



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



## **Monografia**

# **Associação entre genes de suscetibilidade (*GSTM1* e *GSTT1*) e câncer na população de Monte Santo - Bahia**

**Laércio Moreira Cardoso-Júnior**

Salvador (Bahia)  
Outubro, 2016

## FICHA CATALOGRÁFICA

(elaborada pela Bibl. Maria de Fátima Mendes Martinelli, da Biblioteca Universitária de Saúde/SIBI-UFBA/UFBA)

C268	<p>Cardoso-Júnior, Laércio Moreira</p> <p>Associação entre genes de suscetibilidade (<i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>) e câncer na população de Monte Santo - Bahia/ Laércio Moreira Cardoso-Júnior. (Salvador, Bahia): LM, Cardoso-Júnior, 2016</p> <p>VIII, 43 p.: il.</p> <p>Monografia, como exigência parcial e obrigatória para conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB), da Universidade Federal da Bahia (UFBA)</p> <p>Professor orientador: Angelina Xavier Acosta</p> <p>Palavras chaves: 1. Glutathione Transferase; 2. Neoplasias; 3. Genética Médica. I. Acosta, Angelina Xavier. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. III. Título.</p> <p>CDU: 575:616-006(813.8)</p>
------	--



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



## **Monografia**

# **Associação entre genes de suscetibilidade (*GSTM1* e *GSTT1*) e câncer na população de Monte Santo - Bahia**

**Laércio Moreira Cardoso-Júnior**

Professor orientador: **Angelina Xavier Acosta**

Monografia apresentada à Coordenação do Componente Curricular MED-B60/2016.1, como pré-requisito parcial à avaliação desse conteúdo curricular da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

Salvador (Bahia)  
Outubro, 2016

**Monografia:** *Associação entre genes de suscetibilidade (GSTM1 e GSTT1) e câncer na população de Monte Santo - Bahia*, de **Laércio Moreira Cardoso-Júnior**.

Professor orientador: **Angelina Xavier Acosta**

**COMISSÃO REVISORA:**

- **Angelina Xavier Acosta** (Presidente, Professora orientadora), Professora do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Lília Maria de Azevedo Moreira**, Professora do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia.
- **Ryan dos Santos Costa**, Professor do Departamento de Biorregulação do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Membro suplente

**Maria Betânia Pereira Toralles**, Professora do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia

**TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO:** Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no X Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

*Não me exalto.  
Sei que virá o dia das respostas  
E profetizo-me clara e desarmada.*  
(extraído do poema “A Esfinge”, de **Myriam Fraga**)

Aos Meus Pais, **Leide Mota** e  
**Laércio Cardoso.**

## EQUIPE

- Laércio Moreira Cardoso-Júnior, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: [laerciop53@gmail.com](mailto:laerciop53@gmail.com);
- Professor orientador: Angelina Xavier Acosta. Correio-e: [axacosta@hotmail.com](mailto:axacosta@hotmail.com);
- Kiyoko Abe Sandes. Pesquisadora do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular – ICS/UFBA. Correio-e: [kabesandes@yahoo.com](mailto:kabesandes@yahoo.com)
- Polyanna Carôzo de Oliveira. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa - CPqGM/FIOCRUZ-BA. Correio-e: [polycarozo@hotmail.com](mailto:polycarozo@hotmail.com)
- Ivana Lucia de Oliveira Nascimento. Pesquisadora do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular – ICS/UFBA. Correio-e: [ivana@nob-ba.com.br](mailto:ivana@nob-ba.com.br)
- Taísa Manuela Bonfim Machado-Lopes. Pesquisadora do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular – ICS/UFBA. Correio-e: [taisamanuela@hotmail.com](mailto:taisamanuela@hotmail.com)
- Thaís Ferreira Bomfim. Pesquisadora do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular – ICS/UFBA. Correio-e: [thaisbomfim@gmail.com](mailto:thaisbomfim@gmail.com)

## INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

### UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)
- Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
- Hospital Universitário Prof. Edgard Santos (HUPES)

## FONTES DE FINANCIAMENTO

1. Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB);
2. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); e
3. Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INaGeMP).

