partir do ano de 2001, integrantes de parte da casuística do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço. O seguimento dos pacientes foi realizado por equipe multidisciplinar de acordo com a rotina estabelecida no serviço, garantindo um seguimento mínimo de 24 meses após o tratamento inicial. Os registros dos prontuários médicos dos pacientes estão disponibilizados no site do projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço: <http://ctc.fmrp.usp.br/ClinicalGenomics/appSP/> e incluem informações clínicas, bem como epidemiológicas abrangentes quanto aos fatores de risco relacionados à doença, que incluem

tabagismo e etilismo, não havendo, entretanto, informações sobre consumo alimentar. O grupo controle incluiu 181 indivíduos, do gênero masculino pareados por idade, internados nas enfermarias do Hospital Heliópolis, sem neoplasias ou histórico clínico de neoplasia ou com internação relacionada a tratamento de doenças relacionadas ao consumo de álcool e tabaco, doenças ocupacionais ou imunodeficiências. As informações sociais e demográficas dos casos e controles estão apresentadas na Tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significativa para as variáveis faixa etária e etnia entre os grupos caso e controle. No entanto, observou-se prevalência estatisticamente significativa maior ($p < 0,05$) de tabagismo e etilismo no grupo caso quando comparado ao grupo controle.

Tabela 1. Distribuição percentual de características sociais e demográficas de casos e controles.

Variável	Caso (169) n (%)	Controles (181) n (%)	Total n (%)	<i>p</i>
Faixa etária				
< 40	5 (3)	9 (5)	14 (4)	0,796
40 - 49	48 (28)	55 (30)	103 (29)	
50 - 59	63 (37)	64 (36)	127 (36)	
60 - 69	40 (24)	37 (20)	77 (23)	
≥ 70	13 (8)	16 (9)	29 (8)	
Etnia				
Branco	108 (64)	101 (55)	209 (60)	0,270
Indio	0 (0)	1 (1)	1 (1)	
Mulato	41 (24)	52 (29)	93 (26)	
Negro	15 (9)	24 (13)	39 (11)	
NA*	5 (3)	3 (2)	8 (2)	
Tabagismo				
Nuca fumou	2 (1)	27 (15)	29 (8)	0,001
Somente no passado	25 (15)	62 (34)	87 (25)	
Sim ainda fuma	136 (81)	91 (50)	227 (65)	
NA*	6 (3)	1 (1)	7 (2)	
Etilismo				
Nunca bebeu	8 (5)	28 (15)	36 (10)	0,001
Somente no passado	47 (28)	70 (38)	117 (33)	
Sim ainda bebe	108 (64)	82 (46)	191 (55)	
NA*	6 (3)	1 (1)	7 (2)	

* Não Avaliado

4.1.2. Determinação dos polimorfismos A35C e G2809A no gene da SOD1 em casos e controles

O SNP A35C (rs2234694) ocorre na posição 35 que se situa adjacente ao sítio de *splicing* na junção entre o éxon 3 e intron 3 do gene da SOD1 e resulta na substituição de uma adenina por uma citosina (Figura 3).

```
TCACTGTGGCTGTACCAAGGTGTTGCTTATCCCAGAAGTCGTGATGCAGGTCAGCACTTTCTCCATGGGA
AGTTTTAGCAGTGTTTCTTTTAGAATGTATTTGGGAACTTTAATTCATAATTTAGCTTTTTTTTCTTCT
TCTTATAAATAGGCTGTACCAGTGCAGGTCCTCACTTTAATCCTCTATCCAGAAAACACGGTGGGCCAAA
GGATGAAGAGAGGTAACAAGATGCTTAACTCTTGTAAATAATGGCCMTAGCTTTCTGGAGTTCATATGGTA
TACTACTTGTAATATGTGCTAAGATAATTCCGTGTTTCCCCCACCTTTGCTTTTGAAGTGTGACTCA
TCTAAACCCCTGCTCCCAAATGCTGGAATGCTTTTACTTCCTGGGCTTAAAGGAATTGACAAATGGGGAC
ACTTAAACGATTTGGTTTTGTAGCATTTATTGAATATAGAATAATAACAAGTGCCAAAGGGGAACATAAT
ACAGGAAATGTCATGAACAGT
```

Figura 3. Sequência parcial de nucleotídeos do gene da SOD1, na qual a letra M representa a posição 35, onde ocorre a troca da base A por C.

O SNP G2809A (rs4998557) ocorre na posição 2809 no íntron 1 do gene da SOD1 e resulta na substituição de uma guanina por uma adenina (Figura 4).

```
AAAGAACCTGCTGTTTTTGGCCCTGTGCTCTTGATAACAGAGTGTTTGAGGGACAACCTTT
CACATTTGAGTTTTTCCAAAATTAAAGGTTGTAGAAGAGTCACAGTATCTATTGTCAAAA
AGAAAAGAATTTAAAAAGGCAGCAATTGCCAGGATACTTCATTTGAGCAATGATATTTTC
CAGTGGAAGTCACATCTTAAGGGTTAATGCCCTTAACTGTTGGCCGTATTTGAAAACA
AACCAGCTAAAAACAAGAGACACTGACATGTTGTATGACGGTGTGGTGTGGATGTTGTG
TTTATTTTAGTCCTGAGATCTAGTTGTAACCTCCTTGATTTCTGTATGTAGCCACGGAGC
ACCATACCTGTCACCATTACCTGAATGGCTATACTGCTTRCTTTTCATTTTGGTAGAGTG
GAAAGGTTACCTAGGTTTCAGTGCTTGAAAAGATTTTCAGAAAGCAGTAGTACGTCTGGTT
AGACTAGAATCAGTCCTCTCCTGGGGGCAGTGGAATATAATATTTTCTGACTGCTAATTA
AAAATACCTGTGATAGCCGGGCGTGGTGGCTTACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGG
CCGAGACGGGTGGATCACGAGGTCAGCAGATGGAGACCATCCTGGCTAACACGGTGAAAC
CCCGTCTCTACTAAAAATGCAAAAAAATTAGCCGGGTGTGGTGGTGGGCGCCTGTAGTCC
CAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCATGAACCTGGGAGGCGGAGCTTGCAGT
GAGCCGAGATCATGTCACTGC
```

Figura 4. Sequência parcial de nucleotídeos no gene da SOD1, na qual a letra R representa a posição 2809 onde ocorre a troca da base G por A.

Para a determinação dos polimorfismos em questão utilizou-se a técnica de PCR-RFLP. Para tanto, utilizaram-se *primers* (Invitrogen®) específicos (Quadro 1) desenhados com base na sequência de referência dos SNPs (rs 2234694-A35C e 4998557-G2809A) e na sequência do gene SOD1 de humanos, obtidas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2009). O reconhecimento do gene da SOD1 pelos *primers* foi verificado no programa computacional *Basic Local Alignment Search Tool*, BLAST, da mesma base de dados do NCBI.

Polimorfismo	<i>Primer</i> direto	<i>Primer</i> reverso	Fragmento
SOD1 A35C	5'-AGGCTGTACCAGTGCAGGTC-3'	5'-GGGGGAAACACGGAATTATC-3'	173 pb
SOD1 G2809A	5'-CTGTATGTAGCCACGGAGCA-3'	5'-GCCCCGGCTATCACAGGTAT-3'	221 pb

Quadro 1. Sequências de *primers* utilizados para determinação do SNP A35C e G2809A no gene da SOD1 e tamanho do respectivo fragmento amplificado.

Na reação de PCR, para volume final de 25 µl utilizaram-se 12,5 µl de master mix, (Fermentas®), 0,75 µl de solução de DNA genômico na concentração de 20 a 200 ng, 0,75 µl do *primer* direto, 0,75 µl do *primer* reverso e 10,25 µl de água *nuclease free* (Fermentas®).

Para verificar a presença de eventual contaminação, em todos os lotes de reação de PCR realizou-se controle negativo, que conteve os mesmos reagentes necessário para reação, porém, sem a adição de DNA genômico.

A reação de PCR foi conduzida em um termociclador geneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem®) sob as seguintes condições: desnaturação por 5 minutos a temperatura de 94°C, 35 ciclos (0,45 minuto a 94°C, 0,30 minutos a 60°C para o anelamento dos *primers* e 0,30 minuto a 72°C para extensão), extensão final por 7 minutos a 72°C e finalização da reação a 4°C.

O genótipo de cada paciente foi obtido através da digestão do produto de PCR com enzima de restrição específica para cada SNP. Para o SNP A35C, amostras do produto de PCR foram digeridas com a enzima de restrição HhaI *Fast Digest* (Fermentas®). O alelo polimórfico, mas não o de referência, apresenta sítio de restrição para esta enzima. Dessa forma, a geração de fragmentos de 105 e 68 bp indica genótipo homozigoto polimórfico. A presença de fragmento de 173 bp indica genótipo homozigoto de referência, enquanto que a

presença de fragmentos de 173, 105 e 68 bp indica genótipo heterozigoto. A reação de digestão dos produtos de PCR ocorreu nas seguintes condições: 1µl de enzima HhaI, 8µl de produto de PCR, 2µl de Buffer e 9µl de água *nuclease free*. Todos os reagentes foram adicionados a tubos para PCR. A digestão ocorreu em termociclador geneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem®) à temperatura de 37°C, por 30 minutos.

Para o SNP G2809A, utilizou-se a enzima de restrição Cac8I (New England Bio Labs®). O alelo de referência, mas não o polimórfico, apresenta sítio de restrição para esta enzima. Dessa forma, a geração de fragmentos de 163 e 58 bp indica genótipo homozigoto de referência. A presença de fragmento de 221 bp indica genótipo homozigoto polimórfico, enquanto que a presença de fragmentos de 221, 163 e 58 bp indica genótipo heterozigoto. A reação de digestão dos produtos de PCR ocorreu nas seguintes condições: 0,3 µl de enzima Cac8I, 8µl de produto de PCR, 1,5µl de Buffer 4 e 5,2 µl de água *nuclease free*. Todos os reagentes foram adicionados a tubos de polipropileno para PCR. Em seguida, adicionou-se 1 gota de óleo mineral a cada tubo. A digestão ocorreu em banho *termomixer* (Eppendorf) a temperatura de 37°C, por 16 horas. Ao final da reação, elevou-se a temperatura a 65°C, por 20 minutos, para inativar a enzima de restrição.

Realizou-se a visualização do resultado de cada digestão por meio gel de agarose a 2%, contendo o corante gel *red* (Invitrogen®) em tampão TAE 1X.

4.1.3. Determinação do polimorfismo SOD1 G2809A por sequenciamento

Por meio de sequenciamento, confirmaram-se os resultados obtidos pela técnica de PCR- RFLP referente ao genótipo para o SNP G2809A de indivíduos dos grupos caso e controle (10% dos indivíduos homozigotos de referência, 10% dos heterozigotos e todos os considerados homozigotos polimórficos). Amostras de DNA foram submetidas à reação de PCR, de acordo com as mesmas condições descritas no item 5.1.2. Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se kit comercial (*Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* – Promega®). Para sequenciamento das amostras de DNA, utilizaram-se 5 µl de produto purificado e 2,5 µl do *primer* direto, na concentração de 5 pmoles/µl. Essa análise foi conduzida pelo Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, utilizando-se o aparelho de sequenciamento ABI 3730 DNA Analyser, com tecnologia da

Applied Biosystems® (E.U.A). Os resultados obtidos foram apresentados em eletroferograma, visualizados através do programa computacional *Chromas*.

4.2. Estudo II

4.2.1. Seleção dos pacientes

Selecionaram-se 29 pacientes com carcinoma epidermóide da cavidade oral e orofaringe, atendidos no ambulatório do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital e Maternidade Celso Pierro da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, localizado em Campinas - SP.

4.2.2. Critérios de Inclusão e Exclusão

Incluíram-se no **Estudo II** indivíduos do gênero masculino com idade a partir de 40 anos, com diagnóstico de carcinoma epidermóide da cavidade oral e orofaringe, sem tratamento prévio. Excluíram-se indivíduos com uso de suplemento vitamínico mineral, com diabetes mellitos ou doença renal. Todos os participantes receberam informações sobre a finalidade da pesquisa e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 4 e 5).

4.2.3. Coleta de dados pessoais e avaliação antropométrica

Aplicou-se questionário (Anexo 6) sobre identificação pessoal, idade, etnia, escolaridade, hábito de tabagismo e/ou etilismo. Para a variável tabagismo levou-se em consideração o número de cigarros (convencionais e de palha) consumidos e o período de tempo relatado pelo participante, posteriormente calculou-se a quantidade de tabaco em gramas por dia. Expressou-se o consumo de tabaco pelo número de maços vs ano (pack year- quantidade de tabaco consumido, dividido por 20, que corresponde a 1 maço, e multiplicado pelo período de consumo em anos). Apresentou-se o consumo de álcool em gramas de álcool

ingerido por dia. Para tanto se considerou o teor alcoólico e os tipos de bebida alcoólica consumidos pelos indivíduos.

Para classificação do estágio clínico da doença, utilizou-se como referência a classificação de tumores malignos TNM da União Internacional Contra o Câncer (UICC) de 2004.

Na avaliação antropométrica obtiveram-se dados como peso, altura, circunferência da cintura, dobras cutâneas do bíceps, tríceps, supra-íliaca e sub-escapular e porcentagem de gordura corporal.

A aferição do peso foi realizada com auxílio de balança calibrada, com capacidade máxima de 150 kg e subdivisões de 100 g. Posicionou-se o participante no centro da plataforma, em posição ereta, com o peso distribuído em ambos os pés, descalço e com roupas leves. Aferiu-se a altura dos indivíduos com o auxílio de estadiômetro com haste móvel, com acurácia de 0,5cm e altura máxima de 2,0 metros. O participante permaneceu em pé, descalço, com os calcanhares unidos, cabeça ereta, olhos na linha do horizonte e braços estendidos ao lado do corpo.

Aferiu-se a circunferência da cintura com uma fita métrica inelástica, com o participante em pé, com os pés unidos, a cintura despida e os braços estendidos e relaxados. Considerou-se com risco elevado de complicações metabólicas associadas à obesidade o paciente com valores ≥ 94 cm e com risco muito elevado o paciente com valores ≥ 102 cm (OMS, 1998).

