



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO



ROBERTA REZENDE ROSA

Polimorfismos de nucleotídeo único em genes de metalotioneína e o risco de carcinoma epidermoide oral em uma população brasileira

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Doutor em Odontologia na Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2016

ROBERTA REZENDE ROSA

Polimorfismos de nucleotídeo único em genes de metalotioneína e o risco de carcinoma epidermoide oral em uma população brasileira

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Doutor em Odontologia na Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso
Co-orientadora: Prof. Dr^a. Paula Cristina Batista de Faria

Banca examinadora:
Prof. Dr. Adriano Mota Loyola
Prof^a. Dra. Karen Renata Nakamura Hiraki
Prof^a. Dra. Carla Silva Siqueira
Prof^a. Dra. Mirna Scalon Cordeiro

Uberlândia
2016.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R788p
2016

Rosa, Roberta Rezende, 1987

Polimorfismos de nucleotídeo único em genes de metalotioneína e o risco de carcinoma epidermoide oral em uma população brasileira / Roberta Rezende Rosa. - 2016.

115 p. : il.

Orientador: Sérgio Vitorino Cardoso.

Coorientadora: Paula Cristina Batista de Faria.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia.

1. Odontologia - Teses. 2. Boca - Câncer - Teses. 3. Polimorfismo (Genética) - Teses. 4. Metalotioneína - Teses. I. Cardoso, Sérgio Vitorino. II. Faria, Paula Cristina Batista de, 1981-. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.314

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, José Afonso e Cleunice, que são meu porto seguro, os meus maiores incentivadores, que nunca mediram esforços para me ajudarem. Obrigada por toda compreensão, paciência e carinho! Palavras não são suficientes para descrever meu amor e gratidão a vocês! Eu amo muito vocês!

A minha irmã, Renata, pelos conselhos, mimos e apoio. Obrigada por sempre estar presente quando eu preciso e por entender as minhas ausências! Te amo muito! E ao meu cunhado Alaor, por sempre cuidar da nossa família com tanto carinho.

A minha sobrinha Ana Clara, por ser luz em minha vida. Por sempre tornar todos os momentos mais leves e trazer tanta alegria para nossas vidas. Tia te ama muito!

Ao meu amor, Roberto, meu companheiro, meu amigo, meu xará, minha paixão. Obrigada por estar sempre ao meu lado, independente da distância física que algumas vezes nos separa. Seu amor, carinho e apoio foram fundamentais para a conclusão de mais essa etapa. Te amo muito!

Aos meus sogros Roberto e Célia e meu cunhado Rafael por todo apoio mesmo que distante, que torceram muito pelo meu sucesso.

Agradeço a Deus por iluminar os meus passos e me cercar de pessoas de bem para que mais uma etapa fosse vencida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Sérgio Vitorino Cardoso, agradeço a oportunidade e a confiança. Obrigada pela paciência, dedicação e pelo incentivo de sempre. Sua capacidade de produzir e transmitir conhecimento com seriedade e respeito são fontes de inspiração para mim. MUITÍSSIMO obrigada!

À minha co-orientadora Prof. Paula Cristina Batista de Faria, por todos os ensinamentos, paciência e dedicação ao nosso estudo. Obrigada por todos os conselhos e por não me deixar desistir. Você me fez enxergar a biologia molecular com outros olhos. Muito obrigada por tudo!

Ao prof. Adriano Loyola pela convivência, confiança e parceria na idealização e desenvolvimento das pesquisas.

Ao prof. Luiz Ricardo, pela disponibilização do Laboratório de Nanobiotecnologia para realização das pesquisas e por toda atenção a mim dedicada.

Aos amigos do Doutorado, pela convivência e companheirismo durante todo esse período.

Aos amigos do Laboratório de Patologia: João Paulo, Luiz Fernando, Gabriela, Flávia, Marília. Obrigada por todos os momentos de ajuda mútua, pelas risadas nos momentos de descontração e pelos anseios e dúvidas compartilhados. Cada um, da sua maneira, contribuiu para que eu chegasse até aqui.

A todo pessoal do PROCEDE – Oncologia, e funcionários do Hospital Odontológico, pela ajuda e incentivo nas coletas de sangue.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia, Adalci, Ângela e Lúbia, por toda ajuda prestada e pela amizade construída.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Nanobiotecnologia: Aline, Jéssica, Victor, Izabella, Patrícia, Emília, Mayara e Hebréia. A amizade de vocês foi fundamental para continuar seguindo em frente, principalmente quando tudo teimava em dar errado.

Aos alunos de graduação em Odontologia, José Francisco, Marcelo, Thayane e Livia e também em Biomedicina, Letícia, Luciana e Elisa que tive o prazer de conviver. Espero ter contribuído para a formação de vocês.

Ao Prof. Durighetto, meu orientador de Mestrado, que há anos confiou na minha capacidade, abriu as primeiras portas na Estomatologia, sempre incentivando meu aprimoramento e me fez (e faz) gostar, ainda mais, da área acadêmica. Serei eternamente grata a você.

Às secretárias da Pós-Graduação em Odontologia, Graça e Brenda, que sempre estiveram dispostas em ajudar.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (FOUFU).

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de Doutorado.

Aos professores da FOUFU, em especial do Programa de Pós-graduação.

E a todos familiares e amigos, que direta ou indiretamente contribuíram e torceram para que eu chegasse até aqui. Que entenderam a minha ausência em certos momentos, e que ficaram felizes em saber que concluí mais esta etapa. Muito obrigada de coração!

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 2 |
| RESUMO..... | 5 |
| ABSTRACT | 8 |
| 1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO..... | 10 |
| CARCINOMA EPIDERMOIDE | 10 |
| METALOTIONEÍNA | 11 |
| Denominação e estrutura..... | 11 |
| Fatores que influenciam a expressão proteica de metalotioneína | 15 |
| POLIMORFISMOS GENÉTICOS..... | 15 |
| Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) | 16 |
| SNP nos genes de metalotioneína e risco de câncer | 17 |
| 2. HIPÓTESE | 20 |
| 3. CAPÍTULOS | 22 |
| CAPÍTULO 1 | 22 |
| Impact of metallothionein gene polymorphisms on the risk of oral squamous cell carcinoma in a Brazilian population..... | 22 |
| CAPÍTULO 2 | 41 |
| Carcinoma epidermoide de boca em mulheres: estudo descritivo de casuística em um centro de referência oncológica | 41 |
| CAPÍTULO 3 | 58 |
| Polimorfismos de nucleotídeo único e risco de tumores de glândula salivar: revisão de literatura | 58 |
| 4. CONCLUSÃO..... | 73 |
| 5. REFERÊNCIAS..... | 75 |
| ANEXOS | 79 |
| 7.1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA | 79 |
| 7.2 – NORMAS DO PERIÓDICO 1 | 80 |
| 7.3 – NORMAS DO PERIÓDICO 2 | 81 |
| 7.4 – NORMAS DO PERIÓDICO 3..... | 82 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA - *bovine serum albumin*

CEO - Carcinoma epidermoide oral

CGS – Carcinoma de glândula salivar

CI – *confidence interval*

CID – Classificação Internacional das Doenças

CYP1A1 - citocromo P450, família 1, membro A1

DNA - *deoxyribonucleic acid*

EDTA - *ethylenediamine tetra-acetic acid*

Fe²⁺ - ferro (II)

Fe³⁺ - ferro (III)

GSTM1 - glutationa S-transferase

HCU – Hospital de Clínicas de Uberlândia

LD – *linkage disequilibrium*

mRNA – *Messenger ribonucleic acid*

MT – Metalotioneína

OR - *odds ratio*

OSCC - *oral squamous cell carcinoma*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

qPCR – *quantitative PCR (Polymerase Chain Reaction)*

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA - *ribonucleic acid*

SGT - *Salivary gland tumors*

SNP - *single nucleotide polymorphism*

TGS – Tumor(es) de Glândula Salivar

TGSb – Tumor de glândula salivar benignos

TNM – Sistema TNM de Classificação de Tumores Malignos

UV – *ultra-violet*

Resumo

RESUMO

O carcinoma epidermoide é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral. O consumo crônico de cigarro e bebidas alcoólicas são os principais fatores de risco para essa doença, porém a resposta celular frente à presença de carcinógenos depende de diversos fatores, inclusive de variações genéticas. Metalotioneínas são proteínas que atuam na proteção celular contra toxicidade de metais pesados e radicais livres, e ainda considerada importante na proliferação celular e na apoptose. O objetivo principal desse estudo foi investigar a possível influência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em genes de metalotioneína (MT) sobre o risco de carcinoma epidermoide oral (CEO). O estudo tipo caso-controle de base hospitalar demonstrou que o SNP rs11076161, localizado na região de intron de MT1A, apresentou associação com o risco de CEO. Os indivíduos portadores do genótipo AA desse polimorfismo aparentam maior predisposição à ocorrência desse tumor. Ao se verificar também uma óbvia escassez de informações sobre o CEO em mulheres, foi realizada uma investigação complementar, de natureza descritiva, sobre esse tema. Foram identificadas peculiaridades na casuística avaliada, em especial a menor proporção frente ao esperado de mulheres pardas e na sexta década de vida, bem como maior número de casos em mulheres dentre os pacientes com lesões em gengiva. A análise comparativa de sobrevida entre homens e mulheres mostrou sobrevida superior para as mulheres, porém essa diferença não se mostrou significativa. Tais características devem ser melhor avaliadas em estudos posteriores para que sua importância biológica e clínica seja melhor esclarecida. Finalmente, foi realizada também uma revisão da literatura em busca de trabalhos que já tenham investigado a influência de SNP sobre o risco dos tumores de glândula salivar, de forma a favorecer a realização de investigações posteriores sobre o tema. A informação disponível atualmente sobre a frequência e a relevância das variações genéticas envolvidas na susceptibilidade aos tumores de glândula salivar ainda é muito restrita, porém promissora visto que diversos potenciais fatores genéticos de risco já foram identificados. Por outro lado, a patogênese molecular dos tumores de glândula salivar provavelmente será melhor compreendida ao

analisar os diversos polimorfismos genéticos combinados com fatores ambientais. Além disso, os resultados mostram que o fator de susceptibilidade de uma população pode não se repetir em outra, justificando a necessidade de estudos na população brasileira.

Abstract

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma is the most common malignancy of the oral cavity. The main risk factors for this disease are chronic consumption of tobacco and alcohol, but the cellular response against carcinogens depends on several factors, including genetic variations. Metallothionein are proteins that have been implicated in a number of functions, including cellular protection against heavy metal toxicity and free radicals, and it is important in cell proliferation and apoptosis. The aim of this study was to investigate the possible influence of single nucleotide polymorphisms (SNP) in genes metallothionein (MT) on the risk of oral squamous cell carcinoma (OSCC). The study case-control hospital-based demonstrated that SNP rs11076161, located in intron region of MT1A, was associated with the risk of OSCC. Carriers of AA genotype of this polymorphism seem more prone to the occurrence of this tumor. It was verified paucity of information about the OSCC occurrence in women. Then, further investigation was carried out, to describe on this topic. Peculiarities in the analyzed sample were identified, especially the lowest proportion of brown skinned women and in the sixth decade of life than expected, as well as increased number of women among patients with gums lesions. The survival comparative analysis between men and women showed higher survival rate for women, but this difference was not significant. These features should be better evaluated in future studies to further clarify their biological and clinical importance. Finally, it was also carried out a literature review in search of studies that have investigated the influence of SNP on the risk of salivary gland tumors in order to facilitate further research on the subject. The currently available information on the frequency and relevance of the genetic variants involved in susceptibility to salivary gland tumors is still very restricted, but seen promising because several potential genetic risk factors have been identified. On the other hand, the molecular pathogenesis of salivary gland tumors will be better understood by analyzing the genetic polymorphisms combined with various environmental factors. In addition, the results showed that susceptibility of one population may not be the same in another population, justifying the necessity of studies in the Brazilian population.

Introdução e Referencial Teórico

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

CARCINOMA EPIDERMOIDE

O carcinoma epidermoide constitui cerca de 90% de todas as neoplasias malignas da boca, as quais representam a quinta forma mais comum de câncer em homens brasileiros (INCA 2015). No Brasil, o carcinoma epidermoide oral (CEO) é uma das neoplasias malignas mais comuns, em todas as regiões do país, com risco estimado de 11,3 novos casos a cada 100.000 homens e 4,2 a cada 100.000 mulheres no ano de 2016 (INCA, 2016). É uma doença grave, cujo tratamento resulta muitas vezes em morbidade e mortalidade significativas. Recorrência locorregional é a causa mais comum de óbito, e de fato apenas metade dos pacientes sobrevive após cinco anos do tratamento inicial (Jerjes *et al.* 2012; Zavras *et al.* 2011).

Além do reconhecimento da gravidade do carcinoma epidermoide oral (CEO), é importante que se conheça também suas causas. Nesse sentido, o consumo crônico de cigarro e bebidas alcoólicas são os principais fatores de risco para essa doença (Goldstein *et al.* 2011; Saman 2012; Scully e Bagan 2009). Radiação ultravioleta, para tumores em lábios, principalmente, (Czerninski, Zini, e Sgan-Cohen 2010), papiloma vírus (HPV) relacionados com tumores de orofaringe e ainda (Huber e Tantiwongkosi 2014), imunossupressão (Demarosi *et al.* 2005), consumo de betel (Huber e Tantiwongkosi 2014; Saman 2012) ou mate (Dasanayake, Silverman, e Warnakulasuriya 2010) e condição socioeconômica (Conway *et al.* 2008; Ribeiro e Nardocci 2013), dentre outros, também são considerados iniciadores e/ou promotores de CEO. Por outro lado, a resposta celular frente à presença de carcinógenos depende ainda de diversos fatores, sendo reconhecidamente importantes certas características intrínsecas ao paciente.

Nesse contexto, a investigação de polimorfismos em genes relacionados à ativação ou inativação de compostos com potencial genotóxico tem sido uma das principais áreas de estudo da susceptibilidade individual a tumores. Para o CEO, por exemplo, um dos marcadores de susceptibilidade

polimórfica mais consistente é o genótipo nulo da glutathione S-transferase (GSTM1), uma enzima importante na desintoxicação, metabolização de carcinógenos, cuja ação protege contra o dano ao DNA (Tripathy e Roy 2006). Outro marcador de susceptibilidade reconhecido é a variante polimórfica do gene *CYP1A1* (citocromo P450, família 1, membro A1), o qual codifica uma enzima responsável por catalisar diversas reações no metabolismo de drogas e que é expressa pela indução de alguns carcinógenos do cigarro (Bandeira *et al.* 2014) (Jefferies *et al.* 1999).

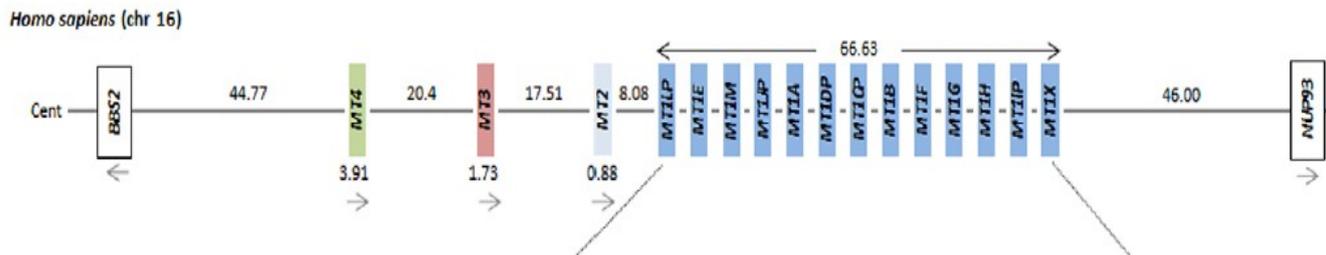
METALOTIONEÍNA

Denominação e estrutura

Metalotioneína (MT) é a denominação dada a proteínas intracelulares de baixo peso molecular, ricas em cisteína, com alta afinidade por íons metálicos, encontradas de procarionotos aos seres humanos (Babula *et al.* 2012). As MT atuam na proteção celular contra a toxicidade de metais pesados e radicais livres, função que parece estar relacionada à sua capacidade de estocar e fornecer metais, especialmente o zinco, a outras moléculas na célula. São ainda consideradas importantes na proliferação celular e na apoptose (Babula *et al.* 2012; Davis e Cousins 2000; Miles *et al.* 2000; Namdarghanbari *et al.* 2011; Pedersen *et al.* 2009).

Em mamíferos, são conhecidas quatro subfamílias de genes codificantes de MT, denominadas *MT1*, *MT2*, *MT3* e *MT4*. Todos estão agrupados em sequência (*tandem*) no cromossomo 16. Essa diversidade filogenética parece ter se iniciado pela duplicação de um gene ancestral, originando *MT4* - encontrado apenas em mamíferos - e outro gene comum; desse último separou-se *MT3*, e finalmente *MT1* e *MT2* divergiram. Apenas em mamíferos, o gene *MT1* sofreu duplicações que resultaram em várias isoformas, com maior número delas tendo sido observado em primatas. Em humanos, são conhecidas 13 isoformas de *MT1*, denominadas *MT1A* a *MT1J*, *MT1L*, *MT1M*, e *MT1X* - dos quais *MT1C*, *MT1D*, *MT1I*, *MT1J*, e *MT1L* são aparentemente inativos, ou “pseudogenes”. *MT2* codifica uma proteína que é

eventualmente denominada como MT2A em humanos, mas não existe mais que uma isoforma. Os genes *MT2*, *MT3* e *MT4* se apresentam como genes singulares em todos os mamíferos, e são todos expressos (Moleirinho *et al.* 2011).



Fonte: Figura retirada Moleirinho *et al.*, 2011

Existem diferenças importantes na expressão dos genes de *MT* entre os vários tecidos humanos. Expressão disseminada pelo maior número de tecidos é observada para *MT2A*, *MT1X* e *MT1E*; *MT1G* e *MT1F* são ainda expressos de forma menos disseminada, mas ainda sim estão presentes na maioria dos tecidos, enquanto *MT1A* e *MT1B* são expressas em poucos tecidos (Moleirinho *et al.* 2011). Embora *MT3* tenha sido inicialmente descrita apenas em tecido neural (Romero-Isart *et al.* 2002), sua expressão também foi identificada em grande parte dos tecidos (Moleirinho *et al.* 2011). Estudos relacionados à expressão de *MT4* em tecidos humanos são escassos, tendo sido descrita em epitélio pavimentoso estratificado, cérebro, testículo, timo e esôfago (Laukens *et al.* 2009; Moleirinho *et al.* 2011; Quaife *et al.* 1994).

Todos os genes funcionais de *MT* codificam cadeias peptídicas que invariavelmente apresentam 20 cisteínas, divididas em dois domínios – α e β –, os quais podem se ligar a até três e quatro íons metálicos, respectivamente. Em afinidade decrescente, as *MT* podem se ligar a cádmio, chumbo, cobre, mercúrio, zinco, prata, níquel e cobre. A maior parte das *MT* se liga a zinco, cádmio e cobre pela maior abundância dos mesmos em contextos normais (Kondoh *et al.* 2003; Waalkes, Harvey, e Klaassen 1984). *MT1* e *MT2* são formadas por 61 resíduos de aminoácidos. *MT3* possui um resíduo extra no domínio β , considerado importante para sua atividade neuroinibitória, e uma

inserção de seis resíduos no domínio α . MT4 possui um resíduo adicional e distinto no domínio β (Moleirinho *et al.* 2011). Observa-se ainda diferença quanto a modificações pós-transducionais, tipo de íon metálico incorporado e velocidade de degradação. Suas funções e, principalmente, ocorrência nos tecidos também variam significativamente (Hamer 1988; Moleirinho *et al.* 2011).

As MT se localizam primariamente no citoplasma e em organelas tais como mitocôndrias e lisossomos (Baird, Kurz, e Brunk 2006; Banerjee, Onosaka, e Cherian 1982), onde parecem ser relevantes para a regulação da permeabilidade da membrana mitocondrial interna e para as reações peroxidativas intralisossomais catalisadas por ferro (Baird, Kurz, e Brunk 2006; Simpkins *et al.* 1998). Na presença de estresse oxidativo, MT atravessa os poros nucleares, sofre oxidação e retorna para o citosol (Babula *et al.* 2012). Essa translocação provavelmente está relacionada à proteção contra genotoxicidade e apoptose, bem como transcrição gênica durante diferentes etapas do ciclo celular (Apostolova, Ivanova, e Cherian 2000; Chen *et al.* 2006; Formigari, Irato, e Santon 2007). Parte da ação genoprotetora de MT deriva de sua interação com zinco (Jourdan *et al.* 2002; Ogra *et al.* 2008).

As MT desencadeiam diferentes efeitos no organismo mediante interação com outras proteínas. Por exemplo, atua na manutenção da homeostase por meio do armazenamento e transferência de metais essenciais como zinco e cobre às metaloproteínas, inclusive enzimas e fatores de transcrição. Atua na proteção contra metais tóxicos e radicais livres, pela ligação a essas moléculas, prevenindo o dano às estruturas celulares (detoxificação). Por outro lado, a interação das MT com ferritina pode ser perigosa, pois causa a redução de íons Fe^{3+} armazenado na ferritina e a liberação de Fe^{2+} que é prejudicial às células (Zalewska, Trefon, e Milnerowicz 2014).