## AGRADECIMENTOS

- ◆ À minha Professora Orientadora, Dra **Angelina Xavier Acosta**, pela substantiva orientação acadêmica, pelos exemplos como profissional e por me “adotar” durante toda a graduação.
- ◆ À Dra **Kiyoko Abe Sandes**, minha Coorientadora, pelos ensinamentos acadêmicos, carinho e por me transmitir sua tamanha tranquilidade.
- ◆ À Doutoranda **Polyanna Carôzo de Oliveira**, minha Orientadora tutora, pela companhia e auxílio constantes em todas as etapas de realização desse trabalho, além da grande amizade construída.
- ◆ Às Dras **Ivana Nascimento**, **Thaís Bomfim** e **Taísa Manuela** e à bióloga **Selma São Bernardo**, pela participação e auxílios durante a realização do projeto.
- ◆ Ao Dr **Ryan dos Santos Costa** e à Dra **Lília Maria de Azevedo Moreira**, membros da Comissão Revisora desta Monografia, sem os quais muito deixaria ter aprendido. Meus especiais agradecimentos pela constante disponibilidade.
- ◆ À Dra **Maria Betânia Pereira Toralles**, pelos ensinamentos de genética clínica, pela presença constante na minha formação e disponibilidade durante toda a graduação.
- ◆ Aos professores e médicos: Dra **Eliane Azevêdo**, Dr **Ronaldo Jacobina** e Dr **Edilton Silva**, pelos exemplos de vida, ensinamentos e por me tornarem mais humano a cada encontro.
- ◆ Ao **Serviço de Genética Médica do HUPES, LABIMUNO, SIAT, Projeto Genética no Sertão/SISGENE, LAGeM**, em especial para **Gildásio Carvalho, Esmeralda Alves, Graziela Paz, Paula Brito, Aruanã Fontes, Jéssica Fernandes e Dione Tavares**.
- ◆ A todos grupos e centros que passei durante a graduação, essenciais na minha formação acadêmica: **IFBA, GENEV, FIOCRUZ, USP-RP, UdL, IRBLleida, NETBIO, LADERM e GERIR**.
- ◆ Aos meus familiares, em especial meus pais **Leide Mota** e **Laércio Cardoso** e minha avó **Nivalda Mota**.
- ◆ Aos amigos essenciais e indispensáveis: **Reinaldo Macedo, Ábdon Brito, Lucas Tadeu e Ícaro Piton**.
- ◆ Ao amigo **Thalis Ferreira** pelos auxílios no desenvolvimento do trabalho.
- ◆ *A los amigos mexicanos “Cachitos y Chatos”, la mama Rosa en Cataluña y el amigo Andrés en Valencia.*
- ◆ Às agências de fomento: **CNPq, FAPESB, PIBIC-UFBA e INAGEMP**.
- ◆ À **população de Monte Santo** e seus **profissionais de saúde**, sem os quais esse trabalho não seria possível.



## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS</b>	<b>2</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	<b>3</b>
<b>I. RESUMO</b>	<b>4</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>5</b>
<b>III. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>6</b>
III.1. Conceito e epidemiologia	6
III.2. Biologia molecular do câncer	7
III.3. Glutathiona-S-transferases	9
III.4. <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i>	10
III.5. Monte Santo	11
III.6. Censo Genética no Sertão	12
<b>IV. METODOLOGIA</b>	<b>13</b>
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>16</b>
<b>VI. DISCUSSÃO</b>	<b>22</b>
<b>VII. CONCLUSÕES</b>	<b>28</b>
<b>VIII. SUMMARY</b>	<b>29</b>
<b>IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>30</b>
<b>X. ANEXOS</b>	<b>34</b>
• ANEXO I: Ficha de coleta de dados	35
• ANEXO II: Parecer de aprovação no CEP	37
• ANEXO III: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	41

## ÍNDICE DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

### **FIGURA**

- FIGURA I.** Representação esquemática das bases moleculares do câncer. **8**  
**FIGURA 1.** Gel de agarose com resultado de genotipagem das amostras. **19**

### **QUADRO**

- QUADRO I.** Número de internações por câncer por local de procedência, no período de 2008 a 2015. **7**  
**QUADRO 1.** *Primers* utilizados para cada gene de suscetibilidade. **14**