O valor do Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado dividindo-se o peso atual em quilogramas pela estatura em metros elevada ao quadrado, peso/estatura^2 (kg/m^2), tendo como classificação, para homens adultos, desnutrição grau III (IMC menor que 16), desnutrição grau II (IMC de 16 a 16,9), desnutrição grau I (IMC de 17 a 18,4), eutrofia (IMC de 18,5 a 24,9), pré-obeso (IMC de 25 a 29,9), obesidade grau I (IMC de 30 a 34,9), obesidade grau II (IMC 35 a 39,9) e obesidade grau III (IMC maior ou igual a 40) (OMS, 1995). Para homens idosos, utilizou-se a classificação de eutrofia para IMC de 24 a 29 (LIPSCHITZ, 1994).

Para determinação da composição corporal, aferiram-se quatro dobras cutâneas (tricipital, bicipital, subescapular e supra-íliaca) nos participantes. Com a soma destas dobras foi utilizada a equação de Durnin e Womersley (1974) que leva em consideração a idade e gênero do indivíduo para o cálculo da densidade corpórea. A porcentagem de gordura corporal (%GC) total foi determinada a partir da fórmula de Siri. Os valores de referência utilizados para homens foram: risco de doenças e distúrbios associados à desnutrição (porcentagem de gordura corporal menor ou igual a 5), abaixo da média (porcentagem de

gordura corporal de 6 a 14), média (porcentagem de gordura corporal de 15), acima da média (porcentagem de gordura corporal de 16 a 24) e risco de doenças associadas a obesidade (porcentagem de gordura corporal maior ou igual a 25) (LOHMAN et al., 1991).

4.2.4. Avaliação do consumo alimentar

Os participantes do estudo II também tiveram analisado seu consumo alimentar, utilizando-se o método de recordatório de 24 horas de dois dias (Anexo 7) não consecutivos. Destaca-se que foram analisados somente dois dias do consumo alimentar, pois os participantes selecionados apresentaram dificuldade de fala no momento do questionamento. Além disso, é acredita-se que para alguns dos participantes, o consumo alimentar não apresentaria grande variação entre um dia e outro, por apresentarem grande dificuldade e dor para mastigação e deglutição, como consequência da localização do tumor na cavidade oral e orofaringe.

A composição da dieta consumida em relação a macro e micronutrientes foi avaliada com o auxílio do software NutWin, da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo. A avaliação da adequação do consumo de energia pelos participantes foi realizada segundo recomendações do IOM (2005). Nesse caso, o valor de energia recomendado para homens leva em consideração a idade, atividade física, peso e estatura e é calculado pela seguinte fórmula $\{662 - [9,53 \times \text{idade (a)}] + \text{coeficiente de atividade} \times [15,91 \times \text{peso (kg)} + 539,6 \times \text{estatura (m)}]\}$. Para avaliação da adequação do consumo de macronutrientes considerou-se a ingestão dietética de referência (DRI - *Dietary Reference Intakes*), sendo utilizada a faixa de distribuição aceitável de macronutrientes (AMDR – *Acceptable Macronutrient Distribution Range*) recomendada para proteína de 10 a 35%, 20 a 35% para lipídios e 45 a 65% para carboidratos. Para avaliar a prevalência de inadequação da ingestão de Zn, utilizou-se a necessidade média estimada, (EAR-*Estimated average requirement*), que é de 9,4 mg Zn/dia (IOM, 2001; IOM, 2005). Os valores da ingestão de zinco foram ajustados pela energia segundo o método residual proposto por Willet (1998).

4.2.5. Análises Bioquímicas

4.2.5.1. Coleta de sangue

Antes de iniciar a coleta de amostra biológica dos participantes do **Estudo II**, os materiais como ponteiras para pipetas, tubos de polipropileno, vidraria e tubos falcon utilizados para coleta de sangue e processamento do mesmo foram desmineralizados em ácido nítrico a 20%.

Amostras únicas de 20 mL de sangue foram colhidas no período da manhã, estando os indivíduos em jejum de 12h, sendo 12 mL de sangue coletado em tubo com o anticoagulante EDTA, e 8 mL de sangue coletado com o anticoagulante citrato. O sangue foi coletado com seringas plásticas descartáveis e agulhas de aço inoxidável, estéreis e descartáveis. Em seguida distribuído em tubos distintos para as diferentes análises.

A partir do sangue total coletado com EDTA, 2 mL foram utilizados para análise do polimorfismo G2809A no gene SOD1. Do restante, foi realizada a separação do sangue total para obtenção do plasma e eritrócito, destinados à quantificação da concentração de Zn, atividade da SOD1 e concentração de MDA.

O plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 3000 x g durante 15 minutos a 4°C, extraído com pipeta automática, acondicionado microtubos de polipropileno, sendo a seguir conservado em ultrafreezer a -80°C. Após este procedimento, a massa eritrocitária obtida do sangue total foi lavada três vezes com 5 mL de solução salina a 0,9%, homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos (SORVALL® RC5C) a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. Após a última centrifugação, a solução salina foi aspirada e a massa de eritrócito cuidadosamente extraída com micropipeta, sendo colocada em microtubos desmineralizados, e acondicionados à -80°C.

4.2.5.2. Determinação das concentrações plasmática e eritrocitária de Zn

4.2.5.2.1. Concentração de Zn no plasma

A determinação da concentração de Zn no plasma foi realizada, no laboratório de Nutrição e Minerais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo,

por meio do método de espectrofotometria de absorção atômica de chama, proposto por Rodriguez et al., (1989). O Tritizol® (MERCK) foi utilizado como padrão. Uma curva padrão de Zn foi preparada utilizando as seguintes concentrações: 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1,0 µg/mL, diluídas em água ultrapura, Mili-Q® e glicerol a 3%.

Três alíquotas de cada amostra de plasma foram preparadas, diluindo-se em água ultrapura na proporção 1:3 e aspiradas na chama do espectrofotômetro de absorção atômica, marca HITACHI, modelo Z5000. Os resultados calculados a partir das absorbâncias obtidas foram expressos em µg/dL, representando a média das concentrações das amostras preparadas em triplicatas e comparados com o valor de referência para Zn plasmático (Quadro 2).

4.2.5.2.2. Concentração de Zn no eritrócito

A determinação de Zn no eritrócito foi feita, no laboratório de Nutrição e Minerais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por espectrofotometria de absorção atômica de chama, de acordo com metodologia proposta por Whitehouse et al., (1982). Utilizou-se como padrão o Tritizol® (MERCK), o qual foi preparado por diluição em água ultrapura nas seguintes concentrações: 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5 µg/mL.

Uma alíquota de 400 µL de massa de eritrócito foi diluída 40 vezes em água ultrapura. Esta diluição foi feita em duas etapas denominadas de lisado 1 e 2, correspondentes, respectivamente, a uma primeira diluição de alíquota de 400 µL na proporção de 1:4; e a uma segunda diluição na qual foram pipetados em triplicata 450 µL do lisado 1, diluídos novamente na proporção de 1:10. Após homogeneização, as amostras de lisado 2 foram aspiradas no mesmo aparelho espectrofotômetro de absorção atômica.

Determinou-se a concentração de hemoglobina das amostras a partir do lisado 1. Uma alíquota de 20 µL deste lisado foi diluída em 5 mL de solução de Drabkin para determinação da hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina (VAN ASSENDELFT, 1972). Os resultados foram expressos em µg de Zn/g de hemoglobina (Hb) e comparados com o valor de referência para Zn eritrocitário (Quadro 2).

Quadro 2. Valores de referência das concentrações de Zn no plasma e eritrócito.

Parâmetro bioquímico	Valor de referência
Eritrócito	40 - 44 µg Zn/g Hb ¹
Plasma	70 - 110 µg/dL ²

Fonte: 1 – GUTHRIE e PICCIANO, 1994.

2 – RODRIGUEZ et al., 1989.

4.2.5.3. Determinação da atividade enzimática da SOD

A determinação da atividade da enzima SOD foi realizada no eritrócito, no laboratório de análises clínicas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, através da metodologia proposta por SUN et al., (1988), utilizando-se kit disponível comercialmente (Ransod; Randox®). Esta análise consistiu-se de duas etapas, sendo primeiramente adicionado 0,1 mL da amostra de massa eritrocitária em um tubo contendo 0,9 mL de solução tampão fosfato (lisado 1). Posteriormente 0,1 mL da solução do lisado 1 foi adicionada em um outro tubo contendo 2,9 mL de tampão fosfato, com volume total de 3 mL, obtendo-se o lisado 2. Em seguida realizou-se a leitura das amostras, utilizando-se o analisador bioquímico Lysis®. Determinou-se a concentração de hemoglobina conforme item 5.2.5.2.2. que foi utilizada para se expressar os resultados referentes à atividade da SOD total no eritrócito. Considerou-se o valor de referência encontrado por Manoharan et al., (2005), um estudo conduzido em pacientes, do sexo masculino e da mesma faixa etária, com câncer da cavidade oral.

4.2.5.4. Determinação da concentração plasmática de MDA

A concentração de MDA no plasma foi determinada, no laboratório de Química e Bioquímica de produtos animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por meio da sua separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como descrito por Cheng, Wu, e Huang (2008), com modificações. Derivatizou-se o MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), levando-se em conta que 1 mol de MDA reage com 2 moles de TBA, em meio ácido, formando um aduto (TBA-MDA). Realizou-se a derivatização em tubos com tampa de rosca, nos quais para cada 50 µL de plasma adicionaram-se 25µL de hidroxitolueno butilado (BHT) 1% em etanol, 250 µL de TBA 39,9 mM, 425 µL de água

ultrapura e 750 µL de ácido fosfórico. A seguir, agitaram-se os tubos por 10 segundos no vórtex e aqueceram-se os mesmos em banho-maria a 100°C, por uma hora. Seguida à derivatização pelo calor, as amostras foram resfriadas em banho de gelo. Transferiram-se, então, 500 µL para um eppendorff. Subsequentemente, adicionaram-se 400 µL de metanol-grau HPLC e 100 µL de NaOH 1 M para a extração do complexo MDA-TBA. Os microtubos foram centrifugados a 14.000 x g por 5 minutos, sendo o sobrenadante transferido para o respectivo vial.

A análise cromatográfica foi realizada em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Agilent Technologies 1200 series - USA) conectado a um computador. O conjugado MDA-TBA (20 µL) foi injetado em uma coluna analítica de fase reversa Phenomenex C18 (250 mm x 4.6 mm; 5 mm – Phenomenex, USA) com pré-coluna LC8-D8 (Phenomenex AJ0-1287 – USA) e quantificado fluoremetricamente a uma excitação de 515 nm e emissão de 543 nm. A taxa de fluxo da bomba foi 1,0 mL/min com fase móvel constituída de 60% tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6.0 e 40 % metanol.

Preparou-se uma curva de calibração utilizando-se malondialdeído – MDA (Fluka 63287) nas concentrações de 0,5 a 5,0 µmol. A partir da equação da reta gerada por essa curva, realizou-se o cálculo da concentração de MDA nas amostras de plasma. A cada corrida feita no HPLC, preparou-se o branco com água ultrapura e um controle externo constituído pelo MDA (Fluka 63287), na concentração de 5 µmol.

4.2.5.5. Determinação da capacidade antioxidante do plasma pela técnica de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

Analizou-se a capacidade antioxidante do plasma através da técnica de ORAC, conforme descrito por Prior et al. (2003), que estima a habilidade do plasma de resistir ao dano oxidativo, refletindo os efeitos combinados de todos os antioxidantes do plasma.

Transferiu-se uma alíquota de 100µl de plasma para um microtubo e adicionou-se 200 µl de etanol e 100 µl de água ultrapura seguida da adição de 400 µl de hexano e posterior agitação. A mistura foi mantida em repouso por 1-2 minutos ou até que as duas camadas se separassem e então foi centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm (Hitachi, CF-15R). Retirou-se a camada de hexano e transferiu-se para outro microtubo. Adicionou-se 400 µl de hexano ao tubo original para realizar uma nova extração, com agitação e centrifugação por 5 minutos a

14000 rpm. A camada de hexano foi removida e os extratos combinados foram concentrados com nitrogênio gasoso para preparação da porção lipofílica. À porção hidrofílica que restou após as extrações com hexano, adicionou-se 400 µl de ácido perclórico 0.5 M para precipitação das proteínas. Centrifugou-se a amostra por 5 min a 14000 rpm.

Para análise da porção lipofílica do plasma, a amostra foi ressuspensa em 250 µl de acetona e diluída com 750 µL de solução de β-ciclodextrina a 7%, seguida de nova diluição na proporção de 1:4. Alíquotas de 25 µl das amostras diluídas foram pipetadas em uma microplaca de 96 poços. A cada poço injetou-se automaticamente 150 µL de solução de fluoresceína 40 nM, seguida de incubação por 30 minutos e então injetou-se 25 µl de solução AAPH 153 nM e realizou-se a leitura. Para análise da porção hidrofílica, diluiu-se o extrato na proporção de 1:10 em tampão fosfato 75 mM, pH 7. Alíquotas de 25 µl das amostras diluídas foram pipetadas em uma microplaca. As soluções de fluoresceína e AAPH foram adicionadas como descrito no ensaio lipofílico. A placa foi agitada por 10 segundos após cada injeção. Avaliou-se a intensidade da fluorescência fluorimetricamente com comprimento de onda de emissão de 528/20 nm e excitação de 485/20 nm a cada 60 segundos, durante 1 hora em um leitor de microplacas (Multi-Detection microplate reader, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT).

Preparou-se uma curva de calibração utilizando uma solução de Trolox nas faixas de concentração de 6,5 a 50 µmol/l para o ensaio lipofílico e de 6,5 a 100 µmol/l para o ensaio hidrofílico. Calcularam-se os valores finais de ORAC das amostras utilizando-se a equação de regressão entre a concentração de Trolox e a área abaixo da curva de decaimento da fluoresceína, calculada pelo software do equipamento (Gen 5TM, BIOTEK, Winooski, VT). Os resultados foram expressos em µmol de Trolox equivalente por litro de amostra (µmol TE/L).

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

No **Estudo I** utilizou-se o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) para o teste Qui-quadrado realizado para verificar a distribuição do polimorfismo SOD1 G2809A entre indivíduos do grupo caso e controle, bem como para verificar se a mesma encontrava-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Calculou-se o *Odds Ratio* (OR) para avaliar associação entre o genótipo da SOD1 e risco de desenvolvimento de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe e também levou-se em consideração a ingestão de álcool e o consumo de tabaco.