Como as MT não distinguem sua ação protetora em células normais ou em células neoplásicas, o efeito resultante pode ser diverso. Em células normais agredidas por carcinógenos, variações na expressão de MT podem influenciar significativamente a probabilidade de transformação neoplásica. Em

tumores, a superexpressão de MT pode resultar em pior prognóstico para o paciente (Cardoso *et al.* 2002; Cherian, Jayasurya, e Bay 2003).

Reatividade imunohistoquímica para MT em carcinomas epidermóides orais (CEO) foi primeiramente relatada por Sundelin *et al.* (1997) em uma pequena série de carcinomas linguais classificados como T1 ou T2 pelo sistema TNM. Em seguida, Muramatsu *et al.* (2000) confirmaram essa observação e ainda relataram que a reatividade para MT não era diferente entre amostras obtidas antes ou depois de radioterapia ou quimioterapia. Esse resultado foi contrastante com o de Nakano *et al.* (2003), que relataram aumento de expressão das formas MT1 e MT2 após tratamento com cisplatina em cultura primária de queratinócitos obtida a partir de carcinomas de língua. Em 2002, foi relatado pela primeira vez que a superexpressão de MT se relaciona a pior prognóstico para pacientes com CEO (Cardoso *et al.* 2002), observação essa que foi corroborada posteriormente por outros grupos (Szelachowska *et al.* 2009; Theocharis *et al.* 2011).

Lee *et al.* (2008) relataram que expressão elevada de MT1 se associa a metástases linfonodais em casos de CEO derivados do uso de betel. Esse achado é similar ao relatado por (Szelachowska *et al.* 2009), que em uma casuística não associada à betel relataram correlação entre a proporção de células com reatividade citoplasmática e envolvimento linfonodal. Entretanto, Theocharis *et al.* (2011) não tenham identificado relação entre metástases linfonodais e superexpressão ou compartimentalização da reatividade para MT em células malignas, mas relataram associação significativa entre reatividade no epitélio adjacente ao carcinoma e ausência de disseminação linfonodal, e também com menor profundidade de invasão.

Brazão-Silva *et al.* (2015) descreveram que a expressão de mRNA de metalotioneína é significativamente alterada em CEO, quando comparadas a mucosas orais não neoplásicas. Tal estudo verificou redução significativa de MT1A, MT1X, MT3 e MT4, e sugeriu uma função supressiva de tumor da MT na carcinogênese oral. Genes específicos como MT1X, MT3 e MT1G podem contribuir para o conhecimento do perfil metastático e avaliação de prognóstico dos pacientes com CEO.

Embora a MT tenha sido bastante estudada no contexto da progressão tumoral (comportamento biológico, prognóstico e resposta ao tratamento) do CEO, ainda são escassas as investigações sobre sua participação no surgimento dessa doença. Tais estudos mostram que ocorre aumento da reatividade imunoistoquímica para MT em lesões cancerizáveis, como a leucoplasia (Darling *et al.* 2012; Johann *et al.* 2008; Pontes *et al.* 2009). Considerando que as funções da MT estão relacionadas à proteção celular, inclusive contra genotoxicidade, tal investigação se torna essencial para esclarecer a patogênese do CEO.

Fatores que influenciam a expressão proteica de metalotioneína

Uma variedade de estímulos diferentes pode induzir a expressão de MT, incluindo a presença de metais, hormônios, citocinas, produtos químicos, inflamação e estresse (Carpenè, Andreani, e Isani 2007; Miles *et al.* 2000). Em humanos, as isoformas são reguladas de forma independente uma da outra. Por exemplo, metais induzem todas as isoformas ativas de MT, enquanto glicocorticoides induzem apenas as isoformas MT2A e MT1E (Miles *et al.* 2000; Zalewska, Trefon, e Milnerowicz 2014).

Está bem documentado que a expressão dos genes humanos de MT é regulada ao nível transcricional (Li *et al.* 2006; Vašák 2005). A região promotora de *MT1* e *MT2* contém vários elementos responsivos a metais (MREs), elementos responsivos a glicocorticoides, e também elementos determinantes da transcrição basal (Heuchel *et al.* 1994)(Vašák e Meloni 2011). Entretanto, existe também evidência de controle pós-transcricional da expressão de MT que é tanto metal específica, quanto isoforma específica. (Haq, Mahoney, e Koropatnick 2003; Vasconcelos *et al.* 1996).

POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Variações na sequência natural do DNA podem ocorrer de várias formas: substituições de única base, inserção ou deleção de um ou vários nucleotídeos, alterações no número de sequências repetitivas, e mudanças maiores na estrutura do cromossomo. Essas variações são identificadas como mutações quando apresentam consequências mais drásticas para o organismo, muitas vezes resultando em doenças. Por outro lado, polimorfismos resultam em variações mais discretas, mas ainda sim relevantes por contribuírem na modulação da resposta celular frente a estímulos ambientais e dessa forma modular o risco de doenças multifatoriais, como o câncer. Por serem mais graves, mutações seriam também menos frequentes nas populações, ao passo que polimorfismos seriam mais facilmente preservados ao longo da evolução. Conceitualmente, variações gênicas com frequência superior a 1% na população normal são definidas como polimorfismos, ou como mutações quando apresentam frequência abaixo de 1%. (Balasubramanian *et al.* 2004).

Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP)

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do Inglês “single-nucleotide polymorphism”) são o tipo mais comum de variação genética. Nessa condição, conceitualmente, duas bases alternativas ocorrem com uma frequência considerável (> 1%) na população (Wang *et al.* 1998). Alguns autores têm considerado potencialmente relevantes apenas as variantes polimórficas prevalentes em pelo menos 10% da população (Yang *et al.* 2008).

O efeito de um SNP em região codificadora do genoma pode ser classificado como sinônimo ou não-sinônimo. O polimorfismo será sinônimo quando ele não afeta a sequência da proteína, enquanto o não-sinônimo altera a sequência de aminoácidos do produto protéico final. O SNP não-sinônimo pode ser ainda de dois tipos: missense, que resulta em um códon que codifica um aminoácido diferente, ou nonsense, quando resulta em códon de parada prematuro. Os SNP missense podem resultar em proteína não funcional, e os SNP nonsense originam uma proteína truncada, incompleta e geralmente não-funcional (Raudenska *et al.* 2014). SNP também ocorrem em regiões não

codificantes do genoma, podendo afetar o processo de *splicing*, modificar a ação de fatores de transcrição, alterar a degradação de RNA mensageiro ou a sequência de RNA não codificante (Raudenska *et al.* 2014).

SNP nos genes de metalotioneína e risco de câncer

Os genes de MT apresentam numerosos SNP, e a frequência dos mesmos varia em diferentes populações. Não há informações sobre a frequência de polimorfismos nos genes de MT na população brasileira. Moleirinho *et al.* (2011) abordaram o conhecimento disponível na plataforma Ensembl sobre SNP nos diversos genes de MT. Variantes não-sinônimas foram identificadas em *MT1*, *MT2* e *MT4*, mas nenhuma em *MT3*. Potenciais variantes deletérias, definidas como aquelas que introduzem aminoácidos aromáticos e capazes de inativar a proteína, foram identificadas em *MT1B* (rs61744104, Cys19Ser) e em *MT4* (rs666636, Cys30Tyr; rs666647, Arg31Trp).

O significado de polimorfismos nos genes de MT na determinação do risco de câncer ainda é pouco explorado, mas há evidência de que podem ser relevantes. Por exemplo, polimorfismo na região promotora do gene *MT2A* (rs28366003) pode afetar (reduzir) a expressão de *MT2*, e a consequente redução na proteção celular parece aumentar o risco de câncer de próstata (Forma *et al.* 2012; Krześlak *et al.* 2013) e mama (Krześlak *et al.* 2012). Outros polimorfismos em MT relacionados ao risco de câncer têm sido relatados (Starska *et al.* 2014; Wong *et al.* 2012; Zavras *et al.* 2011).

Apenas um único estudo taiwanês (Zavras *et al.* 2011) investigou possíveis associações entre risco de câncer da mucosa oral e polimorfismos nos genes *MT1*. Neste trabalho, a população avaliada apresenta altos índices de consumo de noz areca, considerado importante fator de risco para desenvolvimento de CEO, mas que não é encontrado na população brasileira. Polimorfismos em outros genes de MT, especialmente em *MT2A* e *MT1F*, descritos como potencialmente relevantes para cânceres derivados de

ectoderme, (Ex.: câncer de mama) (Jasani e Schmid, 1997) ainda não foram avaliados em CEO.

Frente ao exposto, este trabalho teve como foco principal investigar a possível influência de certos SNP em genes de MT sobre o risco de CEO, gerando um estudo tipo caso-controle de base hospitalar. Tendo verificado também uma óbvia escassez de informações sobre essa doença em mulheres, foi realizado também uma investigação complementar, de natureza descritiva, sobre esse tema. Finalmente, foi realizada também uma revisão da literatura em busca de trabalhos que já tenham investigado a influência de SNP sobre o risco dos tumores de glândula salivar, de forma a favorecer a realização de investigações posteriores sobre o tema, também ainda muito pouco explorado.

Hipótese

2. HIPÓTESE

O risco de desenvolvimento de carcinoma epidermoide oral é influenciado por polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nos genes de metaloteioneína.

Capítulo 1

3. CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1

Artigo para publicação no periódico *Journal of Oral Pathology & Medicine*

Impact of metallothionein gene polymorphisms on the risk of oral squamous cell carcinoma in a Brazilian population

Authors:

Roberta Rezende Rosa^a

Marcelo Augusto Garcia Junior^a

Patrícia Terra Alves^b

Elisa Moraes Sousa^b

Letícia Santos Pimentel^b

Luciana de Paula Barbosa^b

Adriano Mota Loyola^a

Luiz Ricardo Goulart^b

Paula Cristina Batista de Faria^b

Sérgio Vitorino Cardoso^a

^a Area of Pathology - School of Dentistry – Federal University of Uberlândia.

^b Laboratory of Nanobiotechnology – Genetic and Biochemical Institute – Federal University of Uberlândia.

Corresponding Author:

Sérgio Vitorino Cardoso

Federal University of Uberlândia

School of Dentistry

Area of Pathology

Av. Pará, nº 1.720

CEP: 38.405-320

Phone: +55 (34) 3225-8118

e-mail: sv.cardoso@ufu.br

ABSTRACT

Background: The aim of this work was to investigate the possible association between the risk of oral squamous cell carcinoma (OSCC) and the frequency of selected single-nucleotide polymorphisms (SNP) related to metallothionein genes in a Brazilian population-based case-control study.

Methods: All participants provide a blood sample as well as information on covariates or risk factors for OSCC, including tobacco and alcohol consumption. Genotyping was performed by PCR-RFLP analysis to determine the SNP rs8052334 (*MT1-B* gene), rs964372 (*MT-1B*) and rs1610216 (*MT2-A*), and by TaqMan single-nucleotide polymorphism genotyping assays for rs11076161 (*MT-1A*).

Results: Polymorphism in *MT-1A* was associated with increased risk for OSCC, since carriers of the G allele were less prone to experience OSCC development than subjects with the ancestral AA genotype ($p < 0.05$). No significant association was observed between the SNP rs1610216, rs964372 or rs8052334 and the OSCC occurrence. Haplotype analysis of *MT* genetic polymorphisms did not reveal a strong linkage disequilibrium (LD) in haplotype block with the selected SNP.

Conclusions: Genetic polymorphisms in the *MT* genes may affect susceptibility to oral cancer.

Key-words: Oral squamous cell carcinoma; polymorphism; metallothionein.

INTRODUCTION

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the most frequent cancers in the human male population world-wide, with approximately two-thirds of all cases occurring in developing countries, and has been associated with great morbidity and mortality (1–4).

It has been widely accepted that the main risk factor for OSCC development is the long term exposure to carcinogens such as tobacco and alcohol (2,5–7). There is a dose-response relationship between oral cancer risk and the amount of tobacco and alcohol consumed, with the combined impact being greater than their individual effects (2,8). Although, certain subsets of individuals may be more susceptible to acquiring cancer if their inherent ability to respond to oxidative and oncogenic stress is compromised (8). Despite the knowledge of carcinogens, there is a number of individuals who are not exposed to these risk factors and develop cancer. Therefore it is important to investigate additional susceptibility factors.

Metallothioneins (MT) are cysteine-rich, metal-binding, low molecular weight, intracellular proteins that have multiple functions, such as free radical scavenging and detoxification of heavy metals (9–12). MT are also known to participate in cell proliferation and apoptosis, which are very important processes in carcinogenesis. In recent years, variations of MT expression has been linked to carcinogenesis, tumor progression, and resistance to cancer treatment (13,14). Human MT genes consist of four subfamilies, *MT1* to *MT4*, found in chromosome 16 (15). Studies have demonstrated increased expression of *MT1/2* mRNA in various human tumors (16,17), including OSCC (18–23). Alterations in the expression of MT isoforms have been related to distinct behavior (metastasis and prognosis) for oral tumors (24).

Single nucleotide polymorphisms (SNP) can alter gene expression or protein activity, and have been proposed to play an important role in the susceptibility to cancer (25,26). Evidence suggests that genetic variations in MT may influence the risk to develop oral cancer (8,27). To our knowledge there is only one previous study (8) reporting association of SNP in *MT1* genes and the risk of OSCC, but none investigating SNP in the *MT2* gene.

The aim of this work was to investigate the possible association between the risk of OSCC and the frequency of selected SNP related to *MT1A*, *MT1B*, and *MT2* genes in a Brazilian population-based case-control study.

MATERIAL AND METHODS

Study population

This is a case-control study that was previously approved by Human Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlândia, Brazil. Written informed consent forms were signed by all participants, in compliance with the principles of the Declaration of Helsinki.

All participants were recruited from the Dental Clinics of the Federal University of Uberlândia between January 2014 and December 2015. The group of cases was composed of 28 non-related patients, whose adhere to the following criteria for participation: (1) diagnosis of intraoral squamous cell carcinoma (ICD-10-CM C01-06), (2) negative history of other types of primary cancers, and (3) negative history of second primary or recurrent oral cancer. The control group comprised 45 unrelated healthy volunteers in the same age range, without self-reported history of cancer at any site.

All subjects were personally interviewed to obtain information on age, gender, tobacco and alcohol consumption, and familial history of any type of cancer. Race/ethnicity was self-reported; smokers were defined as persons who had smoked more than 100 cigarettes in their lifetime; and drinkers were defined as persons who had used alcohol at least once a week for more than 1 year.

Genotyping

Peripheral venous blood samples donated from each volunteer were initially placed in tubes containing EDTA (ethylenediamine tetra-acetic acid) and stored at 4°C. Genomic DNA was isolated from whole blood using a Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's recommendations. The quality and concentration of the DNA extracts was assessed by spectrophotometry using NanoDrop™

(Thermo Scientific) and by electrophoresis on 0.8% agarose gel with ethidium bromide-stained.

This study considered four SNP in MT genes: rs11076161 (located on the position 56639236 in the chromosome 16, at the first intron region of the *MT1A* gene), rs964372 (position 56652118 at the first intron region of *MT-1B*), rs8052334 (position 56652906 at the second intron region of *MT1-B*), and rs1610216 (position 56608372 UTR variant of the 5' UTR of *MT2-A*). Selection of these polymorphisms reflected their potential effect on the gene transcription rate or previously reported association with the risk of cancer (8,28–32). All results were confirmed by duplicated assays.

For the SNP in the *MT1A* gene genotyping was performed by TaqMan® SNP genotyping assay (Applied Biosystems, USA, C_25996927_10), according to manufacturer's instructions. The real-time PCR reaction consisted of an initial denaturation step at 95°C for 10min, followed by 40 cycles, each consisting 95°C for 15s, for denaturation step, and 60°C for 1min for annealing/extension.

The other SNP were genotyped by the method of PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The initial PCR reactions were performed using 2mM of MgCl₂, 100µM of dNTP, 1.5U of Taq DNA Platinum Polymerase (Invitrogen, Burlington, Canada), 10X PCR buffer, 0.5 µL of each primer (forward and reverse) and 100ng of genomic DNA in a final volume of 25µL. Primers, enzymes and products are described in Table 1 (29,33). The PCR conditions included an initial denaturation step at 95°C for 5 minutes, followed by 35 cycles, denaturation step at 95°C for 1 min, annealing step at 61-63°C for 1 min, extension step at 72°C for 1 min and final extension step at 72°C for 10 min. RFLP analysis was performed on 20µL: specific buffer, 2µg/µL bovine serum albumin (BSA) and each of the respective PCR products (1µg) by subjecting them to 5U of each restriction enzymes, during three hours at 25 or 37°C (for SmaI or HaeIII, respectively) according to the manufacturer's protocol (both from Promega, Madison, USA)(29,33). The restriction fragments were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gel and ethidium bromide-stained and visualized by a UV transluminator.

Statistical data analysis

Distribution of patients between case and control groups was tested with χ^2 test with 1 degree of freedom. For the purpose of analysis, the reference allele was defined as the most frequent one (34–36). To verify if the allele distribution for each SNP was in Hardy-Weinberg equilibrium in healthy controls, we used a χ^2 test with 1 degree of freedom. To assess the association between each polymorphism and the risk of oral cancer, odds ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (CIs) were calculated using conditional logistic regression models adjusted for potential confounders (age, sex, smoking, drinking, and familial history of any type of cancer) These analyses were performed with BioEstat 5.0 (37). Linkage disequilibrium (LD) coefficients were assessed for pairs of alleles between the two sites of *MT* polymorphisms, and haplotype blocks were defined by using the default setting of Haploview software (38). Values of p below 0.05 would be considered significant.

RESULTS

Table 2 shows clinical and demographic data of the patients. The mean of age was 54 years in both groups. Men, smokers, and alcohol abusers were prevalent among cases and controls. Positive familial history of cancer was prevalent among controls, but not in the group of cases.

Allelic and genotype distributions for *MT* polymorphisms are summarized in Table 3. For the SNP rs11076161, carriers of the G allele were less prone to experience OSCC development than subjects with the ancestral AA genotype ($p < 0.05$). No significant association was observed between the SNP rs1610216, rs964372 or rs8052334 and the OSCC occurrence.

Results of pair-wise linkage disequilibrium (LD) analysis with these four SNP by Haploview software are shown in Fig. 1. Haplotype analysis of *MT* genetic polymorphisms did not reveal a strong LD in haplotype block with the selected SNP. Genotype distributions fit the Hardy-Weinberg equilibrium (p value > 0.05) except to rs1610216 ($p < 0.05$). The haplotype frequency of rs11076161/ rs964372/ rs8052334 in OSCC patients and controls are listed in Table 4. Only

one haplotype (GACT) showed significant difference when compared with all others haplotypes, suggesting increased risk for OSCC.

DISCUSSION

The present study observed that subjects with MT-1 rs11076161 AA genotype seem to be more predisposed to develop OSCC. This SNP is a polymorphism in the first intron of MT1A. A Chinese study revealed that the MT-1 rs11076161 was positively associated with type 2 diabetes with neuropathy (33). In the Chinese population, another study showed that MT-1A rs11076161 was associated with higher cadmium blood concentrations and it influenced the toxicity of cadmium on renal function (39). To our knowledge, this is the second study to analyze an association of SNP in MT with the risk of OSCC, but the first one that is not related with areca quid use. Areca nut consumption is also considered as a risk factor to OSCC, but it is more common in eastern countries. In a Taiwanese population (where 77,5% of patients reported areca quid chewing), a study revealed that rs11076161 A, rs964372 C and rs7191779 C alleles were protective against OSCC and rs8052394 A alleles were associated with increased risk (8).

A study found that polymorphism rs8052334 was in strong LD with the rs964372 and rs8052394 genotype, and the rs8052394/rs964372/rs8052334 haplotype was a susceptibility marker for hepatocellular cancer in the Taiwan population, and no statistical difference was showed to rs11076161 (28). On the other hand, the present study in addition to finding association regarding the SNP rs11076161 with the risk of OSCC, it does not find a strong LD between analyzed SNP.

Metallothionein expression has been demonstrated to be induced by several factors including metals, glucocorticoids, lipopolysaccharides, steroid hormones, cytokines, inflammation, and stress (40,41). Moreover, some carcinogens especially from tobacco smoking, also triggers MT overexpression (22).

SNP in MT genes can affect the transcription of the gene. Abnormal expression of MT affect related molecules dependent on heavy metal supplies, such as p53, and further lead to continued oxidative stress (42,43), and these alterations can influence carcinogenesis (44). SNP within introns (especially those near intron-exon junctions) can affect alternative splicing and therefore the production of different protein isoforms (45). However, the functional result of alternative splicing in the MT1-A gene has not been elucidated yet (46).

SNP may increase sensitivity to metal toxicity and oxygen-free radicals (47,48). It can reduce cellular activities of MT and affect mechanisms regulating cell proliferation, apoptosis, as well as response to oxidative stress and lead to continued production of chronic inflammatory condition. Prolonged exposure to inflammatory cytokines is thought to induce oncogenesis by different signaling pathways (49,50) and thus may potentially influence susceptibility to various types of cancers (13,30,31,47,48). Although the most important source of p53 alteration is by mutation in *TP53*, found in more than half of OSCC cases, zinc removal by overexpressed MT may be an epigenetic event that links carcinogens to inactivation of p53 and subsequent malignant progression (8,42). We previously demonstrated by immunohistochemical analysis a positive correlation between metallothionein and p53; and concomitant overexpression of both, predicted shorter survival for patients with advanced OSCC (42).