### **TABELAS**

- TABELA 1.** Dados sociodemográficos da amostra avaliada. **18**  
**TABELA 2.** Tipos de câncer encontrados nos casos que compõem a amostra. **19**  
**TABELA 3.** Frequência gênica de *GSTT1* e *GSTMI* na amostra estudada. **19**  
**TABELA 4.** Frequência de genótipos combinados para *GSTT1* e *GSTMI* na amostra. **20**  
**TABELA 5.** Genotipagem para o *GSTT1* de acordo com a ancestralidade fenotípica. **20**  
**TABELA 6.** Genotipagem para o *GSTMI* de acordo com a ancestralidade fenotípica. **21**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>CICAN</b>	Centro Estadual de Oncologia
<b>CYP1A1</b>	Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1
<b>DATASUS</b>	Departamento de Informática do SUS
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>GSH</b>	Glutathione
<b>GST</b>	Glutathione-S-transferase
<b>GSTM1</b>	Glutathione S-transferase Mu 1
<b>GSTP1</b>	Glutathione S-transferase Pi 1
<b>GSTT1</b>	Glutathione S-transferase theta-1
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>INCA</b>	Instituto Nacional de Câncer
<b>OR</b>	Odds ratio
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TFD</b>	Tratamento Fora de Domicílio
<b>TP53</b>	Tumor Protein P53
<b>XRCC1</b>	X-ray repair cross-complementing protein 1
<b>XRCC3</b>	X-ray repair cross complementing 3

## I. RESUMO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE GENES DE SUSCETIBILIDADE (*GSTM1* E *GSTT1*) E CÂNCER NA POPULAÇÃO DE MONTE SANTO-BA.** O câncer é um grupo de doenças genéticas que têm em comum o crescimento desordenado de células num tecido ou órgão, podendo espalhar-se para outras regiões do organismo. É resultado de uma série de alterações em genes envolvidos na biologia do tumor. O município de Monte Santo apresenta alta taxa de consanguinidade e frequência aumentada de doenças genéticas, justificando a necessidade de se estudar as bases moleculares de doenças como o câncer, que tem aumentado sua importância epidemiológica na região. O objetivo deste trabalho foi verificar a associação entre as deleções nos genes de suscetibilidade *GSTM1*, *GSTT1* e o câncer em uma amostra da população de Monte Santo-BA. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, antes da coleta do material biológico. Foram selecionados 76 indivíduos com diferentes tipos de câncer e 76 indivíduos saudáveis. Para a análise molecular foi utilizado o método de PCR-*Multiplex* e a visualização em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídio. O grupo dos casos foi composto de 52,6% de homens e 47,4% de mulheres, com idade média de 61,3 anos. História familiar de câncer (69,7%) e tabagismo (48,7%) foram associados ao risco de câncer entre os casos. Não houve diferença significativa em relação ao etilismo. A amostra foi composta em sua maioria por indivíduos classificados fenotipicamente como brancos ou mulatos claros. Os principais tipos de câncer da amostra foram de próstata, mama, pele, útero e neoplasias hematológicas. Os genótipos *GSTT1* nulo e *GSTM1* nulo tiveram frequência de 22,4% e 63,2% entre os casos, mas essa diferença não foi significativa quando comparada aos controles. O genótipo combinado *GSTT1* [+] / *GSTM1* [-] esteve presente em 50% dos casos e apresentou associação significativa com o risco de câncer nessa amostra (OR = 1,66; IC95% = 1,31 – 5,27; p <0,005). Não houve diferença significativa entre as deleções apresentadas entre casos e controles quando os indivíduos foram estratificados pela classificação fenotípica. As frequências obtidas no estudo foram compatíveis com as observadas em outras populações brasileiras, com ou sem câncer. A elevada contribuição europeia na formação da população de Monte Santo também pode estar relacionada com a distribuição dos polimorfismos observada na amostra. Novos estudos são necessários para caracterizar de forma mais adequada a suscetibilidade desta população ao desenvolvimento de câncer.

Palavras-Chaves: 1. Glutationa Transferase; 2. Neoplasias; 3. Genética Médica.

## II. OBJETIVOS

### PRINCIPAL:

Determinar a associação de polimorfismos nos genes *GSTM1* e *GSTT1* com a ocorrência de casos de câncer no município de Monte Santo-Bahia.