Para o **Estudo II** verificou-se a associação entre estado nutricional relativo ao Zn, polimorfismo G2809A no gene SOD1 e estresse oxidativo em pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe. Os resultados obtidos de variáveis quantitativas foram expressos como média $\pm$ DP, enquanto que resultados observados a partir de variáveis categóricas foram expressos como % de frequência. Análise multivariada de clusters foi aplicada com objetivo de agrupar os pacientes de acordo com as variáveis quantitativas e categóricas. Essa análise foi realizada com base nas medidas de similaridade, a partir de dados previamente normalizados adotando-se a distância Euclideana e o método de Ward para agrupamento. As variáveis foram submetidas à análise de correlação linear (Pearson) para identificar o sentido das associações sugeridas na análise de cluster. Teste T para variáveis independentes foi aplicado no tratamento das médias observadas nos dois clusters formados. Na ocorrência de desvios de normalidade, o teste de Mann Withney foi aplicado em lugar do Teste T. Um valor de probabilidade (p) menor que 5% foi adotado como significativo. O software Statistica v.9.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) foi utilizado para todos os tratamentos estatísticos realizados neste estudo.

5. RESULTADOS

5.1 Estudo I

5.1.1 Análise do polimorfismo A35C e G2809A no gene da SOD1 em pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe (casos) e sem a doença (controles).

Para análise dos polimorfismos A35C e G2809A no gene SOD1 padronizou-se a técnica de PCR-RFLP. Verificou-se a amplificação de *amplicons* com tamanhos previstos de 173 pb (A35C) e 221 pb (G2809A) com ausência de contaminação nas reações de PCR (Figuras 5 e 6).

A Figura 7 apresenta o padrão de restrição de *amplicons* do gene SOD1 com a enzima HhaI. O SNP A35C resulta na substituição de uma adenina por uma citosina na posição 35 do gene da SOD1. A presença de um único fragmento de 173 pb indica genótipo homozigoto de referência para o SNP. A presença de três fragmentos, um de 173 pb, e outros dois de 105 pb e 68 pb, indica genótipo heterozigoto. A presença de dois fragmentos, um de 105 pb e outro de 68 pb indicaria genótipo homozigoto polimórfico.

A Figura 8 apresenta o padrão de restrição de *amplicons* do gene SOD1 com a enzima. Cac8I. O SNP G2809A resulta na substituição de uma guanina por uma adenina na posição 2809 do gene da SOD1. A presença de um único fragmento de 221 pb indica genótipo homozigoto polimórfico para o SNP. A presença de três fragmentos, um de 221 pb, e outros dois de 163 pb e 58 pb, indica genótipo heterozigoto. A presença de dois fragmentos, um de 163 pb e outro de 58 pb indica genótipo homozigoto de referência.

Figura 5. Gel de agarose (1%) corado em brometo de etídio que apresenta amplificação de fragmento de 173 pb correspondente ao *amplicon* do gene SOD1 contendo o SNP A35C. **M:** marcador de 100 pb; 1, 2, 3, 4 e 5 fragmento amplificado (**FA**) de 173 pb; 6 e 7: controles negativos (**CN**).

Figura 6. Gel de agarose (1%) corado em brometo de etídio que apresenta amplificação do fragmento de 221 pb correspondente ao *amplicon* do gene da SOD1 contendo o SNP G2809A. **M:** marcador de 100 pb; 1, 2, 3, 4 e 5 fragmento amplificado (**FA**) de 221 pb; 6 e 7: controles negativos (**CN**).

Figura 7. Gel de agarose (2%) corado com gel red que apresenta o padrão de restrição de *amplicon* do gene SOD1 com a enzima HhaI. **M:** marcador de 50 pb; **1 e 2:** a presença de fragmentos de 173 pb e 105 pb indica genótipo heterozigoto (**AC**) para o polimorfismo A35C (o fragmento previsto de 68 pb não foi visualizado no gel); **3 a 11:** a presença de um único fragmento de 173 pb indica genótipo homozigoto de referência (**AA**) para o polimorfismo A35C.

Figura 8. Gel de agarose 2% corado com gel red que apresenta o padrão de restrição de *amplicon* do gene SOD1 com a enzima Cac8I. **M:** marcador de 50 pb; **1 e 2:** a presença de fragmentos de 163 pb e 58 pb indica genótipo homozigoto de referência (**GG**) para o polimorfismo G2809A; **3, 4, 5 e 6:** a presença de fragmentos de 221 pb, 163 pb e 58 pb indica genótipo heterozigoto (**GA**); **7:** a presença de um único fragmento de 221 pb indica genótipo homozigoto polimórfico (**AA**) para o polimorfismo G2809A.

Todos os indivíduos classificados como homozigotos para o polimorfismo G2809A no gene da SOD1, pela técnica de PCR-RFLP, tiveram seu genótipo confirmado por sequenciamento. No caso daqueles classificados como homozigotos de referência ou heterozigoto, 10% dos resultados foram confirmados também por sequenciamento. Houve 100% de concordância entre os resultados obtidos pelas 2 técnicas de genotipagem. As Figuras 9, 10 e 11 apresentam exemplos de eletroferogramas correspondentes aos genótipos homozigoto de referência, heterozigoto e homozigoto para o polimorfismo G2809A no gene da SOD1, respectivamente.

Figura 9. Eletroferograma correspondente a paciente com câncer de cavidade oral e orofaringe classificado como homozigoto de referência para o polimorfismo G2809A no gene da SOD1.

Figura 10. Eletroferograma correspondente a paciente com câncer de cavidade oral e orofaringe classificado como heterozigoto para o polimorfismo G2809A no gene da SOD1.

Figura 11. Eletroferograma correspondente a paciente com câncer de cavidade oral e orofaringe classificado como homozigoto polimórfico para o polimorfismo G2809A no gene da SOD1

A Tabela 2 apresenta a distribuição do genótipo para o polimorfismo *SOD1* A35C no grupo caso, de pacientes com câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe.

Tabela 2. Distribuição da frequência do SNP A35C no gene da *SOD1* em indivíduos do grupo caso, atendidos no Hospital Heliópolis, (n;%).

Polimorfismo	Genótipo	Caso	
		n	(%)
A35C	AA	107	(91)
	AC	10	(8)
	CC	1	(1)
	AC + CC	11	(9)
	Total	118	(100)

De acordo com a Tabela 2 observou-se frequência reduzida do polimorfismo *SOD1* A35C. Dessa forma, optou-se por restringir essa análise apenas a 118 pacientes, visto que a análise da totalidade de casos (169) não deveria mudar o resultado obtido e seria insuficiente para se estimar associação entre o SNP em questão e o risco de câncer da cavidade oral e orofaringe.

A Tabela 3 apresenta a distribuição para o genótipo *SOD1* G2809A nos grupos caso e controle.

Tabela 3. Distribuição do genótipo para o polimorfismo G2809A no gene da *SOD1* de indivíduos dos grupos caso e controle, atendidos no Hospital Heliópolis, (n;%).

Genótipo	Caso n (%)	Controle n (%)	Total n (%)	OR*	IC** 95%	p
GG	111 (66)	113 (62)	224 (64)			
GA	49 (29)	61 (34)	110 (31)	1,09	0,710 - 1,689	
AA	9 (5)	7 (4)	16 (5)	1,25	0,802 - 1,943	0,3633
GA e AA	58 (34)	68 (38)	126 (36)	1,25	0,801 - 1,947	0,1923
Total	169 (100)	181 (100)	350 (100)			

*Odds Ratio ** Intervalo de confiança

De acordo com a Tabela 3 observou-se que não houve associação entre o polimorfismo *SOD1* G2809A e o risco de desenvolvimento de câncer da cavidade oral e orofaringe, visto que a distribuição do polimorfismo entre os grupos não apresentou diferenças estatisticamente significante ($p > 0,05$). A distribuição do genótipo nos grupos caso e controle esteve em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

A Tabela 4 apresenta a distribuição do genótipo para o polimorfismo *SOD1* G2809A nos grupos caso e controle, estratificados de acordo com a utilização de tabaco. Não se observou associação entre o SNP e o risco de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe em pacientes que consumiam mais ou menos que 20 *pack years*.

Tabela 4. Distribuição do genótipo para o polimorfismo *SOD1* G2809A nos grupos caso e controle, estratificados de acordo com a utilização de tabaco.

Tabagismo (<i>Pack year</i>)	<i>SOD1</i> G2809A	Caso* n	Controle** n	OR***	IC**** 95%	p
≤ 20	GG	60	56			
	GA + AA	27	26	1,3975	0,7267 - 2,6877	0,2008
> 20	GG	48	37			
	GA + AA	26	34	1,2017	0,6332 - 2,2806	0,3452

*De um total de 169 indivíduos do grupo caso, 2 relataram nunca ter fumado e 6 não informaram a quantidade de utilização de tabaco. ** De um total de 181 indivíduos do grupo controle, 27 relataram nunca ter fumado e 1 não informou a quantidade de utilização do tabaco. ****Odds Ratio* **** Intervalo de confiança

A Tabela 5 apresenta a distribuição do genótipo para o polimorfismo *SOD1* G2809A nos grupos caso e controle, estratificados de acordo com a ingestão de álcool. Não se observou associação entre o SNP e o risco de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe em pacientes que consumiam mais ou menos que 80 g de etanol por dia.

Tabela 5. Distribuição do genótipo para o polimorfismo *SOD1* G2809A nos grupos caso e controle, estratificados de acordo com a ingestão de álcool.

Etilismo (g etanol / dia)	SOD1 G2809A	Caso n	Controle n	OR*	IC** 95%	p
≤ 80	GG	57	52			
	GA + AA	20	30	1,5588	0,7865 - 3,0895	0,1348
> 80	GG	50	41			
	GA + AA	28	29	1,4555	0,7457 - 2,8413	0,1757

*De um total de 169 indivíduos do grupo caso, 8 relataram nunca ter bebido e 6 não informaram a quantidade de ingestão de álcool. ** De um total de 181 indivíduos do grupo controle, 28 relataram nunca ter bebido e 1 não informou a quantidade de ingestão de álcool. ****Odds Ratio* **** Intervalo de confiança

5.2 Estudo II

5.2.1 Variáveis sociais, demográficas e clínicas de pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe.

Após a seleção de indivíduos com câncer da cavidade oral e orofaringe, realizou-se a coleta de dados sociais, demográficos e de diagnóstico clínico (Tabela 6). Da amostra de 29 indivíduos homens incluídos no estudo, observou-se uma predominância do grupo etário de 50 a 59 anos. Em relação à variável etnia, houve maior proporção de indivíduos brancos. Observou-se que 66% dos participantes consumiam mais de 80 g de álcool/dia. Em relação ao tabagismo 69% dos indivíduos consumiam quantidade igual ou superior a 20 *pack years* e 41% dos indivíduos consumiram por 35 anos ou mais. Houve maior prevalência do tumor localizado na orofaringe, 55%. Finalmente o estadiamento do tumor mostrou que a maioria, 62%, dos indivíduos são diagnosticados com estágio avançado.

Tabela 6. Número e porcentagem de características sociais, demográficas e clínicas de casos com câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe

Variáveis	n	%
Faixa Etária		
30-39	2	7
40-49	7	24
50-59	8	28
60-69	7	24
70-79	3	10
80-89	2	7
Etnia		
branco	20	69
negro	9	31
Etilismo (g de etanol/dia)		
≤ 80	9	31
≥ 80	19	66
NI*	1	3
Período de Etilismo (Anos)		
0 I- 25	10	34
25 I- 35	8	29
≥ 35	10	34
NI*	1	3
Tabagismo (pack year)		
≤ 20	8	28
≥ 20	20	69
NI*	1	3
Período de Tabagismo (Anos)		
0 I- 25	8	28
25 I- 35	8	28
≥ 35	12	41
NI*	1	3
Localização do Tumor		
Cavidade Oral	11	38
Orofaringe	16	55
NI*	2	7
Estadio do Tumor		
I	2	7
III	1	3
IV	18	62
NI*	8	28

NI* Não Informado

5.2.2. Classificação do estado nutricional de indivíduos com câncer da cavidade oral e orofaringe de acordo com variáveis antropométricas.

A Tabela 7 apresenta os valores de média, desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo dos parâmetros antropométricos IMC, %GC e CC. O valor do IMC para adultos encontrou-se na faixa classificada como eutrofia. No caso dos pacientes idosos, verificaram-se valores de IMC abaixo da classificação de eutrofia. Para ambos os grupos, a CC encontrou-se dentro dos valores de normalidade. Os valores de média e mediana da % de GC para ambos os grupos se encontraram acima da faixa de normalidade.

Tabela 7. Parâmetros antropométricos de indivíduos com câncer da cavidade oral e orofaringe atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro.

Parâmetro	Média $\pm$ DP	Mediana (Min. - Máx.)	Valor de Referência
Adulto (n = 17)			
IMC (kg/m ²)	23,8 $\pm$ 3,8	23,8 (19,3 - 34,8)	18,5 a 24,9
% GC	20,8 $\pm$ 5,7	21,4 (12,6 - 30,6)	14,0 a 16,0
CC (cm)	91,4 $\pm$ 11,4	91,5 (77,0 - 123,0)	< 94,0
Idoso (n = 12)			
IMC (kg/m ²)	22,7 $\pm$ 5,9	20,5 (12,0 - 31,9)	24,0 a 29,0*
% GC	20,6 $\pm$ 8,4	16,9 (12,6 - 35,3)	14,0 a 16,0**
CC (cm)	92,5 $\pm$ 17,6	88,5 (73,0 - 118,0)	< 94,0***

* Não foi possível coletar os dados de IMC de 1 paciente

**Não foi possível coletar os dados de %GC de 3 pacientes

***Não foi possível coletar os dados de CC de 4 pacientes

IMC – Índice de Massa Corporal para adulto - (OMS, 1995); e idoso – (LIPSCHITZ, 1994).

% GC – Porcentagem de Gordura Corporal (LOHMAN *et al.*, 1991).

CC – Circunferência da Cintura (OMS, 1998).

5.2.3. Classificação do estado nutricional de indivíduos com câncer de cavidade oral e orofaringe de acordo com o IMC.

As Figuras 12 e 13 apresentam o estado nutricional dos participantes do **Estudo II**, segundo o IMC. No caso dos indivíduos adultos houve maior prevalência de eutrofia, o que indica normalidade do peso em relação à estatura. Isso não foi observado no grupo de indivíduos idosos, que apresentou maior prevalência de baixo peso.