The sample of OSCC cases of this study showed lower frequency of smokers relative to former smokers or nonsmokers, but information on alcohol drinking and cigarette smoking was presented as “yes” or “no”, not enabling to perform a more detailed analysis. In addition, these data were self-reported, so some patients may have been reluctant to report the real conditions of their substance use.

Both the techniques used in the present study, RFLP-PCR and real-time PCR (TaqMan® Genotyping) were specific for genotyping the SNP and did not show any disagreement within the duplicates performed. The real-time PCR was fastest and easiest to perform, however this method requires a Taqman probe and a commercial kit that only works in a specific (and expensive) type of

thermal cycler. The RFLP required a longer run-time due to the two stages: PCR reaction and incubation with restriction enzymes. Despite the time-consuming, the equipments required for RFLP are routinely used in most molecular biology laboratories and its results were easier to analyze (51).

Taking into account these findings, genetic polymorphisms in the MT genes may affect susceptibility to oral cancer. Although confirmation of our results in other populations will be necessary, the results of this study are consistent with other study suggesting the potential role of MT in oral carcinogenesis. Pending further validation, MT genotypes may have a significant clinical utility in screening and risk assessment.

References

1. JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, HAO Y, XU J, MURRAY T, *et al.* Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008;58(2):71–96.
2. JERJES W, UPILE T, RADHI H, PETRIE A, ABIOLA J, ADAMS A, *et al.* The effect of tobacco and alcohol and their reduction/cessation on mortality in oral cancer patients: short communication. *Head Neck Oncol.* BioMed Central Ltd; 2012;4(1):6.
3. LEE CC, HO HC, SU YC, CHEN PC, YU CH, YANG CC. Comparison of different comorbidity measures for oral cancer patients with surgical intervention: A longitudinal study from a single cancer center. *Auris Nasus Larynx.* Elsevier Ireland Ltd; 2015 Nov;(901).
4. van MONSJOU HS, SCHAAPVELD M, HAMMING-VRIEZE O, de BOER JP, van den BREKEL MWM, BALM AJM. Cause-specific excess mortality in patients treated for cancer of the oral cavity and oropharynx: A population-based study. *Oral Oncol.* Elsevier Ltd; 2015;52:37–44.
5. LAZARUS P, PARK JY. Metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol.* 2000;36(5):421–31.
6. LIN WJ, JIANG RS, WU SH, CHEN F, LIU SA. Smoking, Alcohol, and Betel Quid and Oral Cancer: A Prospective Cohort Study. *J Oncol.* 2011;2011:1–5.
7. SCHWARTZ SM, DOODY DR, FITZGIBBONS ED, RICKS S, PORTER PL, CHEN C. Oral squamous cell cancer risk in relation to alcohol consumption and alcohol dehydrogenase-3 genotypes. *Cancer EpidemiolBiomarkers Prev.* 2001;10(11):1137–44.
8. ZAVRAS A I, YOON A J, CHEN MK, LIN CW, YANG SF.

- Metallothionein-1 genotypes in the risk of oral squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(5):1478–83.
9. CARPENÈ E, ANDREANI G, ISANI G. Metallothionein functions and structural characteristics. *J Trace Elem Med Biol*. 2007;21(SUPPL. 1):35–9.
 10. THIRUMOORTHY N, MANISENTHIL KUMAR KT, SUNDAR AS, PANAYAPPAN L, CHATTERJEE M. Metallothionein: An overview. *World J Gastroenterol*. 2007;13(7):993–6.
 11. VAŠÁK M. Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol*. 2005;19(1 SPEC. ISS.):13–7.
 12. YANG CC, CHEN HI, CHIU YW, TSAI CH, CHUANG HY. Metallothionein 1A polymorphisms may influence urine uric acid and N-acetyl-beta-d-glucosaminidase (NAG) excretion in chronic lead-exposed workers. *Toxicology*. Elsevier Ireland Ltd; 2013;306:68–73.
 13. FORMA E, KRZESLAK A, WILKOSZ J, JOZWIAK P, SZYMCZYK A, ROZANSKI W, *et al*. Metallothionein 2A genetic polymorphisms and risk of prostate cancer in a Polish population. *Cancer Genet*. Elsevier Inc.; 2012;205(9):432–5.
 14. NAMDARGHANBARI M, WOBIG W, KREZOSKI S, TABATABAI NM, PETERING DH. Mammalian metallothionein in toxicology, cancer, and cancer chemotherapy. *J Biol Inorg Chem*. 2011;16(7):1087–101.
 15. MOLEIRINHO A, CARNEIRO J, MATTHIESEN R, SILVA RM, AMORIM A, AZEVEDO L. Gains, losses and changes of function after gene duplication: Study of the metallothionein family. *PLoS One*. 2011;6(4):1–9.
 16. DZIEGIEL P. Expression of metallothioneins in tumor cells. *Pol J Pathol*. 2004;55(1):3–12.
 17. THEOCHARIS SE, MARGELI AP, KOUTSELINIS A. Metallothionein: a multifunctional protein from toxicity to cancer. *Int J Biol Markers*. 2003;18(3):162–9.
 18. SUNDELIN K, JADNER M, NORBERG-SPAACK L, DAVIDSSON A, HELLQUIST HB. Metallothionein and Fas (CD95) are expressed in squamous cell carcinoma of the tongue. *Eur J Cancer*. 1997;33(11):1860–4.
 19. MURAMATSU Y, HASEGAWA Y, FUKANO H, OGAWA T, NAMUBA M, MOURI K, *et al*. Metallothionein immunoreactivity in head and neck carcinomas; special reference to clinical behaviors and chemotherapy responses. *Anticancer Res*. 2000;20(1A):257–64.
 20. CARDOSO S, BARBOSA H, CANDELLORI I, LOYOLA A, AGUIAR M. Prognostic impact of metallothionein on oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 2002;441(2):174–8.

21. THEOCHARIS S, KLIJANIENKO J, GIAGINIS C, RODRIGUEZ J, JOUFFROY T, GIROD A, *et al.* Metallothionein expression in mobile tongue squamous cell carcinoma: Associations with clinicopathological parameters and patient survival. *Histopathology*. 2011;59(3):514–25.
22. LEE SS, YANG SF, HO YC, TSAI CH, CHANG YC. The upregulation of metallothionein-1 expression in areca quid chewing-associated oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2008;44(2):180–6.
23. SZELACHOWSKA J, DZIEGIEL P, JELEN-KRZESZEWSKA J, JELEN M, TARKOWSKI R, SPYTKOWSKA B, *et al.* Correlation of metallothionein expression with clinical progression of cancer in the oral cavity. *Anticancer Res*. 2009 Feb;29(2):589–95.
24. BRAZÃO-SILVA MT, RODRIGUES MFS, EISENBERG ALA, DIAS FL, DE CASTRO LM, NUNES FD, *et al.* Metallothionein gene expression is altered in oral cancer and may predict metastasis and patient outcomes. *Histopathology*. 2015;67(3):358–67.
25. Nature Genetics Editorial. Risk loci, biological candidates and biomarkers. *Nat Genet*. 2008 Mar;40(3):257.
26. YE Y, YANG H, BARTON GROSSMAN H, DINNEY C, WU X, GU J. Genetic variants in cell cycle control pathway confer susceptibility to bladder cancer. *Cancer*. 2008;112(11):2467–74.
27. PEDERSEN MØ, LARSEN A, STOLTENBERG M, PENKOWA M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog Histochem Cytochem*. 2009 Apr;44(1):29–64.
28. WONG RH, HUANG CH, YEH CB, LEE HS, CHIEN MH, YANG SF. Effects of Metallothionein-1 Genetic Polymorphism and Cigarette Smoking on the Development of Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2013 Jun 18;20(6):2088–95.
29. KRZEŚLAK A, FORMA E, JÓŹWIAK P, SZYMCZYK A, SMOLARZ B, ROMANOWICZ-MAKOWSKA H, *et al.* Metallothionein 2A genetic polymorphisms and risk of ductal breast cancer. *Clin Exp Med*. 2012 Feb 6;14(1):107–13.
30. KRZEŚLAK A, FORMA E, CHWATKO G, JÓŹWIAK P, SZYMCZYK A, WILKOSZ J, *et al.* Effect of metallothionein 2A gene polymorphism on allele-specific gene expression and metal content in prostate cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;268(3):278–85.
31. KRZEŚLAK A, FORMA E, JÓŹWIAK P, SZYMCZYK A, SMOLARZ B, ROMANOWICZ-MAKOWSKA H, *et al.* Metallothionein 2A genetic polymorphisms and risk of ductal breast cancer. *Clin Exp Med*. 2014;14(1):107–13.
32. STARSKA K, KRZEŚLAK A, FORMA E, OLSZEWSKI J, LEWY-TREND A I, OSUCH-WÓJCIKIEWICZ E, *et al.* Genetic polymorphism of metallothionein 2A and risk of laryngeal cancer in a Polish population.

- Med Oncol. 2014;31(7).
33. YANG L, LI H, YU T, ZHAO H, CHERIAN MG, CAI L, *et al.* Polymorphisms in metallothionein-1 and -2 genes associated with the risk of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(5):E987–92.
 34. BALASUBRAMANIAN SP, COX A, BROWN NJ, REED MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *Eur J Surg Oncol.* 2004;30(6):593–601.
 35. YATES A, AKANNI W, AMODE MR, BARRELL D, BILLIS K, CARVALHO-SILVA D, *et al.* Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D710–6.
 36. AUTON A, ABECASIS GR, ALTSHULER DM, DURBIN RM, ABECASIS GR, BENTLEY DR, *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015 Sep 30;526(7571):68–74.
 37. AYRES M, AYRES JR M, AYRES DL, SANTOS AAS. *BioEstat–aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Versão 5.0.* Belém: Ong Mamiraua; 2007.
 38. BARRETT JC, FRY B, MALLER J, DALY MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005 Jan 15;21(2):263–5.
 39. LEI L, CHANG X, RENTSCHLER G, TIAN L, ZHU G, CHEN X, *et al.* A polymorphism in metallothionein 1A (MT1A) is associated with cadmium-related excretion of urinary beta 2-microglobulin. *Toxicol Appl Pharmacol.* Elsevier Inc.; 2012;265(3):373–9.
 40. BREMNER I. Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Experientia Suppl.* 1987;52:81–107.
 41. MILES A T, HAWKSWORTH GM, BEATTIE JH, RODILLA V. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2000;35(1):35–70.
 42. CARDOSO SV, SILVEIRA-JÚNIOR JB, MACHADO VDC, DE-PAULA AMB, LOYOLA AM, AGUIAR MCF. Expression of metallothionein and p53 antigens are correlated in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2009 Apr;29(4):1189–93.
 43. PONTES H, DE AQUINO XAVIER F, DA SILVA T, FONSECA F, PAIVA H, PONTES F, *et al.* Metallothionein and p-Akt proteins in oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med.* 2009 Sep;38(8):644–50.
 44. LIM D, JOCELYN KMX, YIP GWC, BAY BH. Silencing the Metallothionein-2A gene inhibits cell cycle progression from G1- to S-phase involving ATM and cdc25A signaling in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2009 Apr 8;276(1):109–17.

45. CARTEGNI L, CHEW SL, KRAINER AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet.* 2002 Apr;3(4):285–98.
46. MEHUS AA, MUHONEN WW, GARRETT SH, SOMJI S, SENS DA, SHABB JB. Quantitation of Human Metallothionein Isoforms: A Family of Small, Highly Conserved, Cysteine-rich Proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2014 Apr 1;13(4):1020–33.
47. RAUDENSKA M, GUMULEC J, PODLAHA O, SZTALMACHOVA M, BABULA P, ECKSCHLAGER T, *et al.* Metallothionein polymorphisms in pathological processes. *Metallomics.* 2014;6(1):55–68.
48. SEIBOLD P, HALL P, SCHOOF N, NEVANLINNA H, HEIKKINEN T, BENNER A, *et al.* Polymorphisms in oxidative stress-related genes and mortality in breast cancer patients - Potential differential effects by radiotherapy? *Breast.* Elsevier Ltd; 2013;22(5):817–23.
49. MIGNOGNA MD, FEDELE S, LO RUSSO L, LO MUZIO L, BUCCI E. Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in oral lichen planus: Is there any evidence? *Oral Oncol.* 2004;40(2):120–30.
50. O'BYRNE KJ, DALGLEISH A G. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *Br J Cancer.* 2001;85(4):473–83.
51. DELVAUX N, DA COSTA VD, DA COSTA MM, LAMPE E. Comparison of four methods of genotyping IL28B polymorphisms in chronic hepatitis C patients. *J Virol Methods.* Elsevier B.V.; 2015;220:1–4.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was supported by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) and Federal University of Uberlândia.

Table 1 – Primers, fragments, and restriction enzyme for each SNP (PCR-RFLP).

| SNP | Primers | PCR product size (bp) | Enzymes | Restriction fragment size (bp) |
|-----------------|----------------------------|-----------------------|---------|--------------------------------|
| rs1610216 (A/G) | 5'-GGCTCAGGTCGAGTACAGG-3' | 246 | SmaI | 114/132 |
| | 5'-AAGTCACTGCGGCTCCA-3' | | | |
| rs8052334 (T/C) | 5'-TGGGACACAAACCTCAAATG-3' | 227 | HaeIII | 90/137 |
| | 5'-TGATGAGCCTATGCAGACAC-3' | | | |
| rs964372 (C/G) | 5'-CACAGTGTCCCTGGGTTAG-3' | 180 | HaeIII | 86/94 |
| | 5'-TAGGTGGGTGACATGGAGC-3' | | | |

Table 2 - Clinical and demographic data of the patients.

| | Cases | Controls | <i>P</i> |
|--------------------------------|-------|----------|----------|
| Age | | | |
| ≤ 45 years | 4 | 10 | 0.60 |
| > 45 years | 24 | 35 | |
| Gender | | | |
| Male | 17 | 21 | 0.35 |
| Female | 11 | 24 | |
| Cigarette smoking | | | |
| Yes | 18 | 26 | 0.48 |
| No | 8 | 19 | |
| Alcohol drinking | | | |
| Yes | 24 | 19 | 0.001 |
| No | 4 | 26 | |
| Tumor site | | | |
| Tongue | 12 | - | - |
| Floor of the mouth | 3 | - | |
| Palate | 4 | - | |
| Gingiva | 2 | - | |
| Others | 3 | - | |
| No information | 4 | - | |
| Tumor size | | | |
| T1 and T2 | 9 | - | - |
| T3 and T4 | 9 | - | |
| No information | 10 | - | |
| Histopathological grade | | | |
| Poor differentiation | 2 | - | - |
| moderate differentiation | 5 | - | |
| Well differentiation | 6 | - | |
| No information | 15 | - | |
| Metastasis | | | |
| Without | 22 | - | - |
| Local (lymph nodes) | 4 | - | |
| Distant | 2 | - | |

Table 3 – Summary estimates of the main effects of selected SNP in MT gene region.

| SNP | Gene and effect | Allele ^a (MAF ^b) | HWE p^c | Number of subjects | | Genotype | OR | 95% CI | p | |
|------------|-------------------------------|---|-----------|--------------------|---------|----------|-----------------|--------|--------------|--------|
| | | | | Case | Control | | | | | |
| rs1610216 | <i>MT2</i> 5' UTR variant | A/G (0.274) | < 0.05 | | | AA | 1 (reference) | | - | |
| | | | | AA | 11 | 19 | AG | 1.94 | 0.58 – 6.50 | > 0.05 |
| | | | | AG | 9 | 8 | GG | 0.34 | 0.03 – 3.35 | > 0.05 |
| | | | | GG | 1 | 5 | AA vs (AG + GG) | 1.32 | 0.43 – 4.03 | > 0.05 |
| | | | | | | | (AA + AG) vs GG | 0.27 | 0.02 – 2.49 | > 0.05 |
| rs11076161 | <i>MT1A</i> intron variant | G/A (0.356) | 0.26 | | | GG | 1 (reference) | | - | |
| | | | | GG | 11 | 25 | GA | 0.90 | 0.27 – 2.96 | > 0.05 |
| | | | | GA | 6 | 15 | AA | 4.54 | 1.25 – 16.46 | 0.03 |
| | | | | AA | 10 | 5 | GG vs (GA + AA) | 1.81 | 0.69 – 4.78 | > 0.05 |
| | | | | | | | (GG + GA) vs AA | 4.70 | 1.40 – 15.85 | 0.01 |
| rs964372 | <i>MT1B</i> intron variant | G/C (0.184) | 0.72 | | | GG | 1 (reference) | | - | |
| | | | | GG | 13 | 25 | GC | 2.16 | 0.67 – 6.93 | > 0.05 |
| | | | | GC | 9 | 8 | CC | 1.92 | 0.11 – 33.33 | > 0.05 |
| | | | | CC | 1 | 1 | GG vs (GC + CC) | 2.13 | 0.69 – 6.56 | > 0.05 |
| | | | | | | | (GG + GC) vs CC | 1.50 | 0.08 – 25.28 | > 0.05 |
| rs8052334 | <i>MT1B</i> intron variant | C/T (0.438) | 0.30 | | | CC | 1 (reference) | | - | |
| | | | | CC | 8 | 14 | CT | 2.10 | 0.53 – 8.32 | > 0.05 |
| | | | | CT | 15 | 16 | TT | 1.28 | 0.29 – 5.55 | > 0.05 |
| | | | | TT | 4 | 9 | CC vs (CT + TT) | 1.72 | 0.47 – 6.31 | > 0.05 |
| | | | | | | | (CC + CT) vs TT | 1.33 | 0.46 – 3.81 | > 0.05 |

^a – Reference allele / variant allele (35).

^b – Minor allele frequency.

^c – Hardy-Weinberg Equilibrium, p -value in controls.

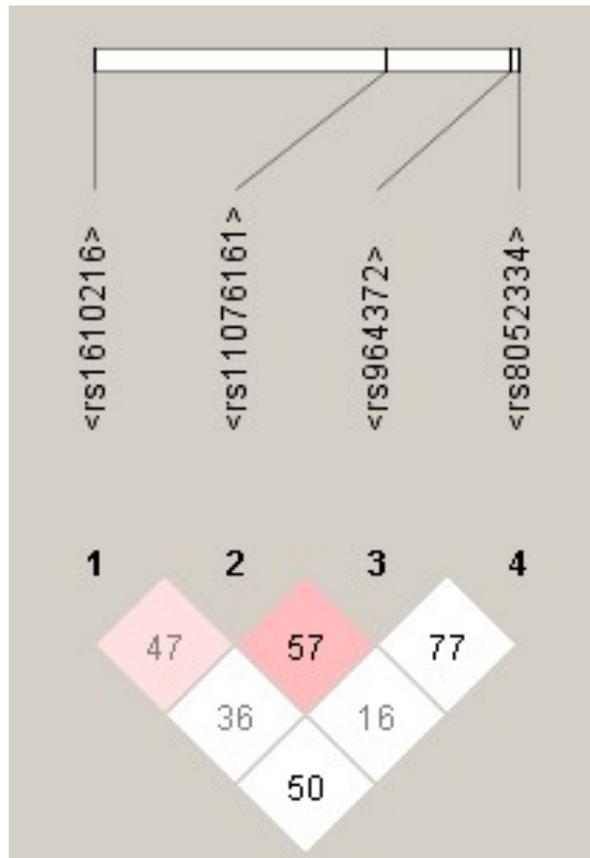


FIG. 1 Linkage disequilibrium (LD) and haplotype block structure of MT gene. The numbers in the squares represent the pairwise D' value. This plot was generated by the Haploview program (38).

Table 4 – Frequencies of MT haplotypes in OSCC patients and matched control subjects.

| Haplótipo | | | | Casos | Controles | OD | p |
|------------|------------|----------|-----------|-------|-----------|-----------------------|-------|
| rs1610216 | rs11076161 | rs964372 | rs8052334 | | | | |
| G | A | C | T | 6 | 2 | 1 (reference) | |
| A | G | G | T | 5 | 8 | 0.2 (0.02 – 1.46) | 0.18 |
| G | A | G | T | 2 | 5 | 0.13 (0.01 – 1.31) | 0.13 |
| G | G | G | T | 2 | 2 | 0.33 (0.02 – 4.18) | 0.54 |
| A | A | G | C | 1 | 3 | 0.11 (0.01 – 1.77) | 0.22 |
| A | G | C | T | 1 | 2 | 0.16 (0.01 – 2.98) | 0.49 |
| All Others | | | | 14 | 29 | 0.16 (0.02 – 0.90) | 0.04* |

Capítulo 2

CAPÍTULO 2

Artigo para publicação no periódico Cadernos de Saúde Pública.

Carcinoma epidermoide de boca em mulheres: estudo descritivo de casuística em um centro de referência oncológica

Oral squamous cell carcinoma in women: a descriptive study of a casuistry in an oncological reference centre

Carcinoma de células escamosas en mujeres: un estudio descriptivo del una casuística en un centro de referencia oncológica

Autores

Roberta Rezende Rosa*

roberta.rrosa@hotmail.com

Desenho e elaboração do estudo, análise e interpretação dos dados, revisão crítica do conteúdo e aprovação da versão final a ser publicada

José Francisco de Sousa Júnior*

josefsjr@gmail.com

Aquisição, análise ou interpretação dos dados e elaboração do estudo.

Marcelo Augusto Garcia Júnior*

marceloaugustojunior@gmail.com

Aquisição, análise ou interpretação dos dados.