### SECUNDÁRIOS:

1. Caracterização sociodemográfica de uma amostra de pacientes com câncer proveniente do município de Monte Santo – Bahia.
2. Verificar os tipos de câncer frequentes numa amostra do município de Monte Santo-Bahia.
3. Verificar a associação entre dados demográficos (histórico familiar, etilismo, tabagismo, ancestralidade referida e fenotípica) com a ocorrência de câncer em indivíduos de Monte Santo-Bahia.

### III. REVISÃO DE LITERATURA

#### III.1. Conceito e Epidemiologia

O câncer pode ser definido como um grupo de mais de 100 patologias que têm em comum o crescimento desordenado de células em tecidos e órgãos, podendo invadir e espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2012). É uma doença multifatorial, podendo ser determinada por diferentes fatores de risco: genéticos, ambientais, culturais e socioeconômicos. Tem crescido em todo o mundo, ocupando a segunda causa de morte na maioria dos países (Oliveira et al., 2015).

Considerado atualmente como um problema de saúde pública mundial, estima-se que em 2012 houve 14 milhões de casos novos de câncer em todo o mundo e 8 milhões de mortes por câncer. Dentre estes, mais de 60% dos casos novos e 70% da mortalidade ocorreram em países em desenvolvimento (INCA, 2016).

Para o ano de 2030, espera-se a carga global de 21,4 milhões de casos novos e 13,2 milhões de mortes por câncer. Tal tendência pode ser vista como resultado de mudanças no perfil demográfico, onde se observa um processo de envelhecimento populacional, redução da mortalidade infantil e da mortalidade por doenças infectocontagiosas, aliados a novos estilos de vida e exposição a fatores de risco (INCA, 2014; Alves et al., 2015). O envelhecimento populacional é um fator crucial para a ascensão da morbimortalidade das doenças crônicas não transmissíveis e juntamente com a transição epidemiológica acarreta crescimento excessivo nas demandas dos serviços de saúde (Santos et al., 2015).

O Brasil segue a tendência mundial, em processo de transição epidemiológica no perfil de morbimortalidade, com estimativas para o biênio 2015-2016 de 600 mil casos novos de câncer, incluindo pele não melanoma. Excetuando-se o câncer de pele não-melanoma, os cânceres mais incidentes na população brasileira serão, em homens: próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%); e nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) (INCA, 2016).

Na Bahia, as estimativas para o ano de 2016 são de 12.900 casos novos de câncer por 100 mil habitantes entre os homens e 12.530 casos novos por 100 mil habitantes entre as mulheres, sendo os

mais estimados (exceto pele não melanoma) para homens: próstata, estômago e traqueia, brônquio e pulmão; e para as mulheres: mama, colo do útero e colorretal (INCA,2016).

Em relação à assistência hospitalar ao câncer, na Bahia houve aumento de 29,3% no número de internações de pacientes com câncer entre 2008 e 2015 (Quadro I), de acordo com dados obtidos no Sistema de Informações Hospitalares do SUS (DATASUS, 2016). Nesse intervalo, os tipos de câncer mais frequentes nas internações foram: mama, próstata, tecidos moles, leucemia, cabeça e pescoço, colo de útero, estômago, pele, ginecológico (exceto útero) e colorretal. (DATASUS, 2016).

No município de Monte Santo, observa-se que houve aumento de 48,6 % no número de internações por câncer entre os anos de 2008 e 2015 (Quadro I). Os tipos de câncer mais frequentes no período foram: próstata, tecidos moles, mama, leucemia, osso e cartilagem, cabeça e pescoço, pele, traqueia, brônquios e pulmões, estômago e bexiga; onde três entre os dez tipos mais comuns no município diferem da lista da Bahia (DATASUS, 2016).

**QUADRO I.** Número de internações por câncer por local de procedência, no período de 2008 a 2015. Fonte: Sistema de Informações Hospitalares do SUS.