Figura 12. Distribuição percentual do IMC de indivíduos adultos com câncer da cavidade oral e orofaringe, atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro. N = 17, **IMC**: Índice de Massa Corporal

Figura 13. Distribuição percentual do IMC de indivíduos idosos com câncer de cavidade oral e orofaringe, atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro. De um total de 12 indivíduos 1 não foi possível obter a informação. **IMC:** Índice de Massa Corporal

5.2.4. Consumo alimentar, de acordo com o método do recordatório de 24 horas, de indivíduos com câncer de cavidade oral e orofaringe.

De acordo com o inquérito alimentar por meio do recordatório de 24 horas (Tabela 8), a proporção de consumo dos macronutrientes encontrou-se dentro da faixa de AMDR, de acordo com o IOM, 2005. Além disso, embora o consumo médio de Zn tenha sido adequado, ao se analisar os valores mínimos e máximos, constata-se que alguns indivíduos apresentavam deficiência do micronutriente na dieta.

Tabela 8. Valores da ingestão de energia, macronutrientes e zinco de indivíduos com câncer da cavidade oral e orofaringe, atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro.

Nutrientes	Média $\pm$ DP	Mediana (Min. - Máx.)	Valor de Referência
Energia (Kcal)	1481,82 $\pm$ 895,37	1314,5 (221 - 3255)	De acordo com EER
Carboidrato (%)	55,53 $\pm$ 13,28	56,71 (20,5 - 82,71)	45 a 65 **
Proteína (g/Kg/dia)	0,94 $\pm$ 0,48	0,45 (0,15 - 1,95)	0,66 ***
Lipídio (%)	26,05 $\pm$ 9,80	24,4 (4,93 - 46,25)	20 a 35 **
Zinco (mg/dia)	10,02 $\pm$ 4,81	8,79 (1,62 - 30,64)	9,4 ***

* (N = 11). Não foi possível coletar os dados de consumo alimentar de um paciente.

** Fonte: AMDR

*** Fonte: EAR

De um total de 29 indivíduos, não foi possível coletar os dados de consumo de 2 indivíduos

Verificou-se a adequação do consumo de energia ingerida através do cálculo da EER (IOM, 2005). De acordo com a Figura 14, a maioria dos participantes do estudo apresentou consumo energético superior ao recomendado de 90 a 110%, porém uma proporção relevante dos indivíduos apresentou-se abaixo do limite inferior. Além disso, de acordo com a Figura 15, observou-se uma proporção de aproximadamente 63% de deficiência de Zn proveniente do consumo alimentar dos indivíduos com câncer da cavidade oral e orofaringe.

Figura 14. Distribuição percentual dos pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro, de acordo com a adequação do consumo energético. Do total de 29 pacientes, não foi possível coletar os dados de 2 pacientes.

Figura 15. Distribuição percentual dos pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro, de acordo com a adequação do consumo de Zn. Do total de 29 pacientes, não foi possível coletar os dados de 2 pacientes. **Zn:** zinco

5.2.5. Parâmetros bioquímicos

A Tabela 9 apresenta os resultados referentes às concentrações de MDA no plasma, de Zn no plasma e eritrócito, à concentração de ORAC no plasma e à atividade de SOD no eritrócito. Observou-se que os pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe apresentaram em média valores acima de 1 $\mu\text{mol/L}$ de MDA, assim como descrito em indivíduos saudáveis (DEL RIO et al., 2005).

Apesar do valor médio da concentração de Zn plasmático se encontrar dentro da faixa de referência, observou-se deficiência desse mineral em alguns pacientes. Resultados semelhantes foram constatados em relação às concentrações de Zn e atividade de SOD no eritrócito. Todos os pacientes apresentaram valores da concentração de ORAC plasmático acima do valor esperado para indivíduos saudáveis.

Tabela 9. Concentrações de MDA, Zn e ORAC no plasma e atividade da SOD no eritrócito e Zn no eritrócito, em pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe, Hospital e Maternidade Celso Pierro.

Parâmetro	Média $\pm$ DP	Mediana (Min. - Máx.)	Valor de Referência
Plasma			
MDA (nmol/dL)	1,65 $\pm$ 0,58	1,42 (0,73 - 3,27)	1 (nmol/dL) ¹
Zn ($\mu\text{g/dL}$)	76,80 $\pm$ 23,77	77,88 (40,64 - 138,79)	70 - 110 ($\mu\text{g/dL}$) ²
ORAC ($\mu\text{mol TE/L}$)	2607, 89 $\pm$ 440,70	2511,98 (1942,55 - 3543,22)	1807 ($\mu\text{mol TE/L}$) ³
Eritrócito			
SOD (U/gHb)	1629,57 $\pm$ 675,25	1599,25 (755,87 - 4488,64)	2290 $\pm$ 0,17 (U/g Hb) ⁴
Zn ($\mu\text{g/g Hb}$)	44,26 $\pm$ 4,79	40,03 (23,17- 69,36)	40 - 44 ($\mu\text{g Zn/g Hb}$) ⁵

MDA: malondialdeído; Zn: zinco; ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity; SOD: superóxido dismutase;

Fonte: 1 - DEL RIO et al., 2005.

2 - RODRIGUEZ, 1989.

3 - PRIOR et al., 2003.

4 - MANOHARAN, et al., 2005.

5 - GUTHRIE e PICCIANO, 1994.

As Figuras 16, 17, 18 e 19 apresentam o valor percentual dos parâmetros bioquímicos analisados no **Estudo II**. Observa-se que 96% dos indivíduos apresentaram valores elevados de MDA. O contrário ocorreu em relação à atividade da SOD no eritrócito, 96% dos indivíduos apresentaram redução quando comparado ao valor de referência para indivíduos saudáveis. Da mesma forma, na análise do Zn no eritrócito, 44% dos indivíduos apresentaram-se abaixo do valor de referência. Em relação ao Zn plasmático constataram-se valores dentro da normalidade.

Figura 16. Distribuição percentual do MDA de pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro, N = 29. **MDA:** malondialdeído.

Figura 17. Distribuição percentual da SOD no eritrócito de pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro, N = 27. **SOD:** superóxido dismutase.

Figura 18. Distribuição percentual de Zn plasmático de pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro, N = 29. **Zn:** zinco.

Figura 19. Distribuição percentual de Zn no eritrócito de pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro, N = 27. **Zn:** zinco.

5.2.6. Determinação do polimorfismo G2809A no gene da SOD1 por sequenciamento

A Tabela 10 apresenta a distribuição da frequência do genótipo para o SNP G2809A no gene da SOD 1 entre os indivíduos com câncer da cavidade oral e orofaringe do **Estudo II**. Dentre o total de indivíduos selecionados, 56% apresentaram genótipo homozigoto de referência, 33% apresentaram genótipo heterozigoto e 11% apresentaram genótipo homozigoto de referência para o polimorfismo G2809A. Considerando-se a baixa frequência do polimorfismo A35C no gene da SOD1, e frente ao número limitado de pacientes no **Estudo II**, optou-se por nesse estudo seguir apenas com a análise do SNP G2809A.

Tabela 10. Distribuição da frequência do SNP G2809A no gene da SOD 1 entre indivíduos do grupo caso, atendidos no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro.

Polimorfismo	Genótipo	(Casos n = 27)	
		n	%
G2809A	GG	15	56
	GA	9	33
	AA	3	11
	GA + AA	12	44

De um total de 29 indivíduos, não foi possível obter o genótipo de 2 indivíduos.

5.2.7. Caracterização bioquímica e antropométrica dos clusters formados pela análise multivariada de pacientes com câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe.

Observando-se a tabela 11 pode-se perceber que entre os dois *clusters* (grupos), formados pela análise multivariada, houve diferença estatisticamente significativa para todos os parâmetros avaliados no plasma e eritrócito. Não foi observado diferença estatisticamente significativa para as variáveis do consumo alimentar e do consumo de etanol. E em relação aos parâmetros antropométricos observou-se diferença estatisticamente significativa para a variável circunferência da cintura.

Tabela 11. Caracterização bioquímica e antropométrica dos *Clusters* (grupos) formados pela análise multivariada, de pacientes com câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe.

Variáveis	Clusters ¹		p
	1	2	
Plasma			
MDA (nmol/dL)	2,05 ± 0,64	1,46 ± 0,28	0,0180
ORAC (µmol TE/L)	2793,50 ± 452,36	2414,80 ± 340,15	0,0381
Zinco (µg/dL)	58,59 ± 10,25	95,60 ± 22,63	0,0001
Eritrócito			
Zinco (µg/g Hb)	51,23 ± 10,96	38,64 ± 3,01	0,0058
SOD (U/gHb)	1255,19 ± 373,41	1979,83 ± 859,93	0,0038
Consumo Alimentar			
Energia	1355,60 ± 707,74	1704,60 ± 958,31	0,3428
Zinco (mg/dia)	9,96 ± 4,91	9,30 ± 4,50	0,5993
Consumo de etanol			
Etilismo (g/dia)	0,63 ± 0,50	0,81 ± 0,40	0,4905
Parâmetro Antropométrico			
IMC (kg/m2)	21,13 ± 2,17	24,39 ± 4,48	0,0385
CC (cm)	85,71 ± 7,94	92, 54 ± 14,04	0,1758

¹Média ± Desvio Padrão

6. Discussão

O Zn é um micronutriente que age como co-fator para enzimas de defesa antioxidante, como a SOD1 que é considerada a primeira linha de defesa no controle do estresse oxidativo (HO, 2004). A deficiência de Zn tem sido relacionada com o aumento do estresse oxidativo em pacientes com câncer (MANOHARAN et al., 2005; PRASAD, 2009). Além disso, polimorfismos em genes de enzimas envolvidas no controle redox do organismo, tais como a SOD1, GPx e CAT, poderiam modular o desenvolvimento do câncer (CEBRIAN et al., 2006; HARTH et al., 2008). Nesse sentido o Zn tem sido alvo de estudos que relacionam esta interação gene-nutriente com doenças crônicas como o câncer (SLIWINSKI ET al., 2009).

No presente estudo, aventou-se a hipótese de que SNP's no gene da SOD1 tais como o A35C e G2809A poderiam resultar em menor atividade da enzima, aumentando assim o estresse oxidativo no organismo e resultar no aumento do risco para o câncer da cavidade oral e orofaringe.

Estudos em que avaliaram a consequência funcional dos SNP's em questão são escassos na literatura, especialmente quando relacionados ao desenvolvimento do câncer (FLEKAC et al., 2008; CEBRIAN et al., 2006; UDLER et al., 2007). De forma inédita avaliou-se no **Estudo I** a possível influência dos SNP's A35C e G2809A no gene da enzima SOD1 para o risco do câncer da cavidade oral e orofaringe.

No estudo realizado por Flekac et al. (2008) em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2, observou-se maior frequência do SNP *SOD 1* A35C quando comparado aos indivíduos controle, sendo que o mesmo esteve associado à redução da atividade da enzima. Verificou-se a partir do **Estudo I** que o SNP *SOD 1* A35C é pouco frequente em pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe (apenas 5% de frequência do alelo variante). Observou-se frequência semelhante em pacientes finlandeses com e sem

diabetes do tipo II, 9 e 10%, respectivamente, (UKKOLA, 2001). No entanto, não foi observada a mesma frequência em pacientes tchecos com e sem a mesma doença, que foi de 18 e 23%, respectivamente (FLEKAC et al., 2008).

Da mesma forma, para o SNP *SOD1* G2809A os achados na literatura são escassos. No presente estudo, não houve associação entre esse SNP e o risco de desenvolvimento do câncer da cavidade oral e orofaringe. Contudo, Cebrian et al. (2006) analisaram esse SNP no contexto do câncer de mama, tendo se observado aumento marginal do risco, ao contrário do que foi observado por Oestergaard et al. (2006).

A exposição ambiental a fatores de risco como o elevado consumo de álcool e tabaco tem sido associada ao desenvolvimento do câncer (MUWONGE et al., 2007). Nesse contexto, no presente estudo, avaliaram-se o consumo de álcool e tabaco, fatores de risco que elevam o dano oxidativo celular (PATEL et al., 2007), no entanto, estes fatores não influenciaram a ausência de associação entre o SNP *SOD1* G2809A e o risco de desenvolvimento do câncer da cavidade oral e orofaringe.

A ausência da associação entre o SNP *SOD1* G2809A e o risco para o câncer da cavidade oral e orofaringe pode ser explicada pelo fato de que somente um SNP isoladamente poderia não exercer efeito funcional significativo na enzima SOD1 para o risco de desenvolvimento da doença. Diante da dificuldade de identificar os possíveis marcadores para doenças crônicas no genoma humano, a análise de haplótipos de SNP's é uma possibilidade promissora que vem sendo bastante utilizada para identificar genes envolvidos em doenças como o câncer (SHASTRY, 2007).

Estudos epidemiológicos sugerem que dietas deficientes em micronutrientes antioxidantes representam um fator de risco para o desenvolvimento do câncer

(CEBRIAN et al., 2006). Nesse sentido, no **Estudo II** foi avaliado o estado nutricional relativo ao zinco, a presença do SNP *SOD 1* G2809A e o estresse oxidativo em pacientes com o câncer da cavidade oral e orofaringe.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se maior prevalência dos indivíduos na faixa etária de 40 a 69 anos, sendo a maioria composta por indivíduos brancos. Além disso, a maioria dos pacientes consumiram mais de 80 g de etanol/dia e 69% consumiram mais de 20 pack year. Quanto aos dados clínicos, houve maior prevalência do tumor na cavidade oral e em estádios mais avançados, III e IV. Esses dados estão de acordo com aqueles descritos na literatura (MARQUIONI et al., 2007; PATEL et al., 2007; HADDAD et al., 2008; INCA, 2010).

De forma semelhante ao presente estudo, Patel et al. (2007) observaram em pacientes com câncer da cavidade oral a prevalência de 82% de estágio avançado. Gourin & Podolsky (2006) observaram que 71,2% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço apresentaram idade acima de 50 anos e 76,1% eram do sexo masculino. Além disso, 54,7% apresentavam-se no estágio IV, sendo que a maioria apresentou elevado consumo de tabaco e álcool. Outros estudos observaram a mesma caracterização dos pacientes (PIYATHILAKE et al., 2002; MUWONGE et al., 2008; YOKOE et al., 2009).

PRASAD et al. (1998) descreveram que pacientes com câncer de cabeça e pescoço apresentavam deficiência do *status* de Zn e observaram associação de Zn com o tamanho do tumor. Um estudo de Derr et al. (1997) observou em 60 pacientes com câncer da cabeça e pescoço que o *status* nutricional de Zn poderia servir como um bom indicador do tamanho e estágio do tumor.