Sérgio Vitorino Cardoso*

sv.cardoso@ufu.br

Desenho e elaboração do estudo, análise e interpretação dos dados, revisão crítica do conteúdo e aprovação da versão final a ser publicada

*Faculdade de Odontologia - Universidade Federal de Uberlândia

Área de Patologia Oral

Av. Pará, 1720 CEP: 38.405-320

Tel. (34) 3218-8118

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi descrever o perfil dos casos de mulheres com carcinoma epidermoide de boca, em comparação à apresentação em homens. Apresenta caráter observacional, transversal e retrospectivo, de base hospitalar. Foi realizado rastreamento de casos relativos às neoplasia malignas da boca e lábio, entre os anos de 2004 e 2013, no Hospital de Clínicas de Uberlândia. Foram identificados 186 homens e 58 mulheres com câncer de boca, resultando na proporção de 3,4 homens para cada mulher. A média de idade dos pacientes foi de 58,7 (\pm 11,9) anos para homens e 59,9 (\pm 13,4) anos para mulheres. Houve proporção significativamente reduzida de casos em mulheres na sexta década de vida, comparando com as demais décadas. Mulheres foram mais numerosas dentre os casos encontrados em gengiva. Na análise de sobrevida verificou-se declínio claramente mais abrupto entre os homens, todavia, essa diferença não se mostrou significativa. Em conclusão, o presente estudo identificou peculiaridades da casuística avaliada cuja importância biológica e clínica deve ser melhor esclarecida.

ABSTRACT

The aim of this study was to describe the profile of cases of women with oral squamous cell carcinoma, and compared it to men. This study was observational, cross-sectional and retrospective, hospital-based. Identification screening of cases relating to oral cancer and lip was conducted between 2004 and 2013, at Uberlândia Clinical Hospital. 186 male and 58 female patients were identified with cancer of the mouth, with ratio of 3.4 cases in men for every woman with the disease. The average age of patients was 58.7 (\pm 11.9) years for men and 59.9 (\pm 13.4) years for women. A significantly smaller proportion of cases in women, in the sixth decade of life compared to other decades was observed. Women were more prevalent among the cases found in gum. In survival analysis there was clearly more abrupt decline among men, however, this difference was not significant. In conclusion, this study identified some peculiarities whose biological and clinical significance should be further clarified.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue describir el perfil de los casos de mujeres con carcinoma de células escamosas oral, en comparación con la presentación en los hombres. Este estudio fue observacional, transversal y retrospectivo, basado en el hospital. Se llevó a cabo el cribado para la identificación de casos relacionados con la cancer de la boca y los labios, entre los años 2004 y 2013, en el Hospital Clínico del Uberlândia. 186 hombres y 58 mujeres fueron identificados con el cáncer de la boca, con una relación de 3,4 hombres por cada mujer. La edad media de los pacientes fue de 58,7 (\pm 11,9) años para los hombres y 59,9 (\pm 13,4) años para las mujeres. Se observó una proporción significativamente menor de las mujeres en la sexta década de la vida, en comparación con otros décadas. Las mujeres eran más numerosas entre los casos que se encuentran en las encías. En el análisis de supervivencia no fue claramente descenso más abrupto entre los hombres, sin embargo, esta diferencia no fue significativa. En conclusión, este estudio identificó algunas peculiaridades cuyo significado biológico y clínico debería ser más esclarecidos.

INTRODUÇÃO

Estima-se que 300.000 novos casos de câncer de boca surjam em todo o mundo a cada ano, resultando em cerca de 145.000 mortes pela doença no mesmo período¹. No Brasil, o câncer de boca é uma das neoplasias malignas mais comuns, em todas as regiões do país, com risco estimado de 11,3 novos casos a cada 100.000 homens e 4,2 a cada 100.000 mulheres no ano de 2016². Dentre os diversos tipos de câncer que acometem as estruturas da boca, o carcinoma epidermoide, também denominado carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular, é a neoplasia maligna mais comum³. Mais de dois terços do risco de desenvolvimento de câncer de boca pode ser atribuído ao tabagismo ou ao alcoolismo, e em especial ao uso combinado de tabaco e bebidas alcoólicas⁴. Para o câncer de lábio, a radiação ultravioleta parece ser o fator determinante⁵.

A doença se manifesta clinicamente como placas brancas (leucoplasias), vermelhas (eritroplasias) ou eritroleucoplásicas, ou ainda como tumorações exofíticas ou úlceras de bordos elevados e endurecidos⁶. Tais lesões podem aparecer em qualquer parte da boca, mas são mais comuns na língua, no soalho bucal e no lábio inferior. Evidência clínica de metástase regional para linfonodos cervicais é encontrada em cerca de um terço dos casos⁷.

É amplamente documentado na literatura que cerca de dois terços dos casos de carcinomas epidermoides de boca ocorrem em homens, fato que tem sido associado à maior exposição dos mesmos aos fatores de risco conhecidos⁸. Alguns estudos têm apontado, ao longo de décadas, aumento da proporção de mulheres dentre os casos da doença⁸⁻¹⁰. Entretanto, estudos que avaliaram períodos mais recentes mostram que o aumento na proporção de mulheres com câncer de boca tem sido mais claramente apontado apenas em alguns países, tais como França e Itália¹¹. No Brasil, a proporção de casos entre homens e mulheres tem se mantido estável em uma faixa de 2,5 a 3,0 casos em homens para cada mulher nos últimos treze anos^{2,12-17}. Por outro lado, essa desproporcionalidade faz com que as informações disponíveis sobre a doença mostrem mais claramente suas características em homens.

Dessa forma, características eventualmente discrepantes da doença nas mulheres, as quais podem ser eventualmente importantes para diagnóstico e tratamento, podem estar sendo mascaradas. De fato, possíveis variações na apresentação clínica e no comportamento biológico do carcinoma epidermoide de boca em mulheres tem sido escassamente abordadas na literatura internacional^{9,10,18}. Portanto, o presente estudo buscou descrever o perfil dos casos de mulheres com carcinoma epidermoide de boca, buscando possíveis diferenças desses casos em comparação à apresentação da doença em homens, em um centro de referência oncológica no Brasil.

MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo teve caráter observacional, transversal e retrospectivo, de base hospitalar, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (Parecer 942.173 de 2014).

Para rastreamento inicial de casos, foi realizada consulta ao Setor de Nosologia do Hospital de Clínicas de Uberlândia (HCU) para identificação de casos registrados com os códigos C01 até C06 da Classificação Internacional das Doenças, (CID-10-CM)¹⁹, relativos às neoplasia malignas da boca e lábio, atendidos entre janeiro de 2004 e dezembro de 2013. Em seguida, procedeu-se à consulta dos laudos histopatológicos desses casos para confirmação do diagnóstico de carcinoma epidermoide de boca. Dos casos assim selecionados foram então coletadas informações sobre os pacientes (gênero, idade e data de óbito ou de última consulta no HCU) e suas lesões (localização, estadiamento clínico e ano do diagnóstico). Para análise de sobrevida foram considerados apenas aqueles casos com acompanhamento (tempo entre diagnóstico e último atendimento) mínimo de 24 meses ou que tivessem evoluído a óbito nesse período. Todas as informações foram extraídas dos registros hospitalares digitais individuais dos pacientes avaliados.

Análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0. Teste *t* foi empregado para comparar a idade de pacientes homens e mulheres. Possíveis associações de características da doença com o gênero

dos pacientes foram investigadas com o teste de χ^2 . Curvas de Kaplan-Meier e teste de *log-rank* foram usados para comparação da sobrevida entre homens e mulheres. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foram identificados 186 pacientes homens e 58 mulheres com câncer de boca (respectivamente, 77 e 23% do total de 254 casos), resultando na proporção de 3,4 casos em homens para cada mulher acometida pela doença. Como mostrado na Figura 1, a maioria dos pacientes era de cor branca, sendo evidente também uma proporção significativamente reduzida de mulheres pardas. A idade dos pacientes na época do diagnóstico variou de 27 a 88 anos para homens e de 31 a 84 para as mulheres, com média de 58,7 ($\pm 11,9$) anos para homens e 59,9 ($\pm 13,4$) anos para mulheres ($p = 0,59$, teste *t*). Como se pode verificar na Figura 2, a maioria dos casos concentravam-se na sexta à sétima décadas de vida, todavia com discrepância notável na sexta década dada a proporção significativamente reduzida de casos em mulheres frente ao que se observou nas demais décadas. A distribuição dos casos quanto à localização anatômica das lesões é ilustrada na Figura 3. Em ambos os gêneros, a língua e em seguida o lábio inferior foram os sítios mais acometidos. Mulheres foram mais numerosas apenas dentre os casos encontrados em gengiva. Foram incluídos na análise de sobrevida 176 pacientes, cuja comparação gráfica entre os gêneros é apresentada na Figura 4. Verificou-se declínio claramente mais abrupto entre os homens, cuja mediana de sobrevida foi pouco superior a quatro anos contra mais de seis anos para as mulheres. Todavia, essa diferença não se mostrou significativa.

DISCUSSÃO

O presente trabalho buscou verificar possíveis diferenças no perfil do carcinoma epidermoide de boca entre homens e mulheres, bem como estimar o impacto da diferença de gênero no comportamento da doença. A proporção

aqui verificada de mulheres entre os pacientes com a doença, de 23% dos casos, é menor comparada ao que se observa em outros estudos^{9,20-22}. Além da diferença na proporção de casos entre homens e mulheres, estudos anteriores tem demonstrado que o câncer de boca apresenta características clínicas distintas entre tais grupos²³.

O tabagismo tem sido apontado como o principal fator de risco para essa doença⁴. Diversos autores apontam que o aumento proporcionalmente maior na quantidade de mulheres entre os tabagistas pode ser responsável por aumento no número de casos de câncer de boca entre as mesmas^{22,24}. Além disso, a proporção de mulheres fumantes é maior em países desenvolvidos¹⁰, de forma que a menor proporção de mulheres fumantes poderia ser uma explicação para a diferença na frequência de câncer de boca aqui observada. Todavia, não foi possível obter informações sobre exposição a fatores de risco dos casos aqui avaliados, em função da inexistência de tal registro na fonte de dados utilizada (registros hospitalares digitais). Não obstante, entre 1989 e 2012, estima-se que a proporção de brasileiros consumidores de tabaco tenha se reduzido quase à metade^{25,26}. Porém, no mesmo período, a proporção de mulheres entre os fumantes brasileiros manteve-se praticamente estável, em 38 e 35%, respectivamente. Portanto, tais valores são bem maiores do que a proporção de casos de câncer de boca entre mulheres verificada no presente estudo. É possível que o consumo de cigarros por mulheres seja proporcionalmente menor na região atendida pela instituição investigada (Hospital de Clínicas de Uberlândia), porém não foram encontrados dados sobre o consumo de cigarros nessa região.

De forma geral, e como observado neste estudo, a idade dos pacientes com câncer de boca é similar entre homens e mulheres^{10,18}. É frequente o relato de picos de incidência na sexta e sétima décadas de vida, e de fato mais de três quartos dos casos é usualmente diagnosticada após os 50 anos de idade^{9,25}. É importante destacar que a presente casuística mostrou uma discrepância evidente entre os casos diagnosticados em homens e mulheres na sexta década de vida, posto que havia um número muito pequeno das últimas dentre os casos, quando comparada às demais faixas etárias. Não foi

possível verificar relato semelhante na literatura. Como se trata de dado objetivo, não acreditamos tratar-se de erro de registro.

Na boca, o carcinoma epidermoide é mais comum na língua, como verificado neste estudo. Ao contrário, a mucosa da gengiva inserida e do palato é um dos sítios anatômicos em que essa doença é menor frequente. Como no presente estudo, há relatos de maior frequência de lesões nessa topografia em mulheres do que em homens²⁶, todavia com relatos também em sentido contrário²⁷.

Nos países ocidentais, brancos são maioria entre os pacientes afetados pelo câncer de boca²³, fato também verificado nesta casuística. Entretanto, foi observada uma proporção reduzida de mulheres pardas quando comparada àquela de homens pardos. A origem auto-declarada dessa informação pode ser responsável por tal discrepância, todavia desigualdades de gênero e etnia tem sido relatadas em relação à incidência e sobrevida para o carcinoma epidermoide de boca^{18,28}.

Na Índia se verifica que o câncer de boca surge mais precocemente e é excepcionalmente comum no fundo de vestibulo e mucosa de bochecha, em função do frequente hábito de uso de tabaco e betel²⁹. A infecção pelo papilomavírus humano também parece acarretar mudanças no perfil demográfico dos pacientes e na topografia das lesões, em especial pelo surgimento de lesões em orofaringe^{23,30}. Ainda, a proporção entre homens e mulheres é relativamente igual entre pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana³¹, e há relato sobre possível associação entre o uso de doxorubicina para tratamento de câncer de ovário e o desenvolvimento de câncer de boca como malignidade secundária³². Não foi encontrado nenhum caso com tais características no presente estudo, embora não seja possível excluir deficiência de registro de informação na fonte de dados utilizada.

Finalmente, a análise de sobrevida demonstrou prognóstico discretamente, porém não estatisticamente significativa, mais favorável para as mulheres. Ausência de diferenças prognósticas para o câncer de boca entre homens e mulheres já tem sido relatada²⁸, todavia fatores tais como o maior

cuidado das mulheres com a saúde podem favorecer o diagnóstico precoce e a menor frequência e gravidade de comorbidades

Em conclusão, o presente estudo identificou peculiaridades da casuística avaliada, em especial a menor proporção frente ao esperado de mulheres pardas e na sexta década de vida, bem como maior número de casos em mulheres dentre os pacientes com lesões em gengiva. Tais características devem ser melhor avaliadas em estudos posteriores para que sua importância biológica e clínica seja melhor esclarecida.

AGRADECIMENTO

Este trabalho obteve apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

REFERÊNCIAS

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J Clin.* 2015;65(2):87–108.
2. INCA. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. 2015.
3. Barnes LEJ, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology & Genetics Head and Neck Tumours IARC. 2005.
4. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, *et al.* Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(2):541–50.
5. Moore SR, Johnson NW, Pierce a M, Wilson DF. The epidemiology of tongue cancer: a review of global incidence. *Oral Dis.* 2000;6(2):75–84.
6. Neville BW, Day T. Oral Cancer and Precancerous Lesions. *CA – A Cancer J Clin.* 2002;52(4):195–215.
7. Shah JP, Candela FC, Poddar AK. The Patterns of cervical lymph node

- metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer*. 1990;66(1):109–13.
8. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. Elsevier Ltd; 2009;45(4-5):309–16.
 9. Kruse AL, Bredell M, Grätz KW. Oral cancer in men and women: Are there differences? *Oral Maxillofac Surg*. 2011;15(1):51–5.
 10. Zavras AI, Shanmugam P, Shetty D, Dolecek TA, Kaste LM. Oral and pharyngeal cancer in women. *Dent Clin North Am*. 2013;57(2):339–55.
 11. Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol*. 2014;50(5):387–403.
 12. INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. 2002.
 13. INCA. Estimativa 2005: Incidência de Câncer no Brasil. Vol. 1. 2004.
 14. INCA. Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil. 2005.
 15. INCA. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. 2007.
 16. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. In Rio de Janeiro: Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer; 2009. p. 98.
 17. INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. 2014.
 18. Joseph LJ, Goodman M, Higgins K, Pilai R, Ramalingam SS, Magliocca K, *et al*. Racial disparities in squamous cell carcinoma of the oral tongue among women: A SEER data analysis. *Oral Oncol*. Elsevier Ltd; 2015;51(6):586–92.
 19. OMS. Organização Mundial da Saúde. CID-10: Classificação Estatística Internacional de Doenças. Organização Mundial da Saúde.; 1994.
 20. Marocchio LS, Lima J, Sperandio FF, Corrêa L, Sousa SOM De. Oral squamous cell carcinoma : an analysis of 1 , 564 cases showing advances in early detection. *J Oral Sci*. 2010;52(2):267–73.
 21. Antunes AA, Takano JH, Queiroz TC, Vidal AK de L. Oral cancer epidemiological profile at CEON/HUOC/UPE and HCP. *Odontol clín cient*. 2003;2(3):181–6.
 22. Lortet-Tieulent J, Renteria E, Sharp L, Weiderpass E, Comber H, Baas P, *et al*. Convergence of decreasing male and increasing female incidence rates in major tobacco-related cancers in Europe in 1988-2010. *Eur J*

- Cancer. Elsevier Ltd; 2015;51(9):1144–63.
23. Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, Couch ME, Weissler M, Hackman T, *et al.* Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol.* 2011;29(11):1488–94.
 24. Brown LM, Check DP, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence trends by subsite in the United States: Changing gender patterns. *J Oncol.* 2012;2012.
 25. Monteiro CA, Cavalcante TM, Moura EC, Claro RM, Szwarcwald CL. Population-based evidence of a strong decline in the prevalence of smokers in Brazil (1989-2003). *Bull World Health Organ.* 2007 Jul 1;85(7):527–34.
 26. Laranjeira R, Madruga CS, Pinsky I, Caetano R. II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) - 2012. In São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP.; 2014. p. 85.
 27. Carvalho MB De, J. Lenzi CNL, Fava AS, Amar A, Kanda JL, Walder F, *et al.* Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermoide de cavidade oral no sexo feminino. *Rev Ass Med Bras.* 2001;47(3):208–14.
 28. Rikardsen OG, Bjerkli I-H, Uhlin-Hansen L, Hadler-Olsen E, Steigen SE. Clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma in Northern Norway: a retrospective study. *BMC Oral Health.* 2014;14:103.
 29. Dos Santos LCO, Cangussu MCT, Batista ODM, Dos Santos JP. Oral cancer: Population sample of the state of Alagoas at a reference hospital. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009;75(4):524–9.
 30. Saba NF, Goodman M, Ward K, Flowers C, Ramalingam S, Owonikoko T, *et al.* Gender and ethnic disparities in incidence and survival of squamous cell carcinoma of the oral tongue, base of tongue, and tonsils: A surveillance, epidemiology and end results program-based analysis. *Oncology.* 2011;81(1):12–20.
 31. Singh MP, Kumar V, Agarwal A, Kumar R, Bhatt MLB, Misra S. Clinico-epidemiological study of oral squamous cell carcinoma: A tertiary care centre study in North India. *J Oral Biol Craniofacial Res. Craniofacial Research Foundation;* 2016;6(1):32–5.
 32. Zavras a I, Yoon a J, Chen MK, Lin CW, Yang SF. Metallothionein-1 genotypes in the risk of oral squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2011;18(5):1478–83.
 33. Butt FMA, Chindia ML, Rana F. Oral squamous cell carcinoma in human

immunodeficiency virus positive patients: clinicopathological audit. *J Laryngol Otol.* 2012;126(3):276–8.

34. Cannon TL, Lai DW, Hirsch D, Delacure M, Downey A, Kerr AR, *et al.* Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity in Nonsmoking Women: A New and Unusual Complication of Chemotherapy for Recurrent Ovarian Cancer? *Oncologist.* 2012;17:1541–6.

Figura 1 – Distribuição de casos de carcinoma epidermoide de boca, segundo gênero e cor dos pacientes, diagnosticados no Hospital de Clínicas de Uberlândia entre 2004 e 2013 ($p = 0,02$; teste de qui-quadrado).

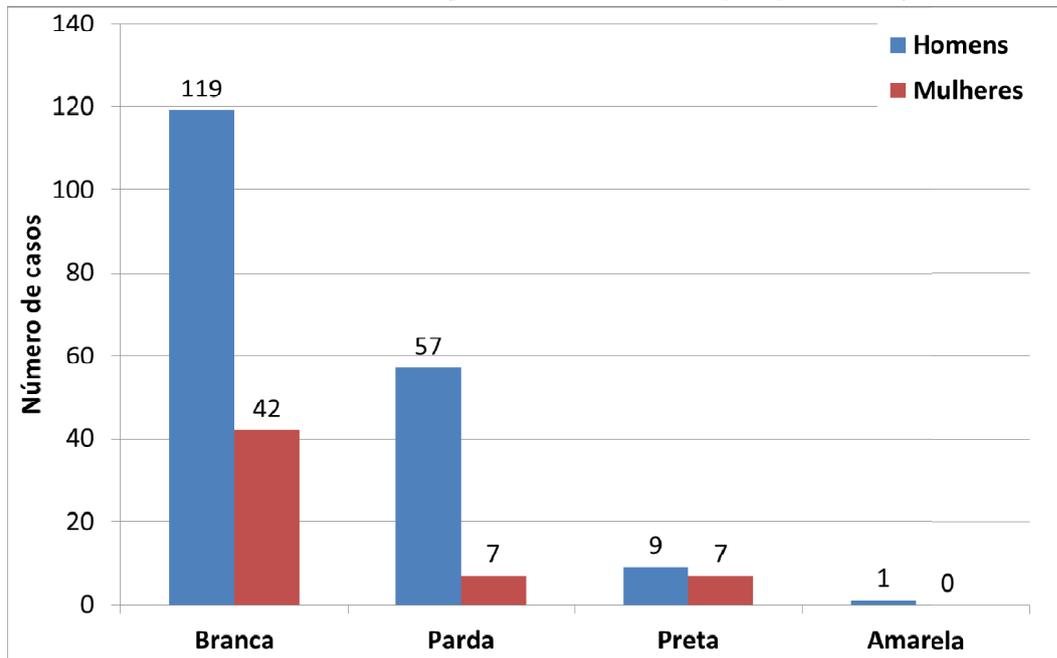


Figura 2 – Distribuição de casos de carcinoma epidermoide de boca, segundo gênero e faixa etária dos pacientes, diagnosticados no Hospital de Clínicas de Uberlândia entre 2004 e 2013 ($p = 0,04$; teste de qui-quadrado).