<b>Procedência</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>
Bahia	34538	35119	38042	40660	42456	42431	45971	44647
Monte Santo	72	110	107	96	117	98	160	107

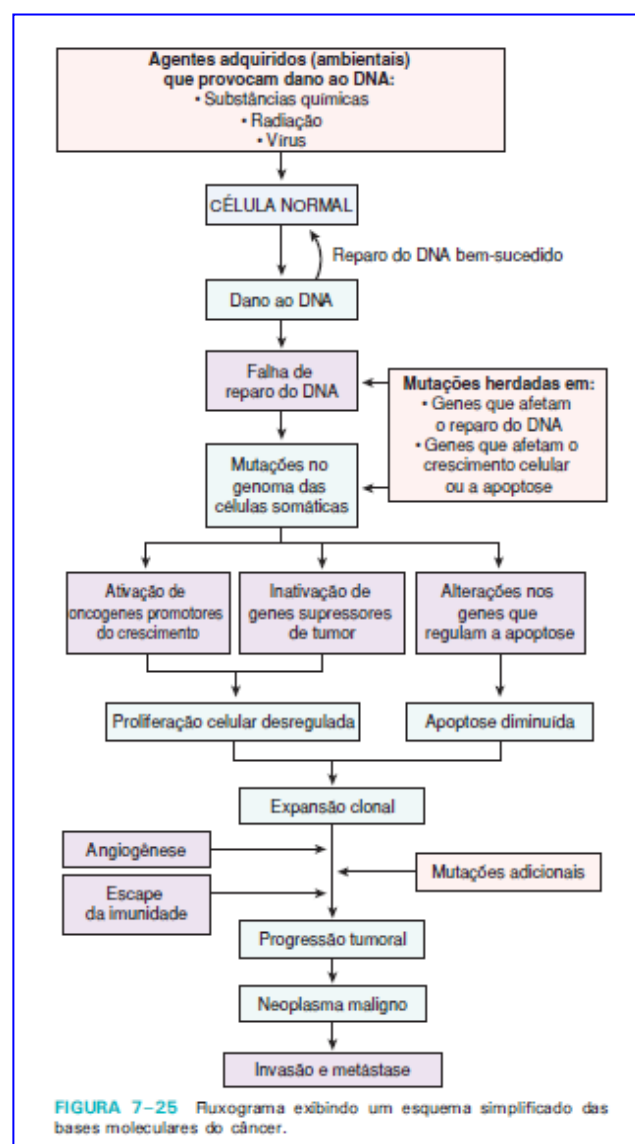
### **III.2. Biologia molecular do câncer**

Do ponto de vista biológico, o câncer é fundamentalmente condição de uma programação genética aberrante, onde ocorrem mudanças na sequência genômica que alteram a estrutura, função ou expressão de proteínas que controlam processos celulares essenciais (Wong et al., 2011). Assim, virtualmente todos os cânceres possuem anormalidades gênicas ou cromossômicas (Wunsch Filho et al., 2001).

Entre os principais genes envolvidos, estão aqueles relacionados ao controle da instabilidade genômica, reparo de DNA, regulação do ciclo celular, diferenciação, apoptose e processo de desintoxicação de xenobióticos (Wong et al., 2011) . A desregulação dessas funções críticas, em última análise, leva à transformação neoplásica, onde a célula cancerosa passa a sua progênie essas

informações. Assim, partir de uma célula precursora lesada ocorre a expansão clonal para a formação do tumor (Cotran et al., 2010; Nussbaum et al., 2008; Wong et al., 2011; Wunsch Filho et al., 2001).

O dano genético pode ser adquirido pela ação de agentes ambientais, como compostos químicos, radiações, infecções, envelhecimento ou herdado na linhagem germinativa. (Cotran et al., 2010). Durante o processo de carcinogênese, as células predispostas acumulam mutações em genes que estão envolvidos direta e indiretamente na regulação da proliferação celular, sobrevivência e migração (Djansugrova et al., 2013). Esse processo ocorre em múltiplos estágios (Figura I), tanto a nível genético quanto fenotípico, caracterizando as neoplasias por períodos longos de latência (Wunsch Filho et al., 2001).



**FIGURA I.** Representação esquemática das bases moleculares do câncer. Fonte: Cotran et al., 2010.



Em nível de estudo molecular do câncer, podem ser feitas análises de diferentes biomarcadores que podem refletir o papel de determinadas alterações genéticas na patogênese das neoplasias. Segundo Wunsch Filho (2001), estes marcadores podem ser classificados em biomarcadores de exposição (adutos no DNA, mutações cromossômicas), suscetibilidade (enzimas de metabolização) e de resposta (oncogenes e genes supressores de tumor). O espectro de mutações observado nestes marcadores é resultado da seleção natural e depende de condições geográficas, dieta e origem étnica. Em determinadas condições, polimorfismos genéticos podem predispor ao câncer ou atuar como um fator protetor (Djansugurova et al., 2013).