Em relação aos dados antropométricos, constatou-se que a maioria dos indivíduos adultos avaliados apresentou eutrofia, ou seja, normalidade, em relação ao

IMC, porém nos indivíduos idosos houve maior prevalência de baixo peso. Federico et al. (2001), avaliaram parâmetros antropométricos de pacientes com câncer no trato gastrointestinal distribuídos em grupo suplementado com Zn e não suplementado, e constataram valores de IMC semelhantes ao encontrado no presente estudo. Em relação à porcentagem de gordura e circunferência da cintura, tanto adultos como idosos apresentaram valores dentro da normalidade.

O consumo alimentar dos pacientes apresentou normalidade considerando os valores médios, porém houve grande variação em relação à ingestão de macronutrientes (carboidrato, lipídio, proteína) e também de Zn. Este fato pode ser explicado pela localização do tumor que se dá na cavidade oral e orofaringe e pelo estágio avançado da doença. Essas características podem dificultar o processo de mastigação e deglutição, limitando assim o consumo de uma dieta nutricionalmente adequada. Diante da diminuição na ingestão de alimentos mais sólidos, como os de origem animal, que são fonte de proteína, há a redução da ingestão de energia proveniente e consequentemente de Zn. Isso pode resultar na deficiência nutricional de macro e micronutrientes. Deve-se ressaltar que houve prevalência de 62,96% de deficiência de Zn proveniente da dieta quando se considerou a EAR como referência de ingestão.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, neste estudo avaliaram-se o malondialdeído, MDA, como marcador de estresse oxidativo no plasma, a atividade da SOD eritrocitária, como fator antioxidante, a capacidade antioxidante no plasma pelo ORAC, e as concentrações de Zn no plasma e eritrócito.

Especificamente em relação ao estado nutricional relativo ao zinco, sabe-se que não há um método de análise suficientemente validado. Sendo assim o mais indicado é a utilização de mais de um parâmetro, como as análises das concentrações no plasma e eritrócito, mesmo não representando um padrão ideal para expressar o *status* nutricional

de Zn (CHAN et al., 1998; TAIT et al., 2008). Diversos fatores podem alterar a concentração de Zn no plasma, como o estado fisiológico do indivíduo, idade, presença de infecções, entre outros. No entanto, o uso desse indicador de status de Zn é amplamente utilizado nos estudos epidemiológicos (GIBSON, 2005).

No presente estudo, observou-se que 52% dos pacientes apresentavam-se dentro da normalidade em relação a concentração de Zn plasmático no plasma, embora tenha sido observada grande variação entre os indivíduos. Por outro lado, 44% dos pacientes apresentavam-se deficientes quando avaliados pelo marcador de Zn no eritrócito. Diversos estudos descrevem a deficiência de zinco em pacientes com diferentes tipos de câncer (PRASAD et al., 1998; FERNANDES & MAFRA, 2005).

Lipman et al. (1987) avaliaram a concentração de Zn plasmático em 21 pacientes com câncer de esôfago, 17 pacientes com esofagite e 12 indivíduos sem a doença e observaram reduções estatisticamente significantes entre os 3 grupos, (56 ± 3 µg/dL, 72 ± 5 µg/dL e 78 ± 5 µg/dL), respectivamente. De forma semelhante, Federico et al. (2001) conduziram um estudo de suplementação de zinco com 60 pacientes com câncer do trato gastrointestinal e 30 controles, e analisaram a concentração de zinco no plasma 60 dias antes e após a quimioterapia. Constatou-se redução da concentração de Zn antes e após o tratamento em ambos os grupos, suplementado ($78,9 \pm 7,8$ µg/dL e $84,2 \pm 5,4$ µg/dL) e não suplementado, ($79,5 \pm 8,6$ µg/dL e $73,4 \pm 7,4$ µg/dL) quando comparado ao grupo controle ($87,5 \pm 9,7$ µg/dL e $87,5 \pm 9,7$ µg/dL). Deve-se destacar que os valores de Zn observados neste estudo, antes do tratamento quimioterápico, foram semelhantes aos valores de Zn plasmático analisados no presente estudo.

HO et al. (2003) observaram que a deficiência de Zn pode não somente ocasionar dano oxidativo na membrana celular e no próprio DNA, como também

comprometer a habilidade de reparar esse dano. Nesse sentido outro objetivo do trabalho foi avaliar a atividade eritrocitária da enzima SOD.

Verificou-se, no presente trabalho, redução da atividade eritrocitária da SOD quando comparado ao estudo de Manoharan et al. (2005), no qual avaliaram 48 pacientes, homens, com idade entre 40 e 60 anos, com câncer da cavidade oral e verificaram que o grupo com a doença apresentou redução estatisticamente significativa da SOD no eritrócito de acordo com o estágio da doença ($2080 \pm 0,08$ U/g Hb para o estágio II, $1920 \pm 0,13$ U/g Hb para o estágio III e $1730 \pm 0,09$ U/g Hb para o estágio IV) e também quando comparado ao grupo controle ($2290 \pm 0,17$ U/g Hb). Constatou-se, que o valor médio dos pacientes do estágio IV apresentou-se muito semelhante ao valor médio de SOD obtida no presente estudo ($1629,57 \pm 675,25$ U/g Hb).

Apesar do presente estudo não ter sido conduzido com um grupo controle, sem a doença, pode-se sugerir que houve uma redução da atividade de SOD eritrocitária, quando levado em consideração o valor encontrado por Manoharan et al. (2005).

O desequilíbrio do sistema antioxidante pode ser causado por diferentes biomoléculas, porém a peroxidação lipídica produz produtos secundários, sendo em sua maioria aldeídos com habilidade de aumentar o dano oxidativo por reagirem com biomoléculas como proteínas e ácido nucléico. O MDA é o principal e mais estudado produto de peroxidação lipídica, e é inclusive, indicado para estudos relacionados com doenças crônicas como o câncer. Destaca-se que no presente estudo utilizou-se a técnica de CLAE, por apresentar maior especificidade para análise desse marcador (DEL RIO et al., 2005; VASCONCELOS, 2007). Conforme o esperado constatou-se no estudo que 96% dos pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe apresentaram valores elevados, acima do valor de referência para indivíduos saudáveis.

Kaynar et al. (2005), conduziram um estudo do tipo caso controle no qual avaliaram parâmetros bioquímicos como a SOD eritrocitária e o MDA, em homens com faixa etária de 40 a 70 anos, com câncer de pulmão, que não haviam recebido tratamento. De forma paradoxal, observaram-se aumento da atividade de SOD e aumento do MDA em pacientes com câncer quando comparado ao grupo controle. Pode-se sugerir com esse resultado, que no início da doença e ainda sem tratamento o sistema antioxidante seria capaz de modular o dano oxidativo. Portanto, a intensidade e patogenicidade do estresse oxidativo dependem de fatores relacionados com o sistema antioxidante e oxidante do organismo (VASCONCELOS, 2007).

Resultados semelhantes foram observados, Dursun et al. (2006) ao avaliarem homens e mulheres com câncer de esôfago e câncer gástrico, com faixa etária a partir de 50 anos e observaram aumento estatisticamente significativo de MDA e SOD eritrocitária em ambos os tipos de câncer, quando comparado ao grupo de indivíduos saudáveis. Além disso, houve prevalência do estadiamento clínico do tumor avançado. Nesse sentido, os dados encontrados na literatura são conflitantes e controversos em relação ao sistema antioxidante.

Em relação à capacidade antioxidante do organismo, realizou-se o ensaio do ORAC, verificando-se que os valores encontraram-se aumentados quando comparados aos observados no estudo de Prior et al. (2003). Este resultado pode representar a capacidade de defesa antioxidante do organismo, que ainda não foi comprometida pelo desenvolvimento da doença.

Considerando que o presente estudo não foi conduzido com um grupo controle, a análise multivariada permitiu a análise das variáveis que separaram os indivíduos em dois clusters. Observou-se que o cluster 1 apresentou diferenças estatisticamente significantes em relação ao cluster 2 para o MDA, Zn plasmático, Zn e SOD

eritrocitários e para o IMC. Destaca-se que no cluster 1 houve aumento do MDA, aumento da capacidade antioxidante (ORAC), diminuição do Zn no plasma e SOD no eritrócito. Diante disso pode-se sugerir que os indivíduos desse grupo apresentaram aumento do marcador de estresse oxidativo, MDA, porém a capacidade antioxidante, representada pelo ORAC, mostrou habilidade defesa pelo organismo. E sugere-se que a redução de Zn no plasma pode estar associado a redução da atividade da SOD no eritrócito, uma vez que este mineral está diretamente relacionado a enzima antioxidante. Além disso, no cluster 1, embora não significativo estatisticamente, houve menor consumo de energia proveniente da dieta, o que possivelmente resultou na diminuição do peso dos indivíduos de acordo com o IMC e também no consumo de Zn dietético.

Em relação ao SNP *SOD1* G2809A, houve um fator limitante no número de casos selecionados com câncer da cavidade oral orofaringe, sendo esta uma dificuldade apresentada em estudos com polimorfismos. Contudo, de forma interessante, observou-se prevalência do genótipo heterozigoto e homozigoto de referência (GA+AA=63%) no cluster 1 quando comparado ao cluster 2 (GA+AA=27%). Nesse sentido, o aumento do n amostral poderia eventualmente confirmar se o SNP em questão poderia estar relacionado com o aumento do estresse oxidativo, resultante da diminuição da atividade da enzima SOD.

7. CONCLUSÕES

- O polimorfismo G2809A no gene da SOD1 não esteve associado com o risco de câncer da cavidade oral e orofaringe; o consumo de tabaco ou de etanol não modificou essa ausência de associação.

- O polimorfismo A35C no gene da SOD1 é pouco frequente em pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe.

- Pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe apresentaram consumo reduzido de Zn e estado nutricional deficiente para esse micronutriente.

- Pacientes com câncer da cavidade oral e orofaringe parecem apresentar aumento do estresse oxidativo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, J., LIU, Z., HU, Z., LI, G., WANG, LI-E, STURGIS, E. M., EL-NAGGAR, A. K., SPITZ, M. R., WEI, Q. Potentially Functional Single Nucleotide Polymorphisms in the Core Nucleotide Excision Repair Genes and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 16, n. 8, 2007.

ALVARENGA, L. M., RUIZ, M.T., BERTELLI, E. C. P., RUBACK, M. J. C., MANIGLIA, J. V., BERTOLLO, E. M. G. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, n. 1, p. 68-73, 2008.

ARGIRIS, A., KARAMOUZIS, M. V., RABEN, D., FERRIS, R. L. Head and neck cancer. **Lancet**, v. 371, p. 1695-709, 2008.

BEEVI, S.S.S., RASHEED, A.M.H., GEETHA, A. Evaluation of Oxidative Stress and Nitric Oxide Leves in Patients with Oral Cavity Cancer. **Jpn J Clin Oncol.**, v.34, n.7, p.379-385, 2004.

BENTZ, B. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma as a Model of Oxidative-Stress and Cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 96, p. 190-191, 2007.

BISELLI, J.M., LEAL, R. C. A. C., RUIZ, M. T., BERTOLLO, E. M. G., MANÍGLIA, J. V., ROSSIT, A. G. B., PAVARINO-BERTELLI, E. C. P. Polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* em indivíduos tabagistas com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 5, p. 654-658, 2006.

BOCCIA, S., CADONI, G., SAYED-TABATABAEI, F. A., VOLANTE, M., ARZANI, D., LAURETIS, A. D., CATTEL, C., ALMADORI, G., DUIJN, C. M. V., PALUDETTI, G., RICCIARDI, G. *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *EPHX1* exons 3 and 4, and *NAT2* polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck câncer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.134, p. 93-100, 2008.

BÜNTZEL J, GLATZEL M, MICKE O. FRÖHLICH D. Status of essential trace elements in untreated carcinomas of the head and neck. **Laryngorhinootologie**, German, v. 82, n. 8, p. 573-577, 2003.

BREEN, N., WAGENER, D.K., BROWN, M.L., DAVIS, W.W., BALLARD-BARBASH, R. Progress in cancer screening over a decade: results of cancer screening from the 1987, 1992, and 1998 National Health Interview Surveys. **J Natl Cancer Inst.**, v.93, n.22, p.1704-13, 2001.

CEBRIAN, A., PHAROAH, P.D., AHMED, S., et. al. Tagging Single-Nucleotide Polymorphisms in Antioxidant Defense Enzymes and Susceptibility to Breast Cancer. **Cancer Res**. v.15, n. 2, p. 1225-33, 2006.

CHAN, S., GERSON, B., SUBRAMANIAM, S. The role of copper, molybdenum, selenium, and zinc in nutrition and health. **Clin Lab Med**, v. 18, n. 4, p. 673-685, 1998.

CHARDRA, R. K. Excessive intake of zinc impairs immune responses. **JAMA**, v. 252, p. 1443-1446, 1984.

CHISHOLM, E., BAPAT, U., CHISHOLM, C., ALUSI, G., VASSAUX, G. Gene therapy in head and neck cancer: a review. **Postgrad Med J**, v. 83, p. 731-737, 2007.

CHENG, W. H. Impact of Inorganic Nutrients on Maintenance of Genomic Stability. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, p. 1-12, 2009,

CHENG, G. W., WU, H. L., HUANG, Y. L. Simultaneous determination of malondialdehyde and ofloxacin in plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography/fluorescence detection system. **Analytica Chimica Acta**, v. 616, p. 230-234, 2008.

COUSINS, R. J., LIUZZI, J. P., LICHTEN, L. A. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 28, n. 34, p. 24085-24089, 2006.

CUEVAS, L. E., KOYANAGI, AI. Zinc and infection: a review. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 25, p. 149-160, 2005.

DEVIRGILIIS, C., Zalewski, P. D., PEROZZI, G., MURGIA, C. Zinc fluxes and zinc transporter genes in chronic diseases. **Mutation Research**, v. 622, p. 84-93, 2007.

DIMAYUGA, F. O., WANG, C., CLARK, J. M., DIMAYUGA, E. R., DIMAYUGA, V. M., BRUCE-KELLER, A. J. SOD1 overexpression alters ROS production and reduces neurotoxic inflammatory signaling in microglial cells. **Journal of Neuroimmunology**, v. 182, p. 89-99, 2007.