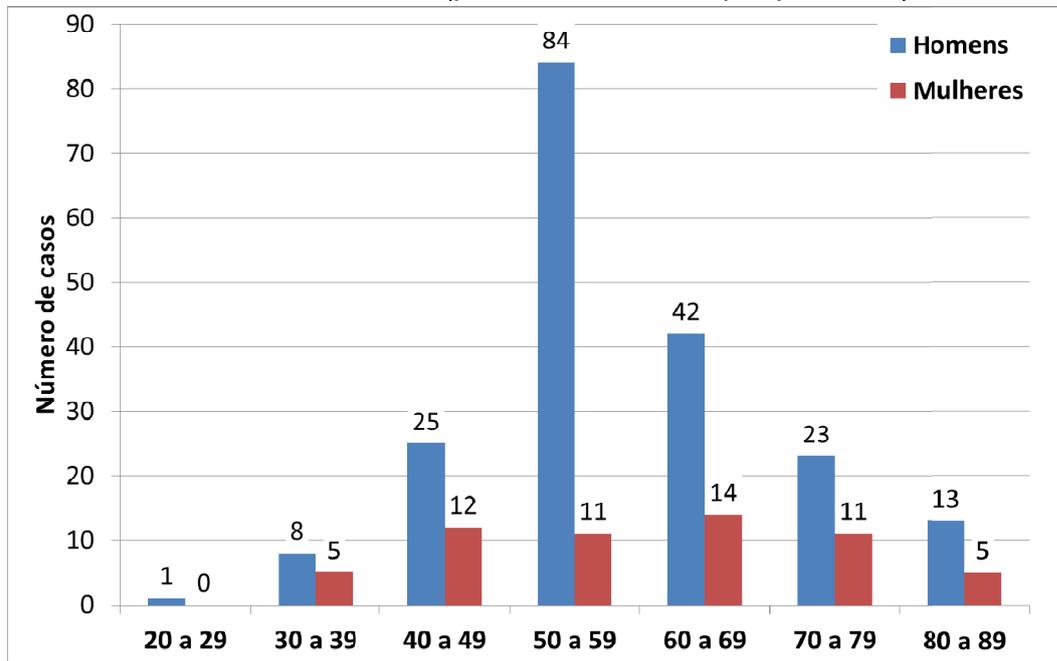


Figura 3 – Distribuição de casos de carcinoma epidermoide de boca, segundo gênero do paciente e localização anatômica da lesão, diagnosticados no Hospital de Clínicas de Uberlândia entre 2004 e 2013 ($p = 0,49$; teste de qui-quadrado).

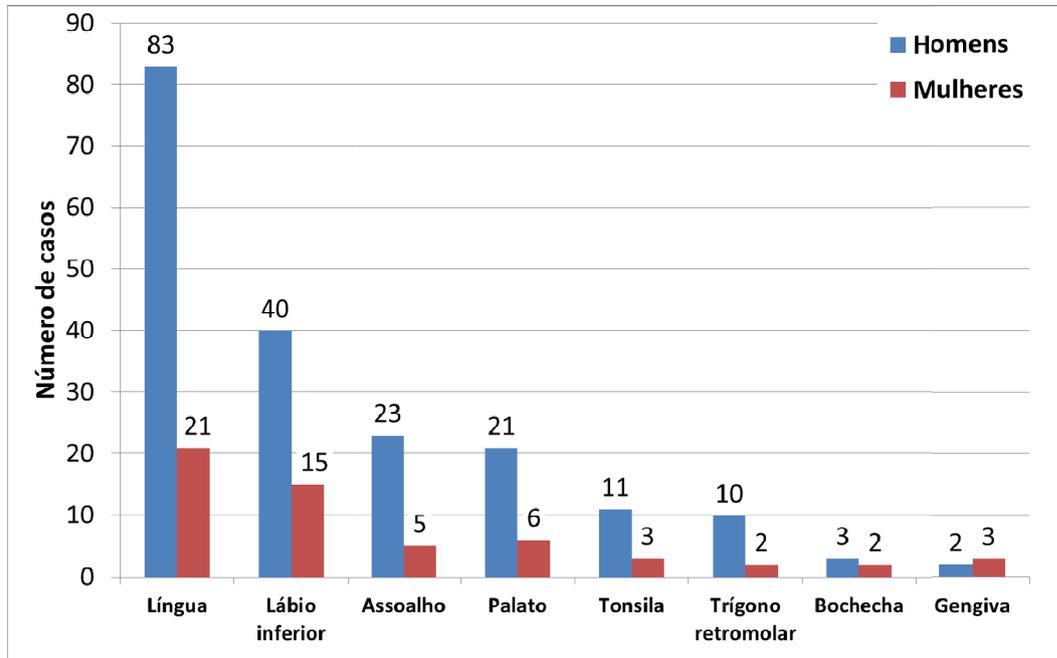
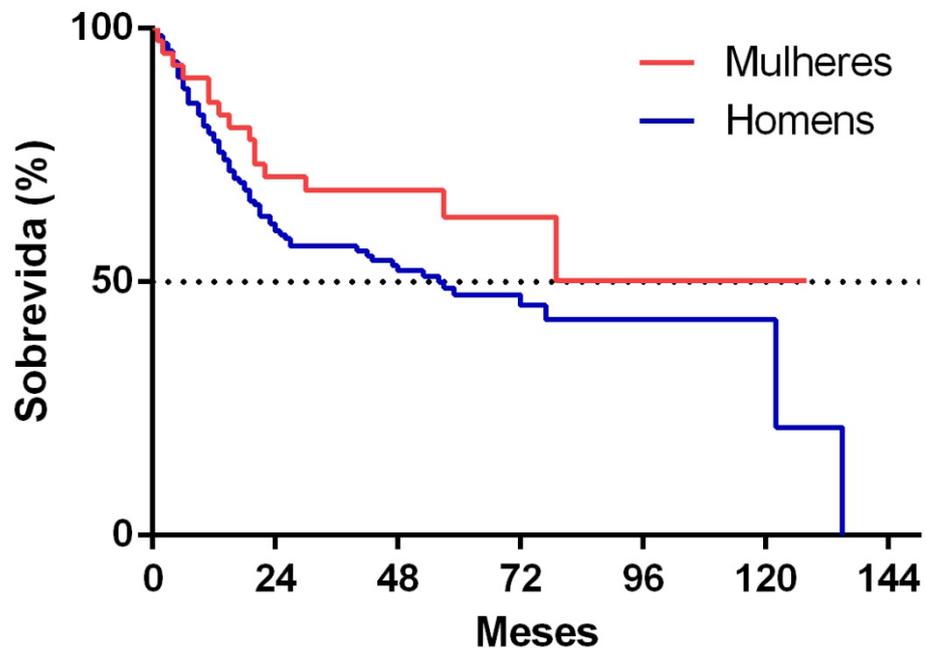


Figura 4 – Sobrevida entre homens e mulheres (n = 135 e 41, respectivamente) com carcinoma epidermoide de boca, diagnosticados no Hospital de Clínicas de Uberlândia entre 2004 e 2013 (p = 0,13).



Capítulo 3

CAPÍTULO 3

Artigo para publicação no periódico Revista de Odontologia da UNESP

Polimorfismos de nucleotídeo único e risco de tumores de glândula salivar: revisão de literatura

Single-nucleotide polymorphism and risk of salivary gland tumors: literature review.

Autores

Roberta Rezende ROSA

roberta.rrosa@hotmail.com

Marcelo Augusto GARCIA JUNIOR

marceloaugustojunior@gmail.com

Sérgio Vitorino CARDOSO

sv.cardoso@ufu.br

Faculdade de Odontologia - Universidade de Uberlândia (UFU),
Uberlândia, MG, Brasil.

Autor Correspondente

Sérgio Vitorino Cardoso

Área de Patologia Oral

Av. Pará, nº 1.720

CEP: 38.405-320

Fone: +55 (34) 3225-8118

e-mail: sv.cardoso@ufu.br

RESUMO

Introdução: Tumores de glândula salivar (TGS) constituem até 6% de todas as neoplasias de cabeça e pescoço e são marcados por diversidade e complexidade histopatológica. Os fatores de risco para essas doenças ainda são muito pouco conhecidos, exceto a exposição ambiental à radiação ionizante, responsável por pequena parcela dos TGS. **Objetivo:** Trata-se de uma revisão de literatura, com objetivo de organizar as informações existentes sobre a possível relação entre o risco de TGS e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), tendo em vista favorecer a proposição de estudos futuros que possam aprofundar o entendimento sobre essas doenças. **Material e Métodos:** Foi realizada uma busca na base de dados PubMed e incluídos estudos que contemplassem investigações sobre a influência de SNP no risco de desenvolvimento de TGS. **Resultados:** Foram encontrados 74 trabalhos e selecionados dez que preenchiam os critérios de inclusão. Verificou-se maior número de estudos com TGS malignos em comparação a benignos e na maioria das vezes as lesões foram avaliadas como grupos de tumores malignos ou, benignos, sem considerar os subtipos histológico. **Conclusão:** A informação disponível atualmente sobre a frequência e a relevância das variações genéticas envolvidas na susceptibilidade aos tumores de glândula salivar ainda é muito restrita, porém promissora. Além disso, os resultados mostram que o fator de susceptibilidade pode divergir entre populações distintas, justificando a necessidade de estudos na população brasileira.

Descritores: Polimorfismos de nucleotídeo-único; tumor de glândula salivar; risco.

ABSTRACT

Introduction: Salivary gland tumors (SGT) correspond to about 6% of all head and neck tumors. These tumors are marked by a variety of histological and biological characteristics. Although environmental exposure to radiation has been the most clearly identified risk factor for SGTs, others risk factors for these diseases are still unknown. **Objective:** This is a literature review, aimed to organize existing information on the possible relationship between the risk of SGT and single-nucleotide polymorphisms (SNP), in order to purpose future studies to better understand the diseases. **Material and Methods:** A structured bibliography search on PubMed database has been performed to identify studies that addressed research on the SNP influence on the risk of SGT. **Results:** 74 studies were found and ten were included. There were more studies with malignant SGT than benign SGT; and in most studies, lesions were evaluated as malignant groups, and/or benign, without considering the histological subtypes. **Conclusion:** The information currently available on the frequency and relevance of the genetic variants involved in susceptibility to salivary gland tumors is still limited, but promising. In addition, the results show that the susceptibility factor may differ between different populations, justifying the need for studies in the Brazilian population.

Descriptors: Polymorphisms of single-nucleotide; salivary gland tumor; risk.

Introdução

Tumores de glândula salivar (TGS) constituem até 6% de todas as neoplasias de cabeça e pescoço ^{1,2}. Existem dezenas de tipos distintos de TGS, marcados por diversidade e complexidade histopatológica, bem como por comportamentos biológicos distintos ¹. De forma geral, a incidência anual de TGS na população mundial varia entre 0,4 a 13,5 casos por 100.000 habitantes ³. Entre 21 a 46% dos TGS são malignos, e desses os tipos histológicos mais comuns são o carcinoma adenoide cístico e o carcinoma mucoepidermoide ^{3,4}. Com exceção da exposição ambiental à radiação ionizante, responsável por pequena parcela dos TGS, fatores de risco para essas doenças ainda são muito pouco conhecidos ⁵. A complexidade histopatológica dos TGS provavelmente também reflete uma grande variedade de vias genéticas e moleculares que contribuem para o desenvolvimento de tumores específicos ⁶.

O presente estudo se trata de uma revisão de literatura, desenvolvida com objetivo de organizar as informações existentes atualmente sobre a possível relação entre o risco de TGS e polimorfismos genéticos, descrevendo os principais achados de interesse, comentando também características metodológicas que devem ser observadas, tendo em vista favorecer a proposição de estudos futuros que possam aprofundar o entendimento sobre essas doenças.

Material e métodos

Foi realizada uma busca inicial na base de dados PubMed, por dois autores (RRR, MAGJ) de forma independente, utilizando como palavras-chave os termos “SNP” ou “*polymorphism*” para identificar a condição genética, combinados com os termos “*salivary gland tumors*”, “*salivary gland neoplasms*”, “*salivary gland cancers*”, “*salivary gland carcinomas*”, “*pleomorphic adenoma*”, “*Warthin tumor*”, “*basal cell adenoma*”, “*adenoid cystic carcinoma*” ou “*mucoepidermoid carcinoma*” para rastreamento das lesões. Não houve restrição quanto à data ou língua de publicação dos estudos, mas seriam excluídos relatos de caso e estudos não conduzidos em humanos. Após o

rastreamento pela combinação de palavras-chave, o título e o resumo de cada trabalho informado no resultado de busca foram avaliados por todos os autores para confirmar a pertinência de sua inclusão, restrita a estudos que contemplassem investigações sobre a influência de SNP no risco de desenvolvimento de TGS. Em seguida, poderiam ser ainda incluídos outros trabalhos identificados nas referências dos artigos encontrados na busca inicial, desde que pertinentes ao escopo desta proposta. Finalmente, todos os trabalhos selecionados deveriam ser avaliados na íntegra para obtenção dos dados de interesse, quais sejam: tipos histológicos avaliados, número de casos, técnica para identificação de SNP, material biológico utilizado como amostra, SNP investigados, e, quando houvesse, sentido da modificação do risco pelo alelo polimórfico.

Resultados e Discussão

Foram encontrados 74 estudos na busca inicial. Destes, foram excluídos 46 trabalhos que mencionaram TGS mas não investigaram SNP como fatores de risco para essas lesões, 15 que não investigaram TGS, dois trabalhos que não investigaram tumores humanos, e um relato de caso. Permaneceram então 10 trabalhos, publicados nos anos de 2007 a 2015, que avaliaram polimorfismos em nucleotídeo único como fatores de risco para TGS. Nenhum outro estudo foi identificado na busca complementar a partir das referências dos artigos inicialmente selecionados.

As principais características e achados desses estudos são apresentados na Tabela 1. Verifica-se que tanto tumores benignos quanto malignos já foram avaliados, sendo mais numerosos os estudos sobre TGS malignos. Quase sempre as lesões foram avaliadas como grupos uniformes de tumores malignos ou benignos, provavelmente em função do pequeno número de casos de cada subtipo histológico. As exceções são os trabalhos de Xu *et al.* 2012 e Xu *et al.* 2015, em que houve avaliação distinta de subtipos malignos de TGS, todavia mostrando resultados similares para os tumores avaliados. Dentre os

TGS benignos, as maiores casuísticas avaliadas eram de adenomas pleomorfos e de tumores de Warthin, enquanto o carcinoma adenoide cístico, o carcinoma mucoepidermoide e o carcinoma de células acinares foram os subtipos malignos mais comumente estudados. Tal distribuição certamente reflete a frequência proporcional de tais lesões. É interessante também notar que não foram especificamente mencionados casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade, possivelmente por viés na seleção de casos oriundos de glândulas salivares maiores, e que em diversos trabalhos os carcinomas de ductos salivares foram agrupados a adenocarcinomas sem outra especificação ^{2,7,9-11}, nesse caso provavelmente em função de dificuldades na especificação diagnóstica.

Verifica-se que as técnicas de PCR-RFLP (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”) ^{2,7,9,11-13}, de PCR seguida de sequenciamento ^{10,14}, e de sequenciamento de todo o DNA ⁸ já foram empregadas para o estudo de SNP quanto ao risco de TGS. Nenhum dos estudos selecionados apresentou objetivamente, justificativa ou crítica da aplicação dessas técnicas, porém é fundamental que se conheça suas vantagens, desvantagens e principais aplicações. A técnica de avaliação de todo genoma, por exemplo, pode ser vantajosa no intuito de identificar o máximo de alterações possíveis, favorecendo também a identificação de blocos de haplótipos que podem ser mais úteis do que SNP isolados na avaliação do risco ¹⁵. Por outro lado, na existência de um possível gene de interesse, o estudo de polimorfismos específicos pode ser uma alternativa vantajosa e com menor custo operacional ¹⁶. Outras técnicas podem ser utilizadas para o estudo de SNP, tais como o uso de sondas específicas (TaqMan) para qPCR ou *tetra-primer ARMS-PCR*¹⁷.

O estudo mais recente ⁸ realizou análise genômica dos carcinomas de glândulas salivares (CGS) com o objetivo de identificar variações genéticas que modificassem o risco de surgimento dessas doenças. Esse trabalho encontrou associação significativa entre risco e cinco polimorfismos de diferentes genes: CHRNA2, OR4F15, ZNF343, PARP4, ELL2. Além disso, o polimorfismo exm2258812 em CHRNA2 e o exm1194739 em OR4F15 apresentaram rara frequência entre os controles, corroborando a ideia que tais polimorfismos são fortes candidatos para a triagem e prevenção dos CGS ⁸.

Quanto à função biológica dos genes já investigados quanto a possível associação com o risco de desenvolvimento de TGS, os mesmos podem ser agrupados em quatro classes, apresentadas e discutidas abaixo.

Proto-oncogenes

Jin *et al.* (2012) descreveram associação entre maior risco de TGS malignos e polimorfismo no gene *MDM-2* (rs2279744). A ligação de mdm-2 à proteína supressora tumoral p53 regula negativamente a função dessa última, por bloquear sua interação com DNA (e consequente ativação transcricional de genes relacionados ao bloqueio do ciclo celular, de reparo de DNA, e de apoptose) e também por favorecer sua ubiquitinação e posterior proteólise¹⁸. Dessa forma, função reduzida ou ausente de *MDM-2* pode favorecer a formação de tumores. Este mesmo trabalho avaliou dois polimorfismos em *p14^{ARF}*, porém, não foram encontradas associações com o risco de TGS¹³.

Liu *et al.* (2011) encontraram associação entre o polimorfismo A870G (rs9344) do gene *CCND1* e maior risco de TGS. Esse gene codifica a proteína ciclina D1, que é expressa em resposta a sinais indutores de mitose e então promove a transição pelo ponto de checagem na fase G1 do ciclo celular¹⁹. Expressão aumentada de ciclina D1 tem sido associada com aumento da proliferação celular e prognóstico desfavorável em alguns tumores²⁰.

Huang *et al.* (2015) investigaram um polimorfismo (rs6474051) no gene *PLAG1* (*Pleomorphic Adenoma Gene 1*), que codifica uma proteína dedo de zinco. Alterações na expressão dessa proteína pode desencadear o desenvolvimento de adenomas pleomorfos em glândulas salivares²¹. Foi encontrada diferença na frequência dos alelos C/T entre pacientes e controles, sendo que provavelmente o alelo T do polimorfismo rs6474051 está relacionado com maior susceptibilidade de tumores benignos em parótida.

Genes supressores de tumor

Em 2008, o estudo de Ho *et al.* investigou polimorfismos no gene *Fas* (*CD95* ou *Apo-1*) em tumores de tireóide e de glândula salivar. Observaram que o

polimorfismo C22628T no exon 7 (rs2234978) de *Fas* estava associado com aumento do risco de tumores benignos e malignos de glândula salivar. Esse gene codifica uma proteína receptora transmembrana de mesmo nome, a qual sinaliza apoptose após interação com o Fas-ligante ²³. Trabalhos anteriores do mesmo grupo demonstraram que resposta apoptótica inadequada à radiação gama pode funcionar como biomarcador de risco para alguns carcinomas ²⁴.

Genes relacionados ao reparo do DNA

Ho *et al.* (2007) avaliaram seis polimorfismos no gene *XRCC1* (*X-ray Repair Cross-Complementing group 1*), demonstrando que indivíduos com genótipo homocigoto CC do polimorfismo T1915C tem risco significativamente mais baixo de CGS. Este gene codifica uma proteína que auxilia na reparação de quebras de ligação simples de DNA, as quais podem ocorrer devido à exposição a espécies reativas de oxigênio endógeno ou a carcinógenos exógenos. Evidências experimentais sugerem que a ausência da proteína *XRCC1* aumenta a hipersensibilidade ao dano devido à radiação ionizante ²⁶.

Xu *et al.* (2012) estudaram sete SNP no gene *BRCA1* (*BR*east *C*ancer 1), e verificaram que haplótipos que portavam o alelo C do polimorfismo T43893C associavam-se a menor risco de CGS. Esse gene está diretamente envolvido no reparo de quebras de dupla ligação do DNA ²⁷. Polimorfismos nesse gene parecem também afetar a susceptibilidade individual a câncer de mama e de ovário ^{28,29}. Devido a ocorrências de TGS após câncer de mama ou de ovário, tais polimorfismos também são candidatos à susceptibilidade a NGS malignas. O trabalho descreveu associação entre redução de risco de CGS e genótipo TC/CC do polimorfismo T43893C em *BRCA1* ⁷.