Dessa forma, para determinado nível de exposição a uma substância carcinogênica, por exemplo, somente uma parte dos indivíduos desenvolve câncer. Essa suscetibilidade individual pode ser determinada geneticamente e depende da capacidade individual de metabolização efetiva de compostos carcinogênicos (Wunsch Filho et al., 2001). Diversos sistemas genéticos de metabolismo enzimático de xenobióticos têm sido associados à patogênese de diferentes tipos de câncer, principalmente polimorfismos do citocromo P450, glutationa-S-transferase e N-acetil-transferase (Wunsch Filho et al., 2001).

### **III.3. Glutationa-S-transferases**

A detoxificação enzimática de xenobióticos ocorre em três fases: I, II e III. Na fase II, enzimas catalisam a conjugação dos xenobióticos com substratos endógenos, tornando os mesmos mais solúveis em água. A formação dos conjugados com a glutationa (GSH) é a principal reação observada durante a fase II e indica que esse mecanismo representa uma adaptação biológica importante para muitas espécies (Hayes et al., 2005; Huber et al., 2008).

As glutationa-S-transferases ou glutationa transferases (GST) correspondem a uma família de enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutationa a compostos que apresentam um carbono, nitrogênio ou átomo de enxofre eletrofílico (Hayes et al., 2005). Seus substratos eletrofílicos mais comuns são os haletos de alquila, epóxidos, compostos  $\alpha,\beta$ -insaturados (como quinonas, iminoquinonas, aldeídos, cetonas, lactonas e ésteres), haletos de arila e nitro aromáticos (Huber et al., 2008). Adicionalmente, as GST atuam como tiol transferases, peroxidases, isomerasas e também atuam em funções não catalíticas como a modulação de processos de sinalização (Di Pietro et al., 2010).

Nos mamíferos, as glutathione transferases são divididas em três famílias: GST citosólicas ou solúveis, GST mitocondriais/peroxissomais e GST microsossomais (Di Pietro et al., 2010; Huber et al., 2008). A família de GST citosólicas compõe-se de sete classes de enzimas (Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega e Zeta) responsáveis pela inativação de compostos tóxicos e cancerígenos e na metabolização de fármacos (Huber et al., 2008; Setiawan et al., 2000). Essas enzimas desempenham papel-chave na desintoxicação celular, protegendo macromoléculas do ataque de eletrólitos reativos como produtos do estresse oxidativo, poluentes e carcinógenos (Di Pietro et al., 2010; Suarez-Kurtz et al., 2007).

Os genes que codificam membros da família das glutathione-S-transferases (*GSTs*) são exemplos de genes de suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer, sendo os genes *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* os mais tradicionalmente estudados (Di Pietro et al., 2010). Um conjunto de variantes genéticas está envolvido no metabolismo de substâncias carcinogênicas. Como exemplo, polimorfismos presentes nos genes que codificam GST podem ser responsáveis por uma maior ou menor eficiência enzimática e é provável que seja o mecanismo explicativo da variabilidade interindividual de resposta a xenobióticos, bem como na suscetibilidade à exposição a agentes cancerígenos (Di Pietro et al., 2010; Hayes et al., 2005; Harris, 1987).

Diversos estudos tem avaliado a influência de polimorfismos em *GST* na suscetibilidade a diferentes tipos de câncer, como câncer de cabeça e pescoço, mama, fígado, próstata, pulmão, estômago, rins e tratos urinários. Estes estudos apresentaram resultados variáveis, em que se nota a influência de diferenças étnicas na distribuição dos polimorfismos e na determinação do risco individual (Di Pietro et al., 2010).