DOERR, T. D., PRASAD, A. S., MARKS, S. C., BECK F. W., SHAMSA, F. H., PENNY H. S., MATHOG, R. H., Zinc deficiency in head and neck cancer patients. **J Am Coll Nutr**, v. 16, n. 5, p. 418-422, 1997.

DURNIN, J. V. G. A. & WOMERSLEY, I. Body fat assessed from total body density ad its estimation from skinfold thickness: measurement on 481 men and women aged from 16 to 72 years. **The British journal of nutrition**, v. 32, p. 77-97, 1974.

DURSUN, H., BILICI, M., UYANIK, A., OKCU, N., AKYUZ, M. Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation Levels in Erythrocytes of Patients with Oesophageal and Gastric Cancer. **The Journal of International Medical Research**, Turkey, v. 34, p. 193-199, 2006.

EIDE, D. J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, p. 711-722, 2006.

ESPÍNDOLA, R. M., MAZZANTINI, R. P., ONG, T. P., CONTI, A., HEIDOR, R., MORENO, F. S. Geranylgeraniol and beta-ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation, total plasma cholesterol and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF-kappaB activation. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 6, p. 1091-9, 2005.

FANG, Y.H., YANG, S., WU, G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 872-879, 2002.

FARAH, S. B. DNA Segredos e Mistérios. Sarvier, São Paulo, 2. ed., 538 p., 2007.

FEDERICO, A., IODICE, P., FEDERICO, P., DEL RIO, A., MELLONE, M. C., CATALANO, G. Effects of selenium and zinc supplementation on nutritional status in patients with cancer of digestive tract. **Eur J Clin Nutr**, v.55, p. 293-297, 2001.

FERNANDES, A. G., MAFRA, D. Zinco e cancer: uma revisão. **Rev. Saúde. Com.**, v. 1, n. 2, p. 144-156, 2005.

FISACHI, A. I., COZZOLINO, A., RUGGIERO, G., GIORGI, G. Glutathione, ascorbic acid and antioxidant enzymes in the tumor tissue and blood of patients with oral squamous cell carcinoma. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**. v. 9, n. 6, p. 361-367, 2005.

FLEKAC, M., SKRHA, J., HILGERTOVA, J. Gene polymorphisms of superoxide dismutase and catalase in diabetes mellitus. **BMC Medical Genetics**, v. 9, n. 30, 2008.

FORASTIERE, A., KOCH, W., TROTTI, A. & SIDRANSKY, D. Head and Neck Cancer. v. 345, n.26, p.1890-1900, 2001.

FRANKLIN, R. B., COSTELLO, L. C. Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.463, p. 211-217, 2007.

FREEDMAN, N.D., PARK, Y., SUBAR, A.F., HOLLENBECK A.R., LEITZMANN, M.F., SCHATZKIN, A., ABNET, C.C. Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. **Int J Cancer**. v. 18, 2007.

FREITA, V. S., LOPES, M. A., MEIRELES, J. R. C., REIS, L., CERQUEIRA, E. M. M. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 189-199, 2005.

GARAVELLO, W., LUCENTEFORTE, E., BOSETTI, C., LA VECCHIA, C. The role of foods and nutrients on oral and pharyngeal cancer risk. **Minerva Stomatol.**, v. 58, n. 1-2, p. 25-34, 2009.

GARÓFOLO, A., AVESANI, C. M., CAMARGO, K. G., BARROS, M. E., SILVA, S. R. J., TADDEI, J. A. A. C., SIGULEM, D. M. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 491-505, 2004.

GIBSON, R. S. Principles of nutritional assessment. Nova York: **Oxford University Press**, 2ed., 2005.

GOON, P. K. C., STANLEY, M. A., EBMAYER, J., STEINSTRASSER, L., UPILE, T., JERJES, W., SPREKELSEN, M. B., GORNER, M., SUDHOFF, H. H. HPV & head and neck cancer: a descriptive update. **Head & Neck Oncology**, v. 1, n. 36, 2009.

GOURIN, C. G., PODOLSKY, R. H. Racial Disparities in Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **The Laryngoscope**, v. 116, p. 1093-1106, 2006.

GUERRA, M. R., GALLO, C. V. M., MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

GUTHRIE, H.A.; PICCIANO, M.F. Micronutrient minerals. In: GUTHRIE, H.A.; PICCIANO, M.F., eds. **Human nutrition**. Saint Louis: Mosby, p.351-357, 1994.

HADDAD, R., ANNINO, D., TISHLER, R. B. Multidisciplinary Approach to Cancer Treatment: Focus on Head and Neck Cancer. **The Dental Clinics of North America**. V. 52, p. 1-17, 2008.

HAMBIDGE, K. M, KREBS, N. F. Zinc deficiency: A Special Challenge. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 1101-1105, 2007.

HATAGIMA, L. Polimorfismos genéticos e metabolismo dos desreguladores endócrinos na suscetibilidade ao câncer. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. 357-377, 2002.

HARTH, V., SCHAFER, M., ABEL, J., MAINTZ, L., NEUHAUS, T., BESUDEN, M., PRIMKE, R., WILKESMANN, A., THIER, R., VETTER, H., KO, YON-DSCHUN, BRUNING, T., BOLT, H. M., ICKSTADT, K. Head and Neck Squamous-Cell Cancer and its Association with Polymorphic Enzymes of Xenobiotic Metabolism and Repair. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 71, p. 887-897, 2008.

HENRIQUES, G. S., HIRATA, M. H., COZZOLINO, S. M. F. Aspectos recentes da absorção e biodisponibilidade do zinco e suas correlações com a fisiologia da isoforma testicular da Enzima Conversora de Angiotensina. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 333-345, 2003.

HO, E., COURTEMANCHE, C., AMES, B. N. Zinc Deficiency Induces Oxidative DNA Damage and Increases P53 Expression in Human Lung Fibroblasts. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 2543-2548, 2003.

HO, E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. **J. Nutr Biochem**, v. 15, p.572-478, 2004.

HOGSTRAND, C., KILLE, P., NICHOLSON, R. I., TAYLOR, H. M. Zinc transporters and câncer: a potencial role for ZIP7 as a hub for tyrosine kinase activation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 3, 2009.

HOTZ, C.; PEERSON, J.M.; BROWN, K.H. Suggested lower cutoffs of serum zinc concentrations for assessing zinc status: reanalysis of the second National Health and Nutrition Examination Survey data (1976-1980). **American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, p.756-764, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, INCA. Ministério da Saúde. **Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil**, 2010. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2010.

IOM. (Institute of Medicine). *DRI - Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. Washington, DC., **National Academy Press**, 2001. Disponível em: <http://www.nap.edu>. Acesso em 07.03.2010.

IOM (Institute of Medicine). *DRIs - Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids*. Washington, D.C., **National Academy Press**, 2005. Disponível em: <http://www.nap.edu>. Acesso em 07.03.2010.

JOHNSON, F., GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Molecular Aspects of Medicine**, Davis, v.26, p. 340-352, 2005.

KAYNAR, H., MERAL, M., TURHAN, H., KELES, M. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. **Cancer Letters**, Turkey, v. 227, p. 133-139, 2005.

KEY, T.J., ALLEN, N. E., SPENCER, E. A., TRAVIS, R. C. The effect of diet on risk of câncer. **Lancet**, v.360, p.861-868, 2002.

KLAUNIG, J. E., KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v. 44, p. 239-267, 2004.

KOURY, J. C., DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

LEITZMANN, M. F., STAMPFER, M. J., WU, K., COLDITZ, G. A., WILLETT, W. C., GIOVANNUCCI, E. L. Zinc Supplement Use and Risk of Prostate Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 13, 2003.

LIMA, J. M., SERAFIM, P. V. P., SILVA, I. D. C. G., FORONES, N. M. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. **Arq Gastroenteral**, v. 43, n. 1, 2006.

LIN, L. C., QUE, J., LIN, L. K., LIN, C. F. zinc supplementation to improve mucositis and dermatitis in patients after radiotherapy for head-and-neck cancers: a double-blind, randomized study. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys**, v. 65, n. 3, p. 745-750, 2006.

LIPMAN, T. O., DIAMOND, A., MELLOW, M. H., PATTERSON, K. Y. Esophageal zinc content in human squamous esophageal cancer **J Am Coll Nutr**, v. 6, p. 41-46, 1987.

LIPSCHITZ, D.A. Screening for nutritional status in the elderly. **Primary Care**, v.21, n.1, p.55-67, 1994.

LOHAMN, T. G., ROCHE, A. F., MARTORELL, R. Anthropometric standardization reference manual. **Abridge**, p. 90, 1991.

MAFRA, D. & COZZOLINO, S.M.F. Importância do zinco na nutrição humana. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 1, p. 79-87, 2004.

MIAO, L., CLAIR, D. K. S. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. **Free Radical Biology & Medicine**, 2009.

MOCCHIGIANI, E. & CONSORTIUM, T. Z. Zinc, Metallothioneins, Longevity: Effect of Zinc Supplementation on Antioxidant Response: A Zincage Study. **Rejuvenation Research**, v. 11, n. 2, 2008.

MUWONGE, R., RAMADAS, K., SANKILA, R., THARA, S., THOMAS, G., VINODA, J., SANKARANARAYANAN. Role of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking in the risk of oral cancer in Trivandrum, India: A nested case-control design using incident cancer cases. **Oral Oncology**, v. 44, p. 446-454, 2008.

MANOHARAN, S., KOLANJIAPPAN, K., SURESH, K., PANJAMURTHY, K. Lipid peroxidation & antioxidants status in patients with oral squamous cell carcinoma. **Indian J Med Res**, v. 122, p. 529-534, 2005.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2008.

NOOR, R., MITTAL, S., IQBAL, J. Superoxide dismutase--applications and relevance to human diseases. **Med Sci Monit.**, v. 8, 2002.

OBERLEY, L. W. Anticancer Therapy by Overexpression of Superoxide Dismutase. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 3, n. 3, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. Physical Status: the use and interpretation of anthropometry. WHO Technical Report Series nº 854. Geneva, Switzerland, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva, 1998.

PATEL, B. P., RAWAL, U. M., DAVE, T. K., RAWAL, R. M., SHUKLA, S. N., SHAH, P. M., PATEL, P. S. Lipid Peroxidation, Total Antioxidant Status, and Total Thiol Levels Predict Overall Survival in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. **Integrative Cancer Therapies**, v. 6, n. 4, p. 365-371, 2007.

PEREIRA, A. C., CARMO, E. D., SILVEIRA, V. A. S., AMADEI, S. U., ROSA, L. E. B. O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 3, p. 257-262, 2006.

PERSON, O. C., BOTTI, A. S., FERES, M. C. L. C. Repercussões clínicas da deficiência de zinco em humanos. **Arq Med ABC**, v. 31, n. 1, p. 46-52, 2006.

PIYATHILAKE, C. J., BELL, W. C., OELSCHLAGER, D. K., HEIMBURGER, D. C., GRIZZLE, W. E. The pattern of expression of Mn and Cu-Zn superoxide dismutase varies among squamous cell cancers of the lung, larynx, and oral cavity. **Head Neck**, v. 24, p. 859-867, 2002.

PRASAD, A. S. Clinical, endocrinologic, and biochemical effects of zinc deficiency. **Special topics in endocrinology and metabolism**, v. 7, p. 45-76, 1985.

PRASAD AS, HALSTED JA, NADIMI M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. **Am J Med**. v. 31, p. 532-546, 1961.

PRASAD AS, MIALE A, FARID Z, SCHULERT A, SANDSTEAD HH. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hypogonadism, and dwarfism. **J Lab Clin Med**., v. 61, p. 537-549, 1963.

PRASAD, A. S., BECK, F. W. J., DOERR, T. D., SHAMSA, F. H., PENNY, H. S. Nutritional and Zinc Status of Head and Neck Cancer Patients: An Interpretive Review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 17, n. 5, p. 409-418, 1998.

PRASAD, A., KUCUK, O. Zinc in cancer prevention. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 21, p. 291-295, 2002.

PRASAD, A. S., BECK, F. W. J., BAO, B., FITZGERALD, J. T., SNELL, D. C., STEINBERG, J. D., CARDOZO, L. J. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.85, p.837-844, 2007.

PRASAD, A. S. Zinc in Human Health: Effect of Zinc on Immune Cells. **Mol Med**, v. 14, n. 5-6, p. 353-357, 2008.

PRASAD, A. S. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 28, n. 3, p. 257-265, 2009.

RODRIGUEZ, M.P. A simpler method for the determination of zinc human plasma levels by flame atomic absorption spectrophotometry. **Atomic Spectroscopy**, v.10, n.2, p.68-70, 1989.

SALIBA, L. F., TRAMONTE, V. L. C. G., FACCIN, G. L. Zinco no plasma e eritrócito de atletas profissionais de uma equipe feminina brasileira de voleibol. **Rev. Nutr.**, v. 19, n. 5, p. 581-590, 2006.

SHASTRY, B. SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. **J Hum Genet**, v. 52, p. 871-880, 2007.

SILVERA, S.A.N., ROHAN, T.E. Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. **Cancer Causes Control**, v.18, p. 7-27, 2007.

SINGH, M., SHAH, P. P., SINGH, A.P., RUWALI, M., MATHUR, N., PANT, M. C., PARMAR, D. Association of genetic polymorphisms in glutathione S-transferases and susceptibility to head and neck cancer. **Mutation Research**, v. 638, p. 184–194, 2008.

SLIWINSKI, T., CZECHOWSKA, A., KOLODZIEJCZAK, M., JAJTE, J., JAROSINSKA, M. W., BLASIAK, J. Zinc salts differentially modulate DNA damage in normal and cancer cells. **Cell Biology International**, p.1-6, 2009.

STEWART, B.W., KLEIHUES, P. **World Cancer Report.**, OMS, 351 p, 2003.

STEFANIDOU, M., MARAVELIAS, C., DONA, A. Zinc: a multipurpose trace element. *ArchToxicol*, v. 80, p. 1-9, 2006.

STRATTON, M. R., CAMPBELL, P. J., FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**, v. 458, p. 719-724, 2009.

SUBAPRIYA, R., KUMARAGURUPARAN, R., RAMACHANDRAN, C. R., NAGINI, S. Oxidant – antioxidant status in patients with oral squamous cell carcinomas at different intraoral sites. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 489-493, 2002.

SUN, Y., OBERLEY, L. W., LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clinical Chemistry**, v. 34, p. 497–500, 1988.

SUN, D., ZHANG, L., WANG, Y., WANG, X., HU, X., CUI, F., KONG, F. Regulation of zinc transporters by dietary zinc supplement in breast cancer. **Mol. Biol Rep**, v. 34, p. 241-247, 2007.