Meng *et al.* (2013) avaliaram polimorfismos nos genes *ERCC4* (rs6498486) e *ERCC5* (rs751402), verificando uma possível associação do último com menor risco de desenvolvimento de TGS. Tais genes codificam endonucleases envolvidas na reparação do DNA por excisão de nucleotídeos ³⁰. Falhas no reparo de DNA foram identificadas como fatores de risco para o desenvolvimento de vários tumores ³¹

Genes de citocinas

A influência sobre o risco de TGS de polimorfismo (G801A) no gene *CXCL12/SDF-1* foi avaliada em dois estudos, com resultados diversos. Khademi *et al.* (2008) não observaram associação, enquanto Liu *et al.* (2012) encontraram frequência significativamente maior do alelo A desse polimorfismo em pacientes com TGS benignos. Considerando que tais estudos foram realizados em países diferentes (China e Irã respectivamente), variações populacionais, étnicas ou geográficas, podem ser relevantes no estabelecimento de risco de TGS. Esse gene codifica um ligante do receptor CXCR4, que além do envolvimento na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1) é o receptor de citocina mais amplamente expresso em muitos tipos de câncer ³².

Agradecimento

Este trabalho obteve apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Conclusão

A informação disponível atualmente sobre a frequência e a relevância das variações genéticas envolvidas na susceptibilidade aos tumores de glândula salivar ainda é muito restrita, porém promissora visto que diversos potenciais fatores genéticos de risco já foram identificados. Por outro lado, a patogênese molecular dos tumores de glândula salivar provavelmente não será explicada apenas pela variação alélica de apenas um locus, mas sim pelo melhor entendimento da ação combinada entre diversos polimorfismos genéticos e fatores ambientais. Além disso, os resultados mostram que o fator de susceptibilidade pode divergir entre populações distintas, justificando a necessidade de estudos na população brasileira.

Tabela 1 - Características principais dos estudos de SNP em tumor de glândula salivar.

| Ano | Autor | País | Tumores avaliados | Número de casos / controles | Gene | Polimorfismo | Técnica | Tipode e amostra | Associação com TGS |
|------|---------|-----------|------------------------------|-----------------------------------|--|---|-----------------------------|------------------|--------------------|
| 2015 | Xu | EUA | Carcinomas de GS | 309 CGS / 535 controles | <i>CHRNA2</i> , <i>OR4F15</i> , <i>ZNF343</i> , <i>PARP4</i> , <i>ELL2</i> | exm2258812, exm1194739, exm1519918, exm1057993, exm2265979 | Sequenciamento e microarray | Sangue | Risco |
| 2015 | Huang | China | Tumores benignos em parótida | 65 casos / 69 controles | <i>PLAG1</i> | rs6474051 | PCR e sequenciamento | Sangue | Risco |
| 2013 | Meng | China | TGS benignos e malignos | 37 CGS / 96 TGSb / 142 controles | <i>ERCC4</i> <i>ERCC5</i> | rs6498486 rs751402 | PCR-RFLP | | Risco |
| 2012 | Jin | EUA/China | Carcinomas de GS | 156 CGS / 511 controles | <i>MDM2</i> | rs2279744 e rs937283 | PCR- RFLP | Sangue | Nenhum/ Risco |
| 2012 | Liu | China | TGS benignos e malignos | 17 CGS / 85 TGSb / 101 controles | <i>CXCL12</i> | G801A | PCR- RFLP | Células orais | Risco |
| 2012 | Xu | EUA | Carcinomas de GS | 156 CGS/ 511 controles | <i>BRCA1</i> | rs1799950, rs799917, rs16941, rs16942, rs1060915 rs1799966 | PCR- RFLP | Sangue | Proteção/Risco |
| 2011 | Liu | China | TGS benignos e malignos | 23 CGS / 79 TGSb / 101 controles | <i>Ciclina D1</i> | A870G | PCR e sequenciamento | Células orais | Risco |
| 2008 | Khademi | Iran | Carcinomas de GS | 31 CGS / 262 controles | <i>SDF-1</i> <i>CCR5</i> | G801A (SDF-1) e CCR5Δ32 (deleção) rs2234767, rs2234768, rs2229521, rs2234978 | PCR- RFLP | Sangue | Risco/Nenhum |
| 2008 | Ho | EUA/China | TGS benignos e malignos | 154 CGS / 61 TGSb / 510 controles | <i>Fas (CD95)</i> | C310T, 539del542, T1915C, Arg194Trp, Arg280His, Arg399Gln | PCR – RFLP | Sangue | Risco |
| 2007 | Ho | EUA | TGS benignos e malignos | 138 CGS / 50 TGSb / 503 controles | <i>XRCC1</i> | | PCR- RFLP | Sangue | Proteção / Risco |

CGS – Carcinoma de glândula salivar / TGSb – Tumor de glândula salivar benignos

Referências

1. Laishram RS, Kumar KA, Pukhrambam GD, Laishram S, Debnath K. Pattern of salivary gland tumors in Manipur, India: A 10 year study. *South Asian J cancer*. 2013 Oct;2(4):250–3.
2. Liu W, Zhu E, Wang R, Wang L, Liu T. CXCL12 G801A polymorphism is associated with an increased risk of benign salivary gland tumors in the Chinese population. *Med Oncol*. 2012 Jun 5;29(2):677–81.
3. Boukheris H, Curtis RE, Land CE, Dores GM. Incidence of carcinoma of the major salivary glands according to the WHO classification, 1992 to 2006: a population-based study in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Nov;18(11):2899–906.
4. Ron E, Saftlas AF. Head and neck radiation carcinogenesis: Epidemiologic evidence. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 1996;115(5):403–8.
5. Saku T, Hayashi Y, Takahara O, Matsuura H, Tokunaga M, Tokunaga M, *et al*. Salivary gland tumors among atomic bomb survivors, 1950-1987. *Cancer*. 1997 Apr 15;79(8):1465–75.
6. Yin LX, Ha PK. Genetic alterations in salivary gland cancers. *Cancer*. 2016 Feb;n/a – n/a.
7. Xu L, Doan PC, Wei Q, Li G, Sturgis EM. Functional single-nucleotide polymorphisms in the BRCA1 gene and risk of salivary gland carcinoma. *Oral Oncol*. 2012 Sep;48(9):842–7.
8. Xu L, Tang H, Chen DW, El-Naggar AK, Wei P, Sturgis EM. Genome-wide association study identifies common genetic variants associated with salivary gland carcinoma and its subtypes. *Cancer*. 2015;121(14):2367–74.
9. Khademi B, Razmkhah M, Erfani N, Gharagozloo M, Ghaderi A. SDF-1 and CCR5 genes polymorphism in patients with head and neck cancer. *Pathol Oncol Res*. 2008;14:45–50.
10. Liu W, Zhu E, Wang R, Wang L, Gao L, Yang X, *et al*. Cyclin D1 gene polymorphism, A870G, is associated with an increased risk of salivary gland tumors in the Chinese population. *Cancer Epidemiol*. Elsevier Ltd; 2011 Aug;35(4):e12–7.
11. Meng X, Wang QX, Chen MY, Qin G, Wang YP, Liu WX. [DNA repair

- gene polymorphisms in ERCC4 rs6498486 and ERCC5 rs751402 and risk of salivary gland tumors]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 2013 Aug;22(4):438–42.
12. Lee SS, Yang SF, Ho YC, Tsai CH, Chang YC. The upregulation of metallothionein-1 expression in areca quid chewing-associated oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2008;44(2):180–6.
 13. Jin L, Xu L, Song X, Wei Q, Sturgis EM, Li G. Genetic Variation in MDM2 and p14ARF and Susceptibility to Salivary Gland Carcinoma. *PLoS One*. 2012;7(11):3–8.
 14. Huang X, Qiu X, Sun M, He S. [Association of pleomorphic adenoma gene 1 polymorphism and benign parotid tumor in Chinese Han population in Hainan Province]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2015 Aug;35(9):1360–1, 1365.
 15. Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *Eur J Surg Oncol*. 2004;30(6):593–601.
 16. Bichenkova E V., Lang Z, Yu X, Rogert C, Douglas KT. DNA-mounted self-assembly: New approaches for genomic analysis and SNP detection. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. Elsevier B.V.; 2011 Jan;1809(1):1–23.
 17. Delvaux N, da Costa VD, da Costa MM, Lampe E. Comparison of four methods of genotyping IL28B polymorphisms in chronic hepatitis C patients. *J Virol Methods*. Elsevier B.V.; 2015;220:1–4.
 18. Perry ME. The Regulation of the p53-mediated Stress Response by MDM2 and MDM4. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Jan 1;2(1):a000968–a000968.
 19. Masamha CP, Benbrook DM. Cyclin D1 degradation is sufficient to induce G1 cell cycle arrest despite constitutive expression of cyclin E2 in ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2009;69(16):6565–72.
 20. Zhou C-X, Gao Y. Aberrant expression of beta-catenin, Pin1 and cyclin D1 in salivary adenoid cystic carcinoma: relation to tumor proliferation and metastasis. *Oncol Rep*. 2006 Sep;16(3):505–11.
 21. Kas K, Voz ML, Röijer E, Aström AK, Meyen E, Stenman G, *et al*. Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and beta-catenin in pleiomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12)

- translocations. *Nat Genet.* 1997 Feb;15(2):170–4.
22. Ho T, Li G, Zhao C, Zheng R, Wei Q, Sturgis EM. Fas single nucleotide polymorphisms and risk of thyroid and salivary gland carcinomas: a case-control analysis. *Head Neck.* 2008 Mar;30(3):297–305.
 23. Leithäuser F, Dhein J, Mechtersheimer G, Koretz K, Brüderlein S, Henne C, *et al.* Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest.* 1993;69(4):415–29.
 24. Zheng R, Dahlstrom KR, Wei Q, Sturgis EM. Gamma radiation-induced apoptosis, G2 delay, and the risk of salivary and thyroid carcinomas--a preliminary report. *Head Neck.* 2004 Jul;26(7):612–8.
 25. Ho T, Li G, Lu J, Zhao C, Wei Q, Sturgis EM. X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) single-nucleotide polymorphisms and the risk of salivary gland carcinomas. *Cancer.* 2007;110(2):318–25.
 26. Brem R, Hall J. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(8):2512–20.
 27. Zhang J, Powell SN. The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Res.* 2005;3(10):531–9.
 28. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.* 1994 Oct 7;266(5182):66–71.
 29. Cox DG, Kraft P, Hankinson SE, Hunter DJ. Haplotype analysis of common variants in the BRCA1 gene and risk of sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005;7(2):R171–5.
 30. Svendsen JM, Smogorzewska A, Sowa ME, O'Connell BC, Gygi SP, Elledge SJ, *et al.* Mammalian BTBD12/SLX4 Assembles A Holliday Junction Resolvase and Is Required for DNA Repair. *Cell.* 2009 Jul;138(1):63–77.
 31. Lu B, Li J, Gao Q, Yu W, Yang Q, Li X. Laryngeal cancer risk and common single nucleotide polymorphisms in nucleotide excision repair pathway genes ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5 and XPA. *Gene.* 2014 May 25;542(1):64–8.
 32. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, *et al.* Stromal fibroblasts present in invasive human breast

carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005 May 6;121(3):335–48.

Conclusão

4. CONCLUSÃO

Podemos concluir com este trabalho que polimorfismos de nucleotídeo único podem influenciar o risco de ocorrência de carcinoma epidermoide oral na população brasileira, confirmando a hipótese do trabalho, pois:

- Indivíduos que apresentam genótipo AA para o SNP rs11076161 em *MT-1A* apresentam uma maior susceptibilidade para ocorrência de CEO comparados com indivíduos portadores do alelo G (GG ou AG) para o mesmo SNP.
- O haplótipo GACT para os polimorfismos rs1610216, rs11076161, rs964372 e rs8052334 sugere risco aumentado para CEO.
- De forma complementar à hipótese investigada neste estudo, foi observado que existem algumas características peculiares do CEO em mulheres, as quais devem ser melhor avaliadas para que sua importância biológica e clínica seja melhor esclarecida.
- Ainda, a informação disponível sobre a frequência e relevância das variações genéticas envolvidas na susceptibilidade aos tumores de glândula salivar ainda é muito restrita, porém promissora visto que diversos potenciais fatores genéticos de risco já foram identificados. Além disso, os resultados mostram que o fator de susceptibilidade de uma população pode não se repetir em outra, justificando a necessidade de estudos na população brasileira.

Referências

5. REFERÊNCIAS

1. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol.* Elsevier Ltd; 2009;45(4-5):301–8.
2. Goldstein BY, Chang S-C, Hashibe M, Vecchia C La, Zhang Z-F. Alcohol Consumption and Cancer of the Oral Cavity and Pharynx from 1988 to 2009 : An Update. 2011;19(6):431–65.
3. Saman DM. A review of the epidemiology of oral and pharyngeal carcinoma: Update. *Head Neck Oncol.* 2012;4(1).
4. Czerninski R, Zini A, Sgan-Cohen HD. Lip cancer: Incidence, trends, histology and survival: 1970-2006. *Br J Dermatol.* 2010;162(5):1103–9.
5. Huber MA, Tantiwongkosi B. Oral and Oropharyngeal Cancer. *Med Clin North Am.* Elsevier Inc; 2014;98(6):1299–321.
6. Demarosi F, Lodi G, Carrassi A, Soligo D, Sardella A. Oral malignancies following HSCT: Graft versus host disease and other risk factors. *Oral Oncol.* 2005;41(9):865–77.
7. Dasanayake AP, Silverman AJ, Warnakulasuriya S. Maté drinking and oral and oro-pharyngeal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* Elsevier Ltd; 2010;46(2):82–6.
8. Conway DI, Petticrew M, Marlborough H, Berthiller J, Hashibe M, Macpherson LMD. Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: A systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Int J Cancer.* 2008;122(12):2811–9.
9. Ribeiro A de A, Nardocci AC. Desigualdades socioeconômicas na incidência e mortalidade por câncer: Revisão de estudos ecológicos, 1998-2008. *Saude e Soc.* 2013;22(3):878–91.
10. Tripathy CB, Roy N. Meta-analysis of glutathione S-transferase M1 genotype and risk toward head and neck cancer. *Head Neck.* 2006;28(3):217–24.
11. Jefferies S, Eeles R, Goldgar D, A'Hern R, Henk JM, Gore M, *et al.* The role of genetic factors in predisposition to squamous cell cancer of the head and neck. *Br J Cancer.* 1999;79(5/6):865–7.
12. Babula P, Masarik M, Adam V, Eckschlager T, Stiborova M, Trnkova L,

- et al.* Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics*. 2012;4(8):739.
13. Davis SR, Cousins RJ. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J Nutr*. 2000 May;130(5):1085–8.
 14. Romero-Isart N, Jensen LT, Zerbe O, Winge DR, Va??k M. Engineering of metallothionein-3 neuroinhibitory activity into the inactive isoform metallothionein-1. *J Biol Chem*. 2002;277(40):37023–8.
 15. Laukens D, Waeytens A, De Bleser P, Cuvelier C, De Vos M. Human metallothionein expression under normal and pathological conditions: mechanisms of gene regulation based on in silico promoter analysis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2009;19(4):301–17.
 16. Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, *et al.* Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry*. 1994;33(23):7250–9.
 17. Kondoh M, Imada N, Kamada K, Tsukahara R, Higashimoto M, Takiguchi M, *et al.* Property of metallothionein as a Zn pool differs depending on the induced condition of metallothionein. *Toxicol Lett*. 2003;142(1-2):11–8.
 18. Waalkes MP, Harvey MJ, Klaassen CD. Relative in vitro affinity of hepatic metallothionein for metals. *Toxicol Lett*. 1984;20(1):33–9.
 19. Hamer D. Metallothionein - An Overview. *Mar Env Res*. 1988;24:171.
 20. Banerjee D, Onosaka S, Cherian M. Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of rat liver and kidney. *Toxicology*, 1982;24(2):95-105. *Toxicology*. 1982;24(2):95–105.
 21. Baird S, Kurz T, Brunk U. Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Biochem J*. 2006;394(1):275–83.
 22. Simpkins C, Lloyd T, Li S, Balderman S. Metallothionein-induced increase in mitochondrial inner membrane permeability. *J Surg Res*. 1998;75(1):30–4.
 23. Formigari A, Irato P, Santon A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*.

- 2007;146(7):443–59.
24. Chen W, Cheng Y, Zhao X, Li S, Hou Y, Hong Y. Effects of zinc on the induction of metallothionein isoforms in hippocampus in stress rats. *Exp Biol Med.* 2006;231(9):1564–8.
 25. Apostolova M, Ivanova I, Cherian M. Signal transduction pathways, and nuclear translocation of zinc and metallothionein during differentiation of myoblasts. *Biochem Cell Biol.* 2000;78(1):27–37.
 26. Jourdan E, Emonet-Piccardi N, Didier C, Beani J, Favier A, Richard M. Effects of cadmium and zinc on solar-simulated light-irradiated cells: potential role of zinc-metallothionein in zinc-induced genoprotection. *Arch Biochem Biophys.* 2002;405(2):170–7.
 27. Ogra Y, Onishi S, Kajiwara A, Hara A, Suzuki KT. Localization of Metallothionein by Nitric Oxide. *J Heal Sci.* 2008;54(3):339–42.
 28. Zalewska M, Trefon J, Milnerowicz H. The role of metallothionein interactions with other proteins. *Proteomics.* 2014;14(11):1343–56.
 29. Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2003;533(1-2):201–9.
 30. Nakano M, Sogawa CA, Sogawa N, Mishima K, Yamachika E, Mizukawa N, *et al.* Expression pattern of cisplatin-induced metallothionein isoforms in squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2003;23(1A):299–303.
 31. Darling MR, McCord C, Jackson-Boeters L, Copete M. Markers of potential malignancy in chronic hyperplastic candidiasis. *J Investig Clin Dent.* 2012 Aug;3(3):176–81.
 32. Johann ACBR, da Silveira-Júnior JB, Souto GR, Horta MC, Aguiar MCF, Mesquita RA. Metallothionein immunoexpression in oral leukoplakia. *Med oral, Patol oral y cirugía bucal.* 2008 Mar;13(3):E156–60.
 33. Li Y, Kimura T, Laity JH, Andrews GK. The Zinc-Sensing Mechanism of Mouse MTF-1 Involves Linker Peptides between the Zinc Fingers. *Mol Cell Biol.* 2006;26(15):5580–7.
 34. Heuchel R, Radtke F, Georgiev O, Stark G, Aguet M, Schaffner W. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J.* 1994;13(12):2870–5.
 35. Vašák M, Meloni G. Chemistry and biology of mammalian

- metallothioneins. *J Biol Inorg Chem*. 2011;16(7):1067–78.
36. Haq F, Mahoney M, Koropatnick J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res*. 2003 Dec 10;533(1-2):211–26.
37. Vasconcelos MH, Tam SC, Beattie JH, Hesketh JE. Evidence for differences in the post-transcriptional regulation of rat metallothionein isoforms. *Biochem J*. 1996 Apr 15;315 (Pt 2):665–71.
38. Wang DG, Fan J-B, Siao C-J, Berno A, Young P, Sapolsky R, *et al*. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* (80-). 1998;280(1998):1077–82.
39. Jasani B, Schmid KW. Significance of metallothionein overexpression in human tumours. *Science* (80-). 1997;31:211–4.

ANEXOS

7.1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismos nos genes de metalotioneína em pacientes com carcinoma epidermóide da mucosa oral

Pesquisador: SÉRGIO VITORINO CARDOSO

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 35965714.0.0000.5152

Instituição Proponente: FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 942.173

Data da Relatoria: 11/12/2014

Apresentação do Projeto:

Conforme apresenta o protocolo: Trata-se de um estudo tipo caso-controle que pretende investigar a associação de polimorfismos no genes codificadores de Metalotioneínas (MT) com carcinoma epidermóide de mucosa oral. Já é conhecida, segundo os autores, alguma relação de polimorfismos com tumores de mama e próstata. Serão avaliados pela equipe de pesquisa 190 pacientes em tratamento para o tumor em investigação e 190 participantes sem o tumor pareados por idade com intervalo de 5 anos para mais e para menos. Todos os participantes terão mais de 35 anos de idade. Dados secundários de prontuário serão consultados.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente projeto é avaliar a associação de polimorfismos do gene da Metalotioneína (MT) com o carcinoma epidermóide de boca. Os autores referem que os objetivos secundários são:

"1. Analisar a frequência de determinados SNP em genes de MT em pacientes com e sem carcinoma epidermóide oral. 2. Identificar genótipos que apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento do carcinoma epidermóide da mucosa oral. 3. Avaliar possível(eis) haplótipos associados a um maior risco de carcinoma epidermóide da mucosa oral."

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 942.173

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores os riscos envolvidos são apenas o de identificação e aqueles relacionados ao procedimento de coleta de amostra. Se comprometem a proteger o participante contra esses riscos. Como benefícios apontam não haver benefícios diretos mas a possível contribuição para o desenvolvimento de um teste de risco.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de avaliar neste parecer as respostas às pendências observadas no parecer anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer 862.793 foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Outubro de 2015.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 942.173

e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 942.173

UBERLANDIA, 30 de Janeiro de 2015

Assinado por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

7.2 – NORMAS DO PERIÓDICO 1

OnlineOpen

Open Access Option
available for this journal

Open up your research

free to view ▪ free to download ▪ free to share

Find out more about your open access option ►



Journal of Oral Pathology & Medicine

© John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

Journal of
Oral Pathology
& Medicine



Edited By: Peter Brennan

Impact Factor: 1.926

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2014: 22/88 (Dentistry Oral Surgery & Medicine); 39/76 (Pathology)

Online ISSN: 1600-0714

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance

Useful Websites: Submission Site (<http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>), Articles published in Journal of Oral Pathology & Medicine ([http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1600-0714](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1600-0714)), Author Services (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/author.asp>), Wiley Blackwell Publishing's Ethical Guidelines (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/publicationethics.asp>), Guidelines for Figures (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>)

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

1. GENERAL

Journal of Oral Pathology & Medicine publishes manuscripts of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of

techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology. Review papers on topical and relevant subjects will receive a high priority and articles requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as brief reports not exceeding three printed pages. All submitted manuscripts falling within the overall scope of the Journal will be assessed by suitably qualified reviewers, but manuscripts in an incorrect format will be returned to the author without review.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Journal of Oral Pathology & Medicine*. Authors are encouraged to visit Wiley Blackwell Publishing Author Services (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/>) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate (<http://www.wiley.com/go/nihmandate>).