#### **III.4. *GSTM1* e *GSTT1***

Os membros da família de genes *GST* da classe Mu (*GSTM1*, localizado no cromossomo 1p13.1) e Theta (*GSTT1*, localizado no cromossomo 22q11.2) são os genes melhor caracterizados nos estudos de associação de suscetibilidade ao câncer, uma vez que possuem variantes de deleção nestes dois *loci* associados à falta de função nas suas enzimas correspondentes: os genótipos *GSTM1-nulo* e *GSTT1-nulo* (Oliveira, 2014). Indivíduos com deleções em homozigose dos genes *GSTM1* e *GSTT1* apresentam diminuição na capacidade de metabolizar compostos cancerígenos e, conseqüentemente, podem apresentar maior risco de desenvolvimento de câncer (Rebeck, 1997; Hayes et al., 2005; Di Pietro et al., 2010).

Deleções de *GSTMI* e *GSTTI* têm sido associadas a maior suscetibilidade a diversos tipos de câncer, principalmente pulmão, bexiga, pele, colorretal, câncer gástrico e de cabeça e pescoço (Hayes et al., 2005; Setiawan et al., 2000; Leme et al., 2010). O risco de desenvolvimento do câncer vai depender da suscetibilidade genética do indivíduo, aliado a fatores ambientais (Oliveira, 2014; Djansugurova et al., 2013). Além disso, a frequência de polimorfismos é determinada por diversos fatores que interferem na variação existente entre as populações, como seleção natural, deriva genética, estruturação populacional, localização geográfica, origem étnica, entre outros (Djansugurova et al., 2013).

A frequência de polimorfismos em *GST* varia entre os diferentes grupos étnicos, sendo a deleção homozigótica de *GSTMI* (genótipo *GSTMI nulo*) mais frequente em populações europeias e asiáticas que em populações africanas; enquanto que a deleção homozigótica de *GSTTI* (genótipo *GSTTI nulo*) é mais frequente em populações asiáticas e apresenta frequência semelhante entre populações europeias e africanas (Arruda et al., 1998; Oliveira, 2014; Suarez-Kurtz et al., 2007).

Um estudo realizado por Gattás e colaboradores (2004) avaliou a frequência de deleções em *GSTMI* e *GSTTI* numa amostra brasileira, demonstrando frequência maior de deleções de *GSTMI* em indivíduos classificados como brancos em relação a negros e mulatos. Na população baiana, um estudo recente avaliou a frequência de cinco polimorfismos de risco para o câncer (*GSTTI nulo*, *GSTMI nulo*, *XRCCI-399\*Gln*, *XRCCI-194\*Trp* e *CYP1A1\*2C*) e observou-se maior frequência desses polimorfismos, com exceção do *GSTTI-nulo*, em relação a outras populações brasileiras. Tais dados indicam que a população baiana pode ser mais vulnerável geneticamente ao desenvolvimento de câncer que em outras regiões do país (Silva, 2013).

### **III.5. Monte Santo**

Monte Santo é um município situado no interior do estado da Bahia, localizado a 352 km de Salvador, com área de 3.285 km<sup>2</sup> e população estimada para 2015 de cerca de 54.733 habitantes. A região é subdividida em mais de 150 povoados, com 87% da população residente na zona rural. É um município que historicamente apresenta-se como centro de peregrinação religiosa, além de ter sido palco da Guerra de Canudos (Machado, 2012; Machado et al., 2012; IBGE, 2015).

No município, estudos já realizados relatam frequência aumentada de algumas doenças genéticas, como mucopolissacaridose tipo VI, fenilcetonúria e surdez hereditária não sindrômica. Pesquisas desenvolvidas na região demonstraram elevada taxa de endogamia e endocruzamento e

baixa taxa de migração, fatores que foram relacionados ao aumento da frequência de doenças genéticas neste município (Machado et al., 2012; Machado, 2012; Manzoli et al., 2013; Costa-Motta et al., 2011).

### **III.6. Censo Genética no Sertão**

Desde 2006, uma equipe multidisciplinar realiza excursões no município de Monte Santo para avaliação da prevalência de doenças genéticas no projeto denominado “Genética no Sertão” (Machado, 2012). Em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde de Monte Santo, novos estudos estão sendo realizados no município com o projeto “*Censo Genética no Sertão: Epidemiologia clássica e molecular de doenças genéticas no município de Monte Santo-BA*”, visando caracterizar a distribuição de doenças genéticas através do censo na região. Esse mapeamento tem sido realizado por meio da realização de um censo em colaboração com os profissionais da atenção básica, que estão distribuídos em 16 equipes da Estratégia de Saúde da Família.