TAYSI, S., CIKMAN, O., KAYA, A., DEMIRCAN, B., GUMUSTEKIN, K., YILMAZ, A., BOYUK, A., KELES, M., AKYUZ, M., TURKELI, M. Increased oxidant stress and decreased antioxidant status in erythrocytes of rats fed with zinc-deficient diet. **Biol Trace Elem Res**, v. 123, p. 161-167, 2008.

TAGHAVI, N., YAZDI, I. Type of food and risk of oral cancer. **Arch Iranian Med**, v. 10, n. 2, p. 227-232, 2007.

TUERK, M. J., FAZEL, N. Zinc deficiency. **Current Opinion in Gastroenterology** v. 25, p. 136-143, 2009.

UDLER, M., MAIA, A.T., CEBRIAN, A. Common Germline Genetic Variation in Antioxidant Defense Genes and Survival After Diagnosis of Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 21, p. 3015-3022, 2007.

UICC – União Internacional contra o cancer. Classificação de tumores malignos. **Ministério da Saúde – Instituto Nacional de Câncer**, 6^a ed., 2004.

VALLEE, B. L., FALCHUK, K. H. The biochemical basis of Zn physiology. **Physiol Rev**, v. 73, p. 79-118, 1993.

VALKO, M., RHODES, C. J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M. Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p. 1–40, 2006.

VAN ASSENDELFT, O.W. The measurement of hemoglobin. In: IZAK, G.; LEWIS, SM., eds. **Modern concepts in hematology**. New York: Academic Press, p.14-25, 1972.

VASCONCELOS, S. M. L., GOULART, M. O. F., MOURA, J. B. F., BENFATO, V. M. M. S. KUBOTA, L T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VELDWIJK, M. R., HERSKIND, C., SELLNER, L., RADUJKOVIC, A., LAUFS, S., FRUEHAUF, S., ZELLER, W. J., WENZ, F. Normal-tissue radioprotection by overexpression of the copper-zinc and manganese superoxide dismutase genes. **Strahlenther Onkol**, v. 185, p. 517-523, 2009.

ZELKO, I. N., MARIANI, T. J., FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structure, evolution, and expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 3, p. 337-349, 2002.

YADAV, S. P., GERA, A., SINGH, I., CHANDA, R. Serum selenium levels in patients with head and neck cancer. **Otolaryngol.**, v .31, n.4, p.216-219, 2002.

YOKOE, H., NOMURA, H., YAMANO, Y., FUSHIMI, K., SAKAMOTO, Y., OGAWARA, K., SHIIBA, M., BUKAWA, H., UZAWA, K., TAKIGUCHI, Y., TANZAWA, H. Characterization of intracellular superoxide dismutase alterations in premalignant and malignant lesions of the oral cavity: correlation with lymph node metastasis. **J Cancer Res Clin Oncol**, 2009.

WALKER, C. F., BLACK, R. E. Zinc and the risk for infectious disease. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 24, p. 255-275, 2004.

WALKER, C.L.F., EZZATI, M., BLACK, R. E. Global and regional child mortality and burden of disease attributable to zinc deficiency. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 591-597, 2009.

WARD, L. S. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 4, 2002.

WERBROUCK, J., RUYCK, K., DUPREZ, F., EIJKEREN, M. V., RIETZSCHEL, E., BEKAERT, S., VRAL, A., NEVE, W. D., THIERENS, H. Single-nucleotide polymorphisms in DNA double-strand break repair genes: Association with head and neck cancer and interaction with tobacco use and alcohol consumption. **Mutation Research**, v. 656, p. 74-81, 2008.

WILLET, W.C. Issues in analysis and presentation of dietary data. In: _____. **Nutritional epidemiology**. 2.ed. New York: Oxford University Press, 1998. p.321-345. (Monographs in epidemiology and biostatistics, v.30).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Cancer Report, 2008**. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2008.

WHITEHOUSE, R.C.; PRASAD, A.S.; RABBANI, P.I.; COSSACK, Z.T. Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes, and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. **Clinical Chemistry**, v.23, n.3, p.475-480, 1982.

Anexo 1

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

mais suscetíveis a níveis aumentados de estresse oxidativo e, nesse sentido, apresentar maior risco para doenças crônicas em que esse processo tem papel importante, como o próprio câncer de cabeça e pescoço. Dessa forma, propõe-se avaliar a influência de polimorfismos nos genes para as enzimas antioxidantes GPX1 e SOD1 no risco de câncer de cabeça e pescoço, bem como associação entre estado nutricional relativo ao Se e Zn, polimorfismos nos genes GPX1 e SOD1 e estresse oxidativo em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

Os objetivos do presente estudo são:

- Avaliar a influência de polimorfismos nos genes para as enzimas antioxidantes GPX1 e SOD1 no risco de câncer de cabeça e pescoço.
- Avaliar, em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, associação entre estado nutricional relativo ao Se e Zn, polimorfismos nos genes GPX1 e SOD1 e estresse oxidativo.

Descrição da Casuística

No presente projeto, propõe-se a condução de dois estudos (Estudos I e II). O Estudo I será voltado para avaliar a influência de polimorfismos nos genes para as enzimas antioxidantes GPX1 e SOD1 no risco de câncer de cabeça e pescoço. O Estudo II, por sua vez, será voltado para avaliar associação entre estado nutricional relativo ao Se e Zn, polimorfismos nos genes GPX1 e SOD1 e estresse oxidativo.

No estudo I serão analisados 300 pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, sem tratamento prévio, acompanhados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis a partir do ano de 2001, integrantes de parte da casuística do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço. Serão avaliados ainda 300 indivíduos controle, internados nas enfermarias do Hospital Heliópolis, sem neoplasias ou histórico clínico de neoplasia ou com internação relacionada a tratamento de doenças relacionadas ao consumo de álcool e tabaco, doenças ocupacionais ou imunodeficiências.

III - Situação do protocolo: PROJETO APROVADO

Lembramos que Vossa Senhoria deve apresentar relatório parcial após 50% do cronograma do projeto e relatório final.

São Paulo, 20 de outubro de 2008.

Prof. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

Anexo 2

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis

UGA I – UNIDADE DE GESTÃO ASSISTENCIAL – HOSPITAL HELIÓPOLIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 09 de Dezembro de 2008.

Ao Prezado

Dr. José Francisco de Sales Chagas**APROVAÇÃO**

Referente: "Polimorfismos em genes para enzimas antioxidantes dependentes de micronutrientes, estresse oxidativo e risco de câncer de cabeça e pescoço da cavidade oral e orofaringe".

Registro CEP: 657.

Vimos por meio desta declarar que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis avaliou e aprovou, em reunião plenária ocorrida em 09/12/2008 o estudo supracitado, tendo como autor o Dr. José Francisco de Sales Chagas e como relator o Dr. Luiz Carlos Latorre.

Lembramos que é obrigatório o envio de relatório anual e final do estudo para este Comitê de Ética em Pesquisa.

Estamos a disposição para quaisquer esclarecimentos.

Atenciosamente,

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL HELIÓPOLIS
JOZIAS DE ANDRADE SOBRINHO
Coordenador

Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
COORDENADOR CEP

Anexo 3

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital e Maternidade Celso Pierro da Pontifícia Universidade Católica de Campinas - PUC

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Campinas, 04 de fevereiro de 2009

Protocolo 908/08

Prezado Senhor José Francisco Sales Chagas,

Parecer Projeto: PROJETO APROVADO

I - Identificação:

Título do Projeto: Polimorfismo em Genes Para Enzimas Antioxidantes Dependentes de Micronutrientes, Estresse Oxidativo e Risco de Câncer de Cabeça e Pescoço da Cavidade Oral e Orofaringe

Pesquisador responsável: José Francisco Sales Chagas

Coordenador: Thomas Prates Ong

Colaboradores: Silvia Maria Franciscato Cozzolino, Fernando Salvador Moreno, Dirce Marchioni, Adriana Madeira Álvares da Silva, Marcos Brasilino de Carvalho, Rosana Sarmento Brasileiro, Luciana Sigueta Nishimura, Suzana Bressan, e José Alexandre Coelho Pimentel

Instituição onde se realizará: Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital e Maternidade Celso Pierro da PUC-Campinas

Data de apresentação das reformulações solicitadas pelo CEP: 03.02.09

II- Objetivo:

- Avaliar a influência de polimorfismos nos genes para as enzimas antioxidantes GPX1 e SOD1 no risco de câncer de cabeça e pescoço.
- Avaliar, em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, associação entre estado nutricional relativo ao Se e Zn, polimorfismo nos genes GPX1 e SOD1 e estresse oxidativo.

III - Sumário:

O presente projeto propõe-se a condução de dois estudos. O Estudo I serão analisados 300 paciente com diagnóstico de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, sendo voltado para avaliar a influência de polimorfismos nos genes para as enzimas antioxidantes GPX1 e SOD1 no risco de câncer de cabeça e pescoço. O **Estudo II** será de natureza transversal composto por 90 pacientes com carcinoma epidermóide da cavidade oral e orofaringe, sendo voltado para associação entre estado nutricional relativo ao Se e Zn, polimorfismos nos genes GPX1 e SOD1 e estresse oxidante.

IV-2º Parecer do CEP:

Dessa forma, e considerando a Resolução no. 196/96 item VI1.13.b, que **define as atribuições dos CEPs e classifica os pareceres emitidos aos projetos de pesquisa envolvendo seres humanos**, e, ainda que a documentação apresentada atende ao solicitado, emitiu-se o parecer para o presente projeto: Aprovado.

Conforme a Resolução 196/96, é atribuição do CEP "acompanhar o desenvolvimento dos projetos através de relatórios anuais dos pesquisadores" (VI1.13.d). Por isso o/a pesquisador/a responsável deverá encaminhar para o CEP-PUC-Campinas o relatório final de seu projeto, até 30 dias após o seu término.

V - Data da Aprovação: 04/02/09

Sendo só o que nos cumpre informar, aproveitamos da oportunidade para renovar votos de estima e consideração
Atenciosamente.

Prof. Dr. (Darlos Alberto Zanotti)
Segundo Vice-Presidente do C.E.P.S.H.P
PUC-Campinas

Anexo 4 – TCLE - Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Hospital e Maternidade Celso Pierro

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
ESTUDO 2 (TRANSVERSAL) – GRUPO DE ESTUDO**

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Nome do Paciente:.....
Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....Nº:.....Apto:.....
Bairro:.....Cidade:.....
CEP:.....Telefone:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa:

"Polimorfismos em genes para enzimas antioxidantes dependentes de micronutrientes, estresse oxidativo e risco de câncer de cabeça e pescoço"

2. Pesquisador:

Thomas Prates Ong (Professor Doutor do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental - FCF/USP)

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Risco Mínimo (**X**) Risco Médio () Risco Baixo () Risco Maior ()

4. Duração da Pesquisa: **36 meses**

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

Prezado senhor,

Meu nome é Thomas Prates Ong, sou professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), e estou convidando-o para participar de um projeto de pesquisa que estou desenvolvendo com médicos e pesquisadores do Hospital e Maternidade Celso Pierro da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC). A

pesquisa também conta com a colaboração de pesquisadores das Faculdades de Ciências Farmacêuticas e Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Nesta pesquisa serão incluídos homens com câncer de cabeça e pescoço. Para avaliar se uma alimentação pobre em micronutrientes como selênio e Zn, junto com certas características na sequência do DNA, poderia influenciar o aparecimento do câncer, serão realizados testes genéticos (DNA) e testes de laboratório no seu sangue e urina.

Se o senhor aceitar participar do estudo, precisarei do seu consentimento e de uma amostra de sangue e urina que serão coletadas no ambulatório do Hospital e Maternidade Celso Pierro da PUC. Um profissional de enfermagem realizará uma única coleta de 20 mL de seu sangue, sendo que o senhor deverá estar em jejum de 12 horas. O senhor poderá sentir alguma dor no local da punção e/ou tontura e poderá ser formada uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. Os materiais utilizados (seringas e agulhas) são descartáveis e esterilizados. Com sua amostra de sangue, será realizado um exame para avaliar diferenças na sequência do DNA de cada indivíduo (polimorfismos), nos genes das enzimas glutatona peroxidase e cobre-Zn superóxido dismutase. Estas enzimas dependem da presença do selênio e Zn, que são micronutrientes por serem necessários em pequenas quantidades para o funcionamento do corpo humano. O selênio está presente principalmente na castanha-do-brasil (castanha-do-pará), em peixes, carnes e cereais. O Zn é encontrado nas carnes vermelhas, frango, peixe e cereais. Essas enzimas ajudam na proteção do organismo contra radicais livres, que causam dano nas células e no DNA. Também serão avaliados nessa mesma amostra de sangue o funcionamento das enzimas glutatona peroxidase e cobre-Zn superóxido dismutase, bem como a quantidade de selênio, Zn e radicais livres.

Além do sangue, será coletada uma única amostra de 50 mL de sua urina no período da manhã, que não precisa ser a primeira urina do dia, para avaliação da quantidade de radicais livres. Será fornecido um frasco descartável e esterilizado para que o senhor faça a coleta de urina. Também serão solicitadas informações pessoais e de seu consumo de alimentos, e serão feitas medidas de seu corpo como peso, altura e gordura do corpo (dobras cutâneas). Para medir a gordura de seu corpo, um profissional treinado irá pressionar um pequeno aparelho chamado adipômetro na gordura no seu braço direito, costas e barriga. O senhor poderá sentir um leve desconforto durante a medição, devido à leve e rápida pressão do aparelho.

Suas amostras de DNA, sangue e urina serão armazenadas no Laboratório de Dieta Nutrição e Câncer da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo sob minha responsabilidade. Essas amostras (DNA, sangue e urina) serão mantidas em banco de materiais biológicos sem a identificação de seu nome, pois será utilizado código para identificação, e a amostra poderá ser utilizada para pesquisas futuras que estejam relacionadas com o câncer de cabeça e pescoço. Se isso ocorrer, o novo projeto de pesquisa será submetido aos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

da USP e do Hospital e Maternidade Celso Pierro da PUC, e então, o senhor será consultado a respeito.

O senhor autoriza o armazenamento das amostras (DNA, sangue e urina) para pesquisas futuras? () SIM () NÃO

Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão colaborar no entendimento dos fatores que influenciam o aparecimento do câncer de cabeça e pescoço.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

O senhor terá as informações sobre os procedimentos, e benefícios relacionados ao estudo, além do acesso aos resultados das análises que serão realizadas.