2. ETHICAL GUIDELINES

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors.

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, and drafting the article or revising it critically for important intellectual content.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that

the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

Images of, or Information about, Identifiable Individuals: It is the author's responsibility to obtain consent from patients and other individuals for use of information, images, audio files, interview transcripts, and video clips from which they may be identified. To ensure we have the rights we require please provide a signed consent form in all instances. [Consent Form Template \(Patient_Consent_Form.pdf\)](#).

- If the person is a minor, consent must be obtained from the child's parents or guardians.
- If the person is dead, we consider it essential and ethical that you obtain consent for use from the next of kin. If this is impractical you need to balance the need to use the photo against the risk of causing offence. In all cases ensure you obscure the identity of the deceased.
- If using older material, or for material obtained in the field, for which signed release forms are, for practical purposes, unobtainable, you will need to confirm in writing that the material in question was obtained with the person's understanding that it might be published.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org (<http://www.consort-statement.org>). A [CONSORT checklist](http://www.consort-statement.org/mod_product/uploads/CONSORT%202001%20checklist.doc) (http://www.consort-statement.org/mod_product/uploads/CONSORT%202001%20checklist.doc) should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov (<http://www.clinicaltrials.gov/>), <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/> (<http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>), <http://isrctn.org/> (<http://isrctn.org/>). The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.4 Conflict of Interest

All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see [Conflicts of Interest](http://www.icmje.org/#conflicts) (<http://www.icmje.org/#conflicts>) for generally accepted definitions on conflict of interest? Please enclose this information under the heading 'Conflict of Interest Statement'.

2.5 Appeal of Decision

Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by emailing the editor with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

2.6 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.7 Copyright Assignment

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp
(http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services

http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

(http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit

<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>

(<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>).

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>
(<http://www.wiley.com/go/funderstatement>).

2.8 OnlineOpen

Journal of Oral Pathology & Medicine offers authors the opportunity to publish their paper OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see

<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>

(<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>). Any authors wishing to send

their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our

website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

(https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp). Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen

if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm> (<http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>). The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. For further instructions, please contact Editorial Assistant Gill Smith at JOPM.office@editorialoffice.co.uk (<mailto:JOPM.office@editorialoffice.co.uk>)

3.1. Getting Started

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm> (<http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>).
- Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.
- If you are registering as new user.
 - After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click 'Finish'.
- If you are registered as user, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Author Centre'.

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, acknowledgements and conflict of interest statement, tables, and figure legends, but *no* embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Journal of Oral Pathology & Medicine* will be reviewed by two experts in the field. *Journal of Oral Pathology & Medicine* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.6. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.7. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.8. Submission of Revised Manuscripts

To submit a revised manuscripts please locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Research Articles: of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology.

3.000 words maximum, 6 figures and/or tables, and no more than 30 references

Review Papers: *Journal of Oral Pathology & Medicine* commissions review papers and also welcomes uninvited reviews. Reviews should be submitted via the online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm> (<http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>) and are subject to peer-review.

3.000 words maximum, 6 figures and/or tables, and no more than 50 references

Case Reports: Please note that *Journal of Oral Pathology & Medicine* no longer accepts submissions of case reports.

Brief Reports: Original research material requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as Brief Reports. 1.000 words maximum.

Letters to the Editor: Letters, if of broad interest, are encouraged. Letters should not be confused with Brief Reports. Letters may deal with material in papers published in *Journal of Oral Pathology & Medicine* or they may raise new issues, but should have important implications.

750 words maximum. One figure or table, 5 references.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 6 published pages are subject to a charge of USD 163 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters.

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp (http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: Use only standard abbreviations (Vancouver System). All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. Useful is Baren DN, ed. *Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors.* 4. ed. London: Royal Society of Medicine.

Font: When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation.

5.3. Structure

All papers submitted to *Journal of Oral Pathology & Medicine* should include: title page, abstract, main text, references and tables, figures, figure legends and conflict of interest statement where appropriate. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal format will be returned to the author(s).

Title Page: Should be part of the manuscript document uploaded for review and include: The title of the article, a running title of no more than 50 letters and spaces, 2-5 keywords, complete names and institution for each author, corresponding author's name, address, email address and fax number.

Abstract: is limited to 250 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings in accordance with Index Medicus (Medical Subject Headings): background, methods, results and conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

Main Text of Original Articles: should be divided into introduction, material and methods, results and discussion.

Introduction: should clearly state the purpose of the article. Give only strictly pertinent references. Exhaustive literature reviews are inappropriate.

Materials and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a

condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This may for example include antibodies etc. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(i) Clinical trials: Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org (<http://www.consort-statement.org>). A CONSORT checklist (http://www.consort-statement.org/mod_product/uploads/CONSORT%202001%20checklist.doc) should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov (<http://www.clinicaltrials.gov/>), <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/> (<http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>), <http://isrctn.org/> (<http://isrctn.org/>). The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper. .

(ii) Experimental subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>)) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

(iii) Suppliers: Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Results: Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables, illustrations, or both: emphasize or summarize only important observations.

Discussion: Emphasize the new and important aspects of the study and conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data given in the Results section. Include in the Discussion the implications of the findings and their limitations and relate the observations to other relevant studies.

Main Text of Review Articles comprise an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and

conclusions. See also above under Ethical Guidelines.

Conflict of Interest Statement: All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see Conflicts of Interest (<http://www.icmje.org/#conflicts>) for generally accepted definitions on conflict of interest? See also above under Ethical Guidelines.

5.4. References

References should be kept to the pertinent minimum and numbered consecutively in the order in which they appear in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals (in parentheses). References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which are based on the formats used in Index Medicus. Try to avoid using abstracts as references. Include manuscripts accepted, but not published; designate the abbreviated title of the journal followed by (in press). Information from manuscripts not yet accepted, should be cited in the text as personal communication. The references must be verified by the author(s) against the original documents. Titles should be abbreviated in accordance with the style used in Index Medicus and the Vancouver System.

We recommend the use of a tool such as Reference Manager (<http://www.refman.com/>) for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp (<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>)

Examples of the Journal's reference style:

(1) Standard journal article

(List all authors when 6 or less; when 7 or more, list only the first 3 and add et al.)

BUCHNER A, SCIUBBA JJ. Peripheral epithelial odontogenic tumors: a review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1987; 63: 688-97.

HEINIC GS, GREENSPAN D, MACPHAIL LA, et al. Oral Histoplasma capsulatum infection in association with HIV infection: a case report. J Oral Pathol Med 1992; 21: 85-9.

(2) Corporate author

European Collaborative Study. Risk factors for mother-to-child transmission of HIV-1. Lancet 1992; 339: 1007-12.

(3) No author given

Anonymous. 'The importance of being early' [leader]. Br Dent J 1991; 170: 167.

(4) Journal supplement

MØLLER-PETERSEN J. Evaluation of diagnostic tests. Design and phases. Scand J Clin Lab Invest 1992; 52: suppl. (208): 35-50.

CROSS SS, SCHOLFIELD JH, KENNEDY A, COTTON DWK. Measuring the fractal dimension of tumour borders. J Pathol 1992; 168: 117A (abstr).

(5) Journal paginated by issue

HILLAM C. Dentistry in Europe in the 1790's. Dent Historian 1992; 22: (May): 31-4.

(6) Book

PINDBORG JJ. Atlas of diseases of the oral mucosa. Copenhagen: Munksgaard, 1992: 50-66.

(7) Chapter in a book

VAN DER WAAL I. Salivary gland neoplasms. In: PRABHU SR, WILSON DF, DAFTARY DK, JOHNSON NW, eds. Oral diseases in the tropics. Oxford: Oxford Medical, 1992; 478-86.

(8) Published proceedings paper

DRINNAN AJ. Review of the literature: educational aspects of oral medicine. In: MILLARD HD, MASON DK, eds. World workshop on oral medicine. Chicago: Year Book Medical, 1989; 5-11.

(9) Agency publication

MUIR C, WATERHOUSE J, MACK T, POWELL J, WHELAN S. Cancer incidence in five continents: Vol. 5. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1987; IARC Scientific Publications No. 88.

(10) Dissertation or thesis

CHUNGPANICH S. The diagnostic and prognostic potential of nucleolar organizer regions in oral epithelial dysplasia. MMedSci Thesis, University of Sheffield, 1989.

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page. Tables with greater than 6 columns will be counted as multiple tables.

Figures: All figures should clarify the text and their number be kept to a minimum. Text on figures should be in CAPITALS. Line drawings should be professionally drawn; half-tones should exhibit high contrast. Multi-paneled figures will be counted as multiple figures. Figures can contain multiple images as long as these are grouped together on one page per figure with one legend for each figure.

Due to space constraints within the Journal, no more than 6 figures and/or tables will be allowed

All figures and artwork must be provided in electronic format. Figure legends should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used: they should not contain any details of methods.

Submit your figures as EPS, TIFF or PDF files. Use 300 dpi resolution for photographic images and 600 dpi resolution for line art. Full details of the submission of artwork are available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

6. AFTER ACCEPTANCE

6.1 Proofs

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file.

6.2 Supporting Information

If you have previously provided Supporting Information with your article, please note it will not be edited or altered from its original format during the Production process. Although a

proof of your Supporting Information is not available, it will appear online when your article is published.

6.3 Early View

Journal of Oral Pathology & Medicine is covered by Wiley Blackwell Publishing's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. Early View articles are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.4 Offprints

The corresponding author will receive a free PDF offprint that can be downloaded via Author Services. Please sign up for the service if you would like to access your free article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> (<http://authorservices.wiley.com/bauthor>) for more information.

6.5 Author Services

Online production tracking through Wiley Blackwell's Author Services Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> (<http://authorservices.wiley.com/bauthor>) for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

7.3 – NORMAS DO PERIÓDICO 2



ISSN 0102-311X *versão impressa*

ISSN 1678-4464 *versión on-line*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo e política](#)
- [Forma e preparação de manuscritos](#)

Escopo e política

Cadernos de Saúde Pública/Reports in Public Health (CSP) publica artigos originais com elevado mérito científico que contribuam ao estudo da Saúde Coletiva em geral e disciplinas afins.

Forma e preparação de manuscritos

Recomendamos aos autores a leitura atenta das instruções abaixo antes de submeterem seus artigos a Cadernos de Saúde Pública.

1. CSP aceita trabalhos para as seguintes seções:

1.1 Revisão: revisão crítica da literatura sobre temas pertinentes à Saúde Coletiva (máximo de 8.000 palavras e 5 ilustrações);

1.2 Artigos: resultado de pesquisa de natureza empírica, experimental ou conceitual (máximo de 6.000 palavras e 5 ilustrações);

1.3 Comunicação Breve: relatando resultados preliminares de pesquisa, ou ainda resultados de estudos originais que possam ser apresentados de forma sucinta (máximo de 1.700 palavras e 3 ilustrações);

1.4 Debate: artigo teórico que se faz acompanhar de cartas críticas assinadas por autores de diferentes instituições, convidados pelas Editoras, seguidas de resposta do autor do artigo principal (máximo de 6.000 palavras e 5 ilustrações);

1.5 Fórum: seção destinada à publicação de 2 a 3 artigos coordenados entre si, de diferentes autores, e versando sobre tema de interesse atual (máximo de 12.000 palavras no total). Os interessados em submeter trabalhos para essa seção devem consultar o Conselho Editorial;

1.6 Perspectivas: análises de temas conjunturais, de interesse imediato, de importância para a Saúde Coletiva, em geral a convite das Editoras (máximo de 1.200 palavras).

1.7 Questões Metodológicas: artigo completo, cujo foco é a discussão, comparação e avaliação de aspectos metodológicos importantes para o campo, seja na área de desenho de estudos, análise de dados ou métodos qualitativos (máximo de 6.000 palavras e 5 ilustrações);

1.8 Resenhas: resenha crítica de livro relacionado ao campo temático de CSP, publicado nos últimos dois anos (máximo de 1.200 palavras);

1.9 Cartas: crítica a artigo publicado em fascículo anterior de CSP (máximo de 1.200 palavras e 1 ilustração).

2. Normas para envio de artigos

2.1 CSP publica somente artigos inéditos e originais, e que não

estejam em avaliação em nenhum outro periódico simultaneamente. Os autores devem declarar essas condições no processo de submissão. Caso seja identificada a publicação ou submissão simultânea em outro periódico o artigo será desconsiderado. A submissão simultânea de um artigo científico a mais de um periódico constitui grave falta de ética do autor.

2.2 Serão aceitas contribuições em Português, Inglês ou Espanhol.

2.3 Notas de rodapé e anexos não serão aceitos.

2.4 A contagem de palavras inclui o corpo do texto e as referências bibliográficas, conforme item 12.13.

3. Publicação de ensaios clínicos

3.1 Artigos que apresentem resultados parciais ou integrais de ensaios clínicos devem obrigatoriamente ser acompanhados do número e entidade de registro do ensaio clínico.

3.2 Essa exigência está de acordo com a recomendação do Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde (BIREME)/Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS)/Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre o Registro de Ensaios Clínicos a serem publicados a partir de orientações da OMS, do International Committee of Medical Journal Editors ([ICMJE](#)) e do Workshop ICTPR.

3.3 As entidades que registram ensaios clínicos segundo os critérios do ICMJE são:

- [Australian New Zealand Clinical Trials Registry](#) (ANZCTR)
- [ClinicalTrials.gov](#)
- [International Standard Randomised Controlled Trial Number](#) (ISRCTN)
- [Nederlands Trial Register](#) (NTR)
- [UMIN Clinical Trials Registry](#) (UMIN-CTR)
- [WHO International Clinical Trials Registry Platform](#) (ICTRP)

4. Fontes de financiamento

4.1 Os autores devem declarar todas as fontes de financiamento ou suporte, institucional ou privado, para a realização do estudo.

4.2 Fornecedores de materiais ou equipamentos, gratuitos ou com descontos, também devem ser descritos como fontes de financiamento, incluindo a origem (cidade, estado e país).

4.3 No caso de estudos realizados sem recursos financeiros institucionais e/ou privados, os autores devem declarar que a pesquisa não recebeu financiamento para a sua realização.

5. Conflito de interesses

5.1 Os autores devem informar qualquer potencial conflito de interesse, incluindo interesses políticos e/ou financeiros associados a patentes ou propriedade, provisão de materiais e/ou insumos e equipamentos utilizados no estudo pelos fabricantes.

6. Colaboradores

6.1 Devem ser especificadas quais foram as contribuições individuais de cada autor na elaboração do artigo.

6.2 Lembramos que os critérios de autoria devem basear-se nas deliberações do [ICMJE](#), que determina o seguinte: o reconhecimento da autoria deve estar baseado em contribuição substancial relacionada aos seguintes aspectos: 1. Concepção e projeto ou análise e interpretação dos dados; 2. Redação do artigo ou revisão crítica relevante do conteúdo intelectual; 3. Aprovação

final da versão a ser publicada. Essas três condições devem ser integralmente atendidas.

7. Agradecimentos

7.1 Possíveis menções em agradecimentos incluem instituições que de alguma forma possibilitaram a realização da pesquisa e/ou pessoas que colaboraram com o estudo, mas que não preencheram os critérios para serem coautores.

8. Referências

8.1 As referências devem ser numeradas de forma consecutiva de acordo com a ordem em que forem sendo citadas no texto. Devem ser identificadas por números arábicos sobrescritos (p. ex.: Silva 1). As referências citadas somente em tabelas e figuras devem ser numeradas a partir do número da última referência citada no texto. As referências citadas deverão ser listadas ao final do artigo, em ordem numérica, seguindo as normas gerais dos [Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos](#).

8.2 Todas as referências devem ser apresentadas de modo correto e completo. A veracidade das informações contidas na lista de referências é de responsabilidade do(s) autor(es).

8.3 No caso de usar algum *software* de gerenciamento de referências bibliográficas (p. ex.: EndNote), o(s) autor(es) deverá(ão) converter as referências para texto.

9. Nomenclatura

9.1 Devem ser observadas as regras de nomenclatura zoológica e botânica, assim como abreviaturas e convenções adotadas em disciplinas especializadas.

10. Ética em pesquisas envolvendo seres humanos

10.1 A publicação de artigos que trazem resultados de pesquisas envolvendo seres humanos está condicionada ao cumprimento dos princípios éticos contidos na [Declaração de Helsinki](#) (1964, reformulada em 1975, 1983, 1989, 1996, 2000 e 2008), da Associação Médica Mundial.

10.2 Além disso, deve ser observado o atendimento a legislações específicas (quando houver) do país no qual a pesquisa foi realizada.

10.3 Artigos que apresentem resultados de pesquisas envolvendo seres humanos deverão conter uma clara afirmação deste cumprimento (tal afirmação deverá constituir o último parágrafo da seção Métodos do artigo).

10.4 Após a aceitação do trabalho para publicação, todos os autores deverão assinar um formulário, a ser fornecido pela Secretaria Editorial de CSP, indicando o cumprimento integral de princípios éticos e legislações específicas.

10.5 O Conselho Editorial de CSP se reserva o direito de solicitar informações adicionais sobre os procedimentos éticos executados na pesquisa.

11. Processo de submissão online

11.1 Os artigos devem ser submetidos eletronicamente por meio do sítio do Sistema de Avaliação e Gerenciamento de Artigos (SAGAS), disponível em: <http://cademos.ensp.fiocruz.br/csp/index.php>.

11.2 Outras formas de submissão não serão aceitas. As instruções completas para a submissão são apresentadas a seguir. No caso de

dúvidas, entre em contato com o suporte sistema SAGAS pelo e-mail: csp-artigos@ensp.fiocruz.br.

11.3 Inicialmente o autor deve entrar no sistema [SAGAS](#). Em seguida, inserir o nome do usuário e senha para ir à área restrita de gerenciamento de artigos. Novos usuários do sistema SAGAS devem realizar o cadastro em "Cadastre-se" na página inicial. Em caso de esquecimento de sua senha, solicite o envio automático da mesma em "Esqueceu sua senha? Clique aqui".

11.4 Para novos usuários do sistema SAGAS. Após clicar em "Cadastre-se" você será direcionado para o cadastro no sistema SAGAS. Digite seu nome, endereço, e-mail, telefone, instituição.

12. Envio do artigo

12.1 A submissão *online* é feita na área restrita de gerenciamento de artigos: <http://cadernos.ensp.fiocruz.br/csp/index.php>. O autor deve acessar a "Central de Autor" e selecionar o link "Submeta um novo artigo".

12.2 A primeira etapa do processo de submissão consiste na verificação às normas de publicação de CSP. O artigo somente será avaliado pela Secretaria Editorial de CSP se cumprir todas as normas de publicação.

12.3 Na segunda etapa são inseridos os dados referentes ao artigo: título, título resumido, área de concentração, palavras-chave, informações sobre financiamento e conflito de interesses, resumos e agradecimentos, quando necessário. Se desejar, o autor pode sugerir potenciais consultores (nome, e-mail e instituição) que ele julgue capaz de avaliar o artigo.

12.4 O título completo (nos idiomas Português, Inglês e Espanhol) deve ser conciso e informativo, com no máximo 150 caracteres com espaços.

12.5 O título resumido poderá ter máximo de 70 caracteres com espaços.

12.6 As palavras-chave (mínimo de 3 e máximo de 5 no idioma original do artigo) devem constar na base da Biblioteca Virtual em Saúde ([BVS](#)).

12.7 *Resumo*. Com exceção das contribuições enviadas às seções Resenha, Cartas ou Perspectivas, todos os artigos submetidos deverão ter resumo em Português, Inglês e Espanhol. Cada resumo pode ter no máximo 1.100 caracteres com espaço.

12.8 *Agradecimentos*. Possíveis agradecimentos às instituições e/ou pessoas poderão ter no máximo 500 caracteres com espaço.

12.9 Na terceira etapa são incluídos o(s) nome(s) do(s) autor(es) do artigo, respectiva(s) instituição(ões) por extenso, com endereço completo, telefone e e-mail, bem como a colaboração de cada um. O autor que cadastrar o artigo automaticamente será incluído como autor de artigo. A ordem dos nomes dos autores deve ser a mesma da publicação.

12.10 Na quarta etapa é feita a transferência do arquivo com o corpo do texto e as referências.

12.11 O arquivo com o texto do artigo deve estar nos formatos DOC (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format) ou ODT (Open Document Text) e não deve ultrapassar 1 MB.

12.12 O texto deve ser apresentado em espaço 1,5cm, fonte Times New Roman, tamanho 12.

12.13 O arquivo com o texto deve conter somente o corpo do artigo e as referências bibliográficas. Os seguintes itens deverão ser inseridos em campos à parte durante o processo de submissão: resumos; nome(s) do(s) autor(es), afiliação ou qualquer outra informação que identifique o(s) autor(es); agradecimentos e colaborações; ilustrações (fotografias, fluxogramas, mapas,

gráficos e tabelas).