O senhor e/ou seu responsável têm a liberdade de abandonar a pesquisa em qualquer momento, sem que haja qualquer prejuízo para o mesmo.

Os resultados obtidos na pesquisa serão mantidos em sigilo, preservando sua privacidade.

Não haverá nenhuma despesa ou recompensa financeira para o senhor e/ou seu responsável na participação desta pesquisa.

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

Caso o senhor tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, ou se tiver alguma lesão ou doença relacionada à pesquisa, você poderá entrar em contato com o Prof. Thomas Prates Ong (telefone: (0XX11) 30913630) ou com as pesquisadoras Luciana Nishimura ou Suzana Bressan (telefone: (0XX11) 30913625).

VI – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa

ou responsável legal

Assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)

“Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - Av Prof Lineu Prestes, 580 – Bloco 13A – São Paulo – SP– Telefone: (0XX11) 3091-3677 – e-mail: cepfcf@usp.br. Comitê de Ética em Pesquisas da Pontifícia Universidade Católica de Campinas - Rod. Dom Pedro I, Km 136 - Pq. das Universidades – Campinas –SP - Telefone: (0XX19) 3343-6777 - Fax: (0XX19) 3343-6777 e-mail: comitedeetica@puc-campinas.edu.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Estudo II

Participação no estudo: **"Polimorfismos em genes para enzimas antioxidantes dependentes de micronutrientes, estresse oxidativo e risco de câncer de cabeça e pescoço da cavidade oral e orofaringe"**.

Nome do Paciente: _____

Número: _____ Data: _____

NATUREZA E OBJETIVO DO ESTUDO

Meu nome é José Francisco de Sales Chagas, Cirurgião de Cabeça e Pescoço, e estou convidando-o para participar de um projeto de pesquisa que estou desenvolvendo com médicos e pesquisadores do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital e Maternidade Celso Pierro da Pontifícia Universidade Católica de Campinas e do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis em São Paulo. A pesquisa também conta com a colaboração de pesquisadores das Faculdades de Ciências Farmacêuticas e Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Nesta pesquisa serão incluídos homens com câncer de cabeça e pescoço da cavidade oral e orofaringe (boca e garganta) para se avaliar se uma alimentação pobre em micronutrientes como selênio e Zn, junto com certas características no DNA, poderia influenciar o aparecimento do câncer.

PROCEDIMENTO DO ESTUDO

A) Será coletada uma única amostra de 20mL de sangue, sendo que o senhor deverá estar em jejum de 12 horas. O senhor poderá sentir alguma dor no local da punção e/ou tontura e poderá ser formada uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. Os materiais utilizados (seringas e agulhas) são descartáveis e esterilizados.

B) Será coletada uma única amostra de 50 mL de sua urina no período da manhã, que não precisa ser a primeira urina do dia. Será fornecido um frasco descartável e esterilizado para que o senhor faça a coleta de urina.

C) Serão feitas perguntas sobre suas informações pessoais e do seu consumo de alimentos, e serão feitas medidas de seu corpo como peso, altura e gordura do corpo.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Estes materiais serão armazenados no Laboratório de Biologia Molecular para a pesquisa científica. O uso destes materiais não implicará riscos adicionais para você, nem exigirá que se submeta a qualquer outro procedimento.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis e todo estudo que vier a utilizar este material será previamente apresentado à apreciação deste Comitê.

Não haverá benefícios imediatos decorrentes desta pesquisa para os participantes. Apesar disso, os resultados poderão beneficiar, no futuro, outros pacientes.

Se os resultados obtidos em relação à análise genética trouxerem benefícios em relação ao diagnóstico ou prognóstico da doença, asseguraremos o contato com os pacientes envolvidos. Caso se faça necessário, também será realizado o aconselhamento genético, conforme a resolução no. 347 do Conselho Nacional de Saúde (13 de janeiro de 2005).

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, assine este termo de consentimento e em caso de dúvida ligue para os pesquisadores responsáveis no telefone 2914-5576 (Dr. José Francisco de Sales Chagas e Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva). Lembrando que o Sr. não é obrigado a responder todas perguntas do questionário ficando ao seu critério respondê-las ou não. Você, também, poderá retirar o consentimento para pesquisa em qualquer época e sua recusa ou aceitação em participar não alterará em nada em seu tratamento.

CONFIDENCIALIDADE DOS REGISTROS

Nesse estudo somente suas iniciais e um número especial do estudo identificarão você.

Caso os resultados do estudo sejam publicados ou apresentados em congresso médico a confidencialidade das informações serão garantidas e sua identidade não será revelada.

TERMO DE PARTICIPAÇÃO E ASSINATURA

Eu aceito participar do estudo: "**Polimorfismos em genes para enzimas antioxidantes dependentes de micronutrientes, estresse oxidativo e risco de câncer de cabeça e pescoço da cavidade oral e orofaringe**" e declaro que li e não tenho nenhuma dúvida sobre o esclarecido acima.

Autorizo também o uso das informações obtidas na pesquisa em publicações em revista médicas e apresentações em congressos (desde que meus dados pessoais sejam mantidos em sigilo).

Nome completo do Paciente

Assinatura do Paciente

Anexo 5 - TCLE - Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Hospital Heliópolis

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ESTUDO 2 (TRANSVERSAL) – GRUPO DE ESTUDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Nome do Paciente:.....
Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....Nº:.....Apto:.....
Bairro:.....Cidade:.....
CEP:.....Telefone:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa:

"Polimorfismos em genes para enzimas antioxidantes dependentes de micronutrientes, estresse oxidativo e risco de câncer de cabeça e pescoço"

2. Pesquisador:

Thomas Prates Ong (Professor Doutor do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental - FCF/USP)

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Risco Mínimo (**X**) Risco Médio () Risco Baixo () Risco Maior ()

4. Duração da Pesquisa: **36 meses**

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

Prezado senhor,

Meu nome é Thomas Prates Ong, sou professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), e estou convidando-o para participar de um projeto de pesquisa que estou desenvolvendo com médicos e pesquisadores do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis. A pesquisa também conta com a colaboração de pesquisadores das Faculdades de Ciências Farmacêuticas e Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Nesta pesquisa serão incluídos homens com câncer de cabeça e pescoço. Para se avaliar se uma alimentação pobre em micronutrientes como selênio e zinco, junto com certas características na sequência do DNA, poderia influenciar o aparecimento do câncer, serão realizados testes genéticos (DNA) e testes de laboratório no seu sangue e urina.

Se o senhor aceitar participar do estudo, precisarei do seu consentimento e de uma amostra de sangue e urina que serão coletadas no 5º andar do Hospital Heliópolis, no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia. Um profissional de enfermagem realizará uma única coleta de 20 mL de seu sangue, sendo que o senhor deverá estar em jejum de 12 horas. O senhor poderá sentir alguma dor no local da punção e/ou tontura e poderá ser formada uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. Os materiais utilizados (seringas e agulhas) são descartáveis e esterilizados. Com sua amostra de sangue, será realizado um exame para avaliar diferenças na sequência do DNA de cada indivíduo (polimorfismos), nos genes das enzimas glutathione peroxidase e cobre-zinco superóxido dismutase. Estas enzimas dependem da presença do selênio e zinco, que são micronutrientes por serem necessários em pequenas quantidades para o funcionamento do corpo humano. O selênio está presente principalmente na castanha-do-brasil (castanha-do-pará), em peixes, carnes e cereais. O zinco é encontrado nas carnes vermelhas, frango, peixe e cereais. Essas enzimas ajudam na proteção do organismo contra radicais livres, que causam dano nas

células e no DNA. Também serão avaliados nessa mesma amostra de sangue o funcionamento das enzimas glutathione peroxidase e cobre-zinco superóxido dismutase, bem como a quantidade de selênio, zinco e radicais livres.

Além do sangue, será coletada uma única amostra de 50 mL de sua urina no período da manhã, que não precisa ser a primeira urina do dia, para avaliação da quantidade de radicais livres. Será fornecido um frasco descartável e esterilizado para que o senhor faça a coleta de urina. Também serão solicitadas informações pessoais e de seu consumo de alimentos, e serão feitas medidas de seu corpo como peso, altura e gordura do corpo (dobras cutâneas). Para medir a gordura de seu corpo, um profissional treinado irá pressionar um pequeno aparelho chamado adipômetro na gordura no seu braço direito, costas e barriga. O senhor poderá sentir um leve desconforto durante a medição, devido à leve e rápida pressão do aparelho.

Sua amostra de DNA será armazenada no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis, sob responsabilidade da Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva, e suas amostras de sangue e urina serão armazenadas no Laboratório de Dieta Nutrição e Câncer da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo sob minha responsabilidade. Essas amostras (DNA, sangue e urina) serão mantidas em banco de materiais biológicos sem a identificação de seu nome, pois será utilizado código para identificação, e a amostra poderá ser utilizada para pesquisas futuras que estejam relacionadas com o câncer de cabeça e pescoço. Se isso ocorrer, o novo projeto de pesquisa será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e do Hospital Heliópolis, e então, o senhor será consultado a respeito.

O senhor autoriza o armazenamento das amostras (DNA, sangue e urina) para pesquisas futuras? () SIM () NÃO

Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão colaborar no entendimento dos fatores que influenciam o aparecimento do câncer de cabeça e pescoço.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

O senhor terá as informações sobre os procedimentos, e benefícios relacionados ao estudo, além do acesso aos resultados das análises que serão realizadas.

O senhor e/ou seu responsável têm a liberdade de abandonar a pesquisa em qualquer momento, sem que haja qualquer prejuízo para o mesmo.

Os resultados obtidos na pesquisa serão mantidos em sigilo, preservando sua privacidade.

Não haverá nenhuma despesa ou recompensa financeira para o senhor e/ou seu responsável na participação desta pesquisa.

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

Caso o senhor tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, ou se tiver alguma lesão ou doença relacionada à pesquisa, você poderá entrar em contato com o Prof. Thomas Prates Ong (tel. 30913630) ou com as pesquisadoras Luciana Nishimura ou Suzana Bressan (tel 30913625).

VI – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

“Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - Av Prof Lineu Prestes, 580 – Bloco 13A – São Paulo – SP– Telefone: 3091-3677 – e-mail: cepfcf@usp.br”. Comitê de Ética em Pesquisas do Hospital Heliópolis – Rua Cônego Xavier, 276, São Paulo – SP -Tel. 27476000 – email: “cep@hospitalheliopolis.org.br”

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Estudo II

Participação no estudo: **"Polimorfismos em genes para enzimas antioxidantes dependentes de micronutrientes, estresse oxidativo e risco de câncer de cabeça e pescoço da cavidade oral e orofaringe"**.

Nome do Paciente: _____
Número: _____ Data: _____

NATUREZA E OBJETIVO DO ESTUDO

Meu nome é José Francisco de Sales Chagas, Cirurgião de Cabeça e Pescoço, e estou convidando-o para participar de um projeto de pesquisa que estou desenvolvendo com médicos e pesquisadores do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis. A pesquisa também conta com a colaboração de pesquisadores das Faculdades de Ciências Farmacêuticas e Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Nesta pesquisa serão incluídos homens com câncer de cabeça e pescoço da cavidade oral e orofaringe para se avaliar se uma alimentação pobre em micronutrientes como selênio e zinco, junto com certas características no DNA, poderia influenciar o aparecimento do câncer.

PROCEDIMENTO DO ESTUDO

A) Será coletada uma única amostra de 20mL de sangue, sendo que o senhor deverá estar em jejum de 12 horas. O senhor poderá sentir alguma dor no local da punção e/ou tontura e poderá ser formada uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. Os materiais utilizados (seringas e agulhas) são descartáveis e esterilizados.

B) Será coletada uma única amostra de 50 mL de sua urina no período da manhã, que não precisa ser a primeira urina do dia. Será fornecido um frasco descartável e esterilizado para que o senhor faça a coleta de urina.

C) Serão feitas perguntas sobre suas informações pessoais e do seu consumo de alimentos, e serão feitas medidas de seu corpo como peso, altura e gordura do corpo.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Estes materiais serão armazenados no Laboratório de Biologia Molecular para a pesquisa científica. O uso destes materiais não implicará riscos adicionais para você, nem exigirá que se submeta a qualquer outro procedimento.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis e todo estudo que vier a utilizar este material será previamente apresentado à apreciação deste Comitê.

Não haverá benefícios imediatos decorrentes desta pesquisa para os participantes. Apesar disso, os resultados poderão beneficiar, no futuro, outros pacientes.

Se os resultados obtidos em relação à análise genética trouxerem benefícios em relação ao diagnóstico ou prognóstico da doença, asseguraremos o contato com os pacientes envolvidos. Caso se faça necessário, também será realizado o aconselhamento genético, conforme a resolução no. 347 do Conselho Nacional de Saúde (13 de janeiro de 2005).

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, assine este termo de consentimento e em caso de dúvida ligue para os pesquisadores responsáveis no telefone 2914-5576 (Dr. José Francisco de Sales Chagas e Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva). Lembrando que o Sr. não é obrigado a responder todas perguntas do questionário ficando ao seu critério respondê-las ou não. Você, também, poderá retirar o consentimento para pesquisa em qualquer época e sua recusa ou aceitação em participar não alterará em nada em seu tratamento.

CONFIDENCIALIDADE DOS REGISTROS

Nesse estudo somente suas iniciais e um número especial do estudo identificarão você.

Caso os resultados do estudo sejam publicados ou apresentados em congresso médico a confidencialidade das informações serão garantidas e sua identidade não será revelada.

TERMO DE PARTICIPAÇÃO E ASSINATURA

Eu aceito participar do estudo: "**Polimorfismos em genes para enzimas antioxidantes dependentes de micronutrientes, estresse oxidativo e risco de câncer de cabeça e pescoço da cavidade oral e orofaringe**" e declaro que li e não tenho nenhuma dúvida sobre o esclarecido acima.

Autorizo também o uso das informações obtidas na pesquisa em publicações em revista médicas e apresentações em congressos (desde que meus dados pessoais sejam mantidos em sigilo).

Nome completo do Paciente

Assinatura do Paciente

Anexo 7

RECORDATÓRIO DO CONSUMO ALIMENTAR (24 horas)

Nome: _____ Data: ____/____/____

[illegible]

* **D** = desjejum; **L** = Lanche manhã; **A** = Almoço; **M**= Lanche tarde; **J** = Jantar; **C** = Ceia; **F** = fora de hora