12.14 Na quinta etapa são transferidos os arquivos das ilustrações do artigo (fotografias, fluxogramas, mapas, gráficos e tabelas), quando necessário. Cada ilustração deve ser enviada em arquivo separado clicando em "Transferir".

12.15 *Ilustrações.* O número de ilustrações deve ser mantido ao mínimo, conforme especificado no item 1 (fotografias, fluxogramas, mapas, gráficos e tabelas).

12.16 Os autores deverão arcar com os custos referentes ao material ilustrativo que ultrapasse o limite e também com os custos adicionais para publicação de figuras em cores.

12.17 Os autores devem obter autorização, por escrito, dos detentores dos direitos de reprodução de ilustrações que já tenham sido publicadas anteriormente.

12.18 *Tabelas.* As tabelas podem ter 17cm de largura, considerando fonte de tamanho 9. Devem ser submetidas em arquivo de texto: DOC (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format) ou ODT (Open Document Text). As tabelas devem ser numeradas (números arábicos) de acordo com a ordem em que aparecem no texto.

12.19 *Figuras.* Os seguintes tipos de figuras serão aceitos por CSP: Mapas, Gráficos, Imagens de satélite, Fotografias e Organogramas, e Fluxogramas.

12.20 Os mapas devem ser submetidos em formato vetorial e são aceitos nos seguintes tipos de arquivo: WMF (Windows MetaFile), EPS (Encapsuled PostScript) ou SVG (Scalable Vectorial Graphics). Nota: os mapas gerados originalmente em formato de imagem e depois exportados para o formato vetorial não serão aceitos.

12.21 Os gráficos devem ser submetidos em formato vetorial e serão aceitos nos seguintes tipos de arquivo: XLS (Microsoft Excel), ODS (Open Document Spreadsheet), WMF (Windows MetaFile), EPS (Encapsuled PostScript) ou SVG (Scalable Vectorial Graphics).

12.22 As imagens de satélite e fotografias devem ser submetidas nos seguintes tipos de arquivo: TIFF (Tagged Image File Format) ou BMP (Bitmap). A resolução mínima deve ser de 300dpi (pontos por polegada), com tamanho mínimo de 17,5cm de largura.

12.23 Os organogramas e fluxogramas devem ser submetidos em arquivo de texto ou em formato vetorial e são aceitos nos seguintes tipos de arquivo: DOC (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format), ODT (Open Document Text), WMF (Windows MetaFile), EPS (Encapsuled PostScript) ou SVG (Scalable Vectorial Graphics).

12.24 As figuras devem ser numeradas (números arábicos) de acordo com a ordem em que aparecem no texto.

12.25 Títulos e legendas de figuras devem ser apresentados em arquivo de texto separado dos arquivos das figuras.

12.26 *Formato vetorial.* O desenho vetorial é originado a partir de descrições geométricas de formas e normalmente é composto por curvas, elipses, polígonos, texto, entre outros elementos, isto é, utilizam vetores matemáticos para sua descrição.

12.27 *Finalização da submissão.* Ao concluir o processo de transferência de todos os arquivos, clique em "Finalizar Submissão".

12.28 *Confirmação da submissão.* Após a finalização da submissão o autor receberá uma mensagem por e-mail confirmando o recebimento do artigo pelos CSP. Caso não receba o e-mail de confirmação dentro de 24 horas, entre em contato com a Secretaria Editorial de CSP por meio do e-mail: csp-artigos@ensp.fiocruz.br.

13. Acompanhamento do processo de avaliação do artigo

13.1 O autor poderá acompanhar o fluxo editorial do artigo pelo sistema SAGAS. As decisões sobre o artigo serão comunicadas por e-mail e disponibilizadas no sistema SAGAS.

13.2 O contato com a Secretaria Editorial de CSP deverá ser feito através do sistema SAGAS.

14. Envio de novas versões do artigo

14.1 Novas versões do artigo devem ser encaminhadas usando-se a área restrita de gerenciamento de artigos do sistema [SAGAS](#), acessando o artigo e utilizando o *link* "Submeter nova versão".

15. Prova de prelo

15.1 Após a aprovação do artigo, a prova de prelo será enviada para o autor de correspondência por e-mail. Para visualizar a prova do artigo será necessário o programa Adobe Reader ou similar. Esse programa pode ser instalado gratuitamente pelo *site*: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

15.2 A prova de prelo revisada e as declarações devidamente assinadas deverão ser encaminhadas para a Secretaria Editorial de CSP por e-mail (cadernos@ensp.fiocruz.br) ou por fax +55(21)2598-2737 dentro do prazo de 72 horas após seu recebimento pelo autor de correspondência.

[[Home](#)] [[Sobre esta revista](#)] [[Corpo editorial](#)] [[Assinaturas](#)]



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

**Rua Leopoldo Bulhões, 1480
21041-210 Rio de Janeiro RJ Brazil
Tel.:+55 21 2598-2511
Fax: +55 21 2598-2737 / +55 21 2598-2514**



cadernos@fiocruz.br

7.4 – NORMAS DO PERIÓDICO 3

- [Escopo e política](#)
- [Forma e preparação de manuscritos](#)
- [Envio de manuscritos](#)
- [Modelos](#)

Escopo e política

A Revista de Odontologia da UNESP tem como missão publicar artigos científicos inéditos de pesquisa básica e aplicada que constituam avanços do conhecimento científico na área de Odontologia, respeitando os indicadores de qualidade.

ITENS EXIGIDOS PARA A APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

- Os artigos enviados para publicação devem ser inéditos e não ter sido submetidos simultaneamente a outro periódico. A Revista de Odontologia da UNESP reserva-se todo o direito autoral dos trabalhos publicados, inclusive tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução como transcrição com a devida citação da fonte.
- Podem ser submetidos artigos escritos em português ou inglês. O texto em inglês, após aceito para publicação, deverá ser submetido a uma revisão gramatical do idioma por empresa reconhecida pela Revista.
- A Revista de Odontologia da UNESP tem publicação bimestral e tem o direito de submeter todos os artigos a um corpo de revisores, totalmente autorizados para decidir pela aceitação, ou para devolvê-los aos autores com sugestões e modificações no texto, e/ou para adaptação às regras editoriais da revista.
- Os conceitos afirmados nos trabalhos publicados são de inteira responsabilidade dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião do Editor Científico ou do Corpo Editorial.
- As datas do recebimento do artigo, bem como sua aprovação, devem constar na publicação.

CRITÉRIOS DE ANÁLISE DOS ARTIGOS

- Os artigos são avaliados primeiramente quanto ao cumprimento das normas de publicação e analisados em programa específico quanto a ocorrência de plágio.
- Os artigos que estiverem de acordo com as normas são avaliados por um Editor de Área, que o encaminha ao Editor Científico para uma análise quanto à adequação ao escopo e quanto a critérios mínimos de qualidade científica e de redação. Depois da análise, o Editor Científico pode recusar os artigos, com base na avaliação do Editor de Área, ou encaminhá-los para avaliação por pares.
- Os artigos aprovados para avaliação pelos pares são submetidos à análise quanto ao mérito e método científico por, no mínimo, dois revisores; mantendo-se sigilo total das identidades dos autores.
- Quando necessária revisão, o artigo é devolvido ao autor correspondente para as alterações, mantendo-se sigilo total das identidades dos revisores. A versão revisada é ressubmetida, pelos autores, acompanhada por uma carta resposta (*cover letter*), explicando cada uma das alterações realizadas no artigo a pedido dos revisores. As sugestões que não forem aceitas devem vir acompanhadas de justificativas convincentes. As alterações devem ser

destacadas no texto do artigo em negrito ou em outra cor. Quando as sugestões e/ou correções forem feitas diretamente no texto, recomendam-se modificações nas configurações do Word, para que a identidade do autor seja preservada. O artigo revisado e a carta resposta são, inicialmente, avaliados pelo Editor Científico, que os envia aos revisores, quando solicitado.

- Nos casos de inadequação da língua portuguesa ou inglesa, uma revisão técnica por um especialista é solicitada aos autores.

- Nos casos em que o artigo for rejeitado por um dos dois revisores, o Editor Científico decide sobre seu envio para a análise de um terceiro revisor.

- Nos casos de dúvida sobre a análise estatística, esta é avaliada pelo estatístico consultor da revista.

CORREÇÃO DAS PROVAS DOS ARTIGOS

- A prova final dos artigos é enviada ao autor correspondente através de *e-mail* com um *link* para baixar o artigo diagramado em PDF para aprovação final.

- O autor dispõe de um prazo de 72 horas para correção e devolução do original devidamente revisado, se necessário.

- Se não houver retorno da prova em 72 horas, o Editor Científico considera como final a versão sem alterações, e não são mais permitidas maiores modificações. Apenas pequenas modificações, como correções de ortografia e verificação das ilustrações, são aceitas. Modificações extensas implicam a reapreciação pelos revisores e atraso na publicação do artigo.

- A inclusão de novos autores não é permitida nessa fase do processo de publicação.

Forma e preparação de manuscritos

SUBMISSÃO DOS ARTIGOS

Todos os manuscritos devem vir, obrigatoriamente, acompanhados da **Carta de Submissão**, do **Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição**, como também da **Declaração de Responsabilidade**, da **Transferência de Direitos Autorais** e da **Declaração de Conflito de Interesse** (documento explicitando presença ou não de conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade do trabalho científico) assinada pelo(s) autor(es) (modelos anexos). O manuscrito deve ser enviado em dois arquivos: um deles deve conter somente o título do trabalho e respectivos autores; o outro, o artigo completo sem a identificação dos autores.

PREPARAÇÃO DO ARTIGO

Deverão ser encaminhados a revista os arquivos:

1. página de identificação
2. artigo
3. ilustrações
4. carta de submissão
5. cópia do certificado da aprovação em Comitê de Ética, **Declaração de Responsabilidade**, **Transferência de Direitos Autorais** e **Declaração de Conflito de Interesse**

Página de identificação

A página de identificação deve conter as seguintes informações:

- títulos em português e em inglês devem ser concisos e refletir o objetivo do estudo.
- nomes por extenso dos autores (sem abreviatura), com destaque para o sobrenome (em negrito ou

em maiúsculo) e na ordem a ser publicado; nomes da instituição aos quais são afiliados (somente uma instituição), com a respectiva sigla da instituição (UNESP, USP, UNICAMP, etc.); cidade, estado (sigla) e país (Exemplo: Faculdade de Odontologia, UNESP Univ - Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil). Os autores deverão ser de no máximo 5 (cinco). Quando o estudo for desenvolvido por um número maior que 5 pesquisadores, deverá ser enviada justificativa, em folha separada, com a descrição da participação de todos os autores. A revista irá analisar a justificativa baseada nas diretrizes do "International Committee of Medical Journal Editors", disponíveis em http://www.icmje.org/ethical_1author.html.

- endereço completo do autor correspondente, a quem todas as correspondências devem ser endereçadas, incluindo telefone, fax e e-mail;

- e-mail de todos os autores.

Artigo

O texto, incluindo resumo, *abstract*, tabelas, figuras e referências, deve estar digitado no formato .doc, preparado em Microsoft Word 2007 ou posterior, fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço duplo, margens laterais de 3 cm, superior e inferior com 2,5 cm, e conter um total de 20 laudas. Todas as páginas devem estar numeradas a partir da página de identificação.

Resumo e Abstract

O artigo deve conter RESUMO e ABSTRACT precedendo o texto, com o máximo de 250 palavras, estruturado em seções: introdução; objetivo; material e método; resultado; e conclusão. Nenhuma abreviação ou referência (citação de autores) deve estar presente.

Descritores/Descriptors

Indicar os Descritores/Descriptors com números de 3 a 6, identificando o conteúdo do artigo, e mencioná-los logo após o RESUMO e o ABSTRACT.

Para a seleção dos Descritores/Descriptors, os autores devem consultar a lista de assuntos do MeSH Data Base (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>) e os Descritores em Ciências da Saúde - DeCS (<http://decs.bvs.br/>).

Deve-se utilizar ponto e vírgula para separar os descritores/descriptors, que devem ter a primeira letra da primeira palavra em letra maiúscula.

Exemplos: Descritores: Resinas compostas; dureza.

Descriptors: Photoelasticity; passive fit.

Introdução

Explicar precisamente o problema, utilizando literatura pertinente, identificando alguma lacuna que justifique a proposição do estudo. No final da introdução, estabelecer a hipótese a ser avaliada.

Material e método

Apresentar com detalhes suficientes para permitir a confirmação das observações e possibilitar sua reprodução. Incluir cidade, estado e país de todos os fabricantes, depois da primeira citação dos produtos, instrumentos, reagentes ou equipamentos.

Métodos já publicados devem ser referenciados, exceto se modificações tiverem sido feitas. No final do capítulo, descrever os métodos estatísticos utilizados.

Resultado

Os resultados devem ser apresentados seguindo a sequência do Material e método, com tabelas, ilustrações, etc. Não repetir no texto todos os dados das tabelas e ilustrações, enfatizando somente as observações importantes. Utilizar o mínimo de tabelas e de ilustrações possível.

Discussão

Discutir os resultados em relação à hipótese testada e à literatura (concordando ou discordando de outros estudos, explicando os resultados diferentes). Destacar os achados do estudo e não repetir dados ou informações citados na introdução ou nos resultados. Relatar as limitações do estudo e sugerir estudos futuros.

Conclusão

A(s) conclusão(ões) deve(m) ser coerentes com o(s) objetivo(s), extraídas do estudo, não repetindo simplesmente os resultados.

Agradecimentos

Agradecimentos às pessoas que tenham contribuído de maneira significativa para o estudo e agências de fomento devem ser realizadas neste momento. Para o(s) auxílio(s) financeiro(s) deve(m) ser citado o(s) nome(s) da(s) organização(ões) de apoio de fomento e o(s) número(s) do(s) processo(s).

Ilustrações e tabelas

As ilustrações, tabelas e quadros são limitadas no máximo de 4 (quatro). As ilustrações (figuras, gráficos, desenhos, etc.), são consideradas no texto como figuras. Devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem em que aparecem no texto e indicadas ao longo do Texto do Manuscrito, logo após sua primeira citação com as respectivas legendas. As figuras devem estar em cores originais, digitalizadas em formato tif, gif ou jpg, com no mínimo 300dpi de resolução, 86 mm (tamanho da coluna) ou 180 mm (tamanho da página inteira). As legendas correspondentes devem ser claras, e concisas. As tabelas e quadros devem ser organizadas e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem em que aparecem no texto e indicadas ao longo do Texto do Manuscrito, logo após sua primeira citação com as respectivas legendas. A legenda deve ser colocada na parte superior. As notas de rodapé devem ser indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

Citação de autores no texto

Os autores devem ser citados no texto em ordem ascendente

A citação dos autores no texto pode ser feita de duas formas:

Numérica: as referências devem ser citadas de forma sobrescrita.

Exemplo: Radiograficamente, é comum observar o padrão de "escada", caracterizado por uma radiolucidez entre os ápices dos dentes e a borda inferior da mandíbula.^{6,10,11,13}

Alfanumérica

- um autor: Ginnan⁴
- dois autores: separados por vírgula - Tunga, Bodrumlu¹³
- três autores ou mais de três autores: o primeiro autor seguido da expressão et al. - Shipper et al.²

Exemplo: As técnicas de obturação utilizadas nos estudos abordados não demonstraram ter tido influência sobre os resultados obtidos, segundo Shipper et al.² e Biggs et al.⁵ Shipper et al.², Tunga, Bodrumlu¹³ e Wedding et al.¹⁸, [...]

Referências

Todas as referências devem ser citadas no texto; devem também ser ordenadas e numeradas na mesma sequência em que aparecem no texto. Citar no máximo 25 referências.

As Referências devem seguir os requisitos da *National Library of Medicine* (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>).

Os títulos dos periódicos devem ser referidos de forma abreviada, sem negrito, itálico ou grifo, de acordo com o *Journals Data Base* (PubMed) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>), e, para os periódicos nacionais, verificar o Portal de Revistas Científicas em Ciências da Saúde da Bireme (<http://portal.revistas.bvs.br/?lang=pt>).

A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do(s) autor(es) do artigo. Citar apenas as referências relevantes ao estudo.

Referências à comunicação pessoal, trabalhos em andamento, artigos *in press*, resumos, capítulos de livros, dissertações e teses não devem constar da listagem de referências. Quando essenciais, essas citações devem ser registradas por asteriscos- no rodapé da página do texto em que são mencionadas.

EXEMPLOS DE REFERÊNCIAS

ARTIGOS DE PERIÓDICOS

Duane B. Conservative periodontal surgery for treatment of intrabony defects is associated with improvements in clinical parameters. *Evid Based Dent.* 2012;13(4):115-6.

Litonjua LA, Cabanilla LL, Abbott LJ. Plaque formation and marginal gingivitis associated with restorative materials. *Compend Contin Educ Dent*. 2012 Jan;33(1):E6-E10.

Sutej I, Peros K, Benutic A, Capak K, Basic K, Rosin-Grget K. Salivary calcium concentration and periodontal health of young adults in relation to tobacco smoking. *Oral Health Prev Dent*. 2012;10(4):397-403.

Tawil G, Akl FA, Dagher MF, Karam W, Abdallah Hajj Hussein I, Leone A, et al. Prevalence of IL-1beta+3954 and IL-1alpha-889 polymorphisms in the Lebanese population and its association with the severity of adult chronic periodontitis. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012 Oct-Dec;26(4):597-606.

Goyal CR, Klukowska M, Grender JM, Cunningham P, Qaqish J. Evaluation of a new multi-directional power toothbrush versus a marketed sonic toothbrush on plaque and gingivitis efficacy. *Am J Dent*. 2012 Sep;25 Spec No A(A):21A-26A.

Caraivan O, Manolea H, Corlan Puşcu D, Fronie A, Bunget A, Mogoantă L. Microscopic aspects of pulpal changes in patients with chronic marginal periodontitis. *Rom J Morphol Embryol*. 2012;53(3 Suppl):725-9.

LIVROS

Domitti SS. Prótese total articulada com prótese parcial removível. São Paulo: Santos; 2001.

Todescan R, Silva EEB, Silva OJ. Prótese parcial removível : manual de aulas práticas disciplina I. São Paulo: Santos ; 2001.

Gold MR, Siegal JE, Russell LB, Weintein MC, editors. Costeffectiveness in health and medicine. Oxford: Oxford University Press; 1997.

PRINCÍPIOS ÉTICOS E REGISTRO DE ENSAIOS CLÍNICOS

- Procedimentos experimentais em animais e em humanos

Estudo em Humanos: Todos os trabalhos que relatam experimentos com humanos, ou que utilizem partes do corpo ou órgãos humanos (como dentes, sangue, fragmentos de biópsia, saliva, etc.), devem seguir os princípios éticos estabelecidos e ter documento que comprove sua aprovação (protocolo e relatório final) por um Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos (registrado na CONEP) da Instituição do autor ou da Instituição em que os sujeitos da pesquisa foram recrutados, conforme Resolução 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

Estudo em animais: Em pesquisas envolvendo experimentação animal, é necessário que o protocolo e seu relatório final tenham sido aprovados pelo Comitê de Pesquisa em Animais da Instituição do autor ou da Instituição em que os animais foram obtidos e realizado o experimento.

O Editor Científico e o Conselho Editorial se reservam o direito de recusar artigos que não demonstrem evidência clara de que esses princípios foram seguidos ou que, ao seu julgamento, os métodos empregados não foram apropriados para o uso de humanos ou de animais nos trabalhos submetidos a este periódico.

Ética na Pesquisa: a Revista de Odontologia da UNESP preza durante todo o processo de avaliação dos artigos pelo mais alto padrão ético. Todos os Autores, Editores e Revisores são encorajados a estudarem e seguirem as orientações do Committee on Publication Ethics - COPE (<http://publicationethics.org>, http://publicationethics.org/files/International%20standards_authors_for%20website_11_Nov_2011.pdf, http://publicationethics.org/files/International%20standard_editors_for%20website_11_Nov_2011.pdf) em todas as etapas do processo. Nos casos de suspeita de má conduta ética, está será analisada pelo Editor chefe que tomará providências para que seja esclarecido. Quando necessário a revista poderá publicar correções, retratações e esclarecimentos.

Casos omissos nestas normas são resolvidos pelo Editor Científico e pela Comissão Editorial.

ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES DE MEDIDA

Para unidades de medida, devem ser utilizadas as unidades legais do Sistema Internacional de Medidas.

MEDICAMENTOS E MATERIAIS

Nomes de medicamentos e de materiais registrados, bem como produtos comerciais, devem aparecer

entre parênteses, após a citação do material, e somente uma vez (na primeira).

Envio de manuscritos

Editor Chefe

Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

E-mail: adriana@foar.unesp.br

O artigo para publicação deve ser enviado exclusivamente pelo link de submissão online: <http://www.scielo.br/rounesp>

Modelos

- [Carta de Submissão, Responsabilidade, Transferência de Direitos Autorais](#)
- [Declaração de Conflito de Interesse](#)

[[Home](#)] [[Sobre a revista](#)] [[Corpo editorial](#)] [[Assinaturas](#)]



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

Revista de Odontologia da UNESP/Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Rua Humaitá, 1680 - Centro - Caixa Postal 331,
CEP 14801-903, Araraquara, São Paulo - Brasil.
Tel.: +55 16 3301-6376
Fax: +55 16 3301-6433



adriana@foar.unesp.br