Uma das linhas de pesquisa desse projeto se dedica ao estudo das bases genéticas do câncer na região, com o subprojeto: “*Prevalência de polimorfismos nos genes GSTM1, GSTT1, XRCC1, XRCC3, TP53 e CYP1A1 e a associação com a ocorrência de casos de câncer no município de Monte Santo-BA*”, do qual esta monografia foi derivada. Este trabalho se justifica pela importância de se identificar a frequência de genes de suscetibilidade ao câncer nesta população, visto à relevância epidemiológica no município e à influência de condições genéticas importantes na formação dessa população.

Tais informações podem ser úteis para a caracterização de suscetibilidade deste grupo populacional, na perspectiva de sua aplicação em aspectos de prevenção, diagnóstico precoce e no delineamento de políticas públicas para o município.

## IV. METODOLOGIA

### a. Desenho de Estudo:

O desenho de estudo adotado foi estudo de caso-controle.

### b. Amostra:

A seleção inicial da amostra ocorreu a partir da identificação de pacientes provenientes do município de Monte Santo que realizaram tratamento fora de domicílio (TFD), no período de 2010 a 2014, em dois centros de referência para o tratamento de câncer no estado: Hospital Aristides Maltez e Centro Estadual de Oncologia (CICAN). Tais informações foram obtidas junto à Secretaria Municipal de Saúde de Monte Santo. Desse modo, foram identificados 335 prováveis pacientes, distribuídos em 17 equipes de saúde da família do município.

De novembro de 2014 a dezembro de 2015, realizou-se busca ativa de 112 pacientes, vinculados a 14 equipes de saúde do município. Desses, 76 foram incluídos no estudo, tendo como critérios de inclusão o diagnóstico histopatológico para qualquer tipo de câncer, independente do tratamento realizado, e que aceitaram participar da pesquisa. Os indivíduos selecionados responderam a uma entrevista estruturada realizada pelo investigador (Anexo I) e foram submetidos a coleta de sangue periférico.

Além disso, foram selecionados 76 indivíduos para a composição do grupo controle, sendo considerados aqueles que, até o momento da entrevista, não foram diagnosticados com câncer. Esses indivíduos controle foram selecionados através do sorteio de uma família adstrita por cada agente de saúde do município, de forma a selecionar uma amostra aleatória. Os indivíduos controle também responderam a um questionário e foram submetidos à coleta de sangue periférico.

### c. Análise de marcadores genéticos:

O DNA genômico das amostras de sangue periférico foi extraído a partir de 200  $\mu$ L do sangue total pelo Kit de Extração Mini Spin Plus (Biometrix, BioPur, Curitiba, Paraná, BR), de acordo com as instruções do fabricante.

As deleções dos genes *GSTT1* e *GSTM1* foram analisadas por PCR- *multiplex*. Nesta reação é possível a amplificação de um segmento de 215 pb para os indivíduos que possuem o genótipo *GSTM1* positivo, um segmento de 480 pb nos indivíduos que possuem o genótipo *GSTT1* positivo e um segmento de 228pb do éxon 1 da cadeia  $\beta$  do gene da hemoglobina (*Hb*), utilizado como controle interno da reação, excluindo a possibilidade de falsa interpretação dos resultados devido à ausência de amplificação. Os *primers* utilizados estão descritos no Quadro 1.

**QUADRO 1.** *Primers* utilizados para cada gene de suscetibilidade.

<b>Gene</b>	<b>Alelos</b>	<b>Primer</b>
<b><i>GSTT1</i></b>	GSTT1*0 (mutante)	F: 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3';
	GSTT1*1 (selvagem)	R: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3';
<b><i>GSTM1</i></b>	GSTM1*0 (mutante)	F: 5'-CTGCCCTACTTGATTGATGGG-3'
	GSTM1*1 (selvagem)	R: 5'-CTGGATTGTAGCAGATCATGC-3'
<b><i>Hb</i></b>	-	F: 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' R: 5'-CATGGTGCATCTGACTCCT-3'

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada nas seguintes condições:

- 1 ciclo com 95°C por 6 minutos, seguido por;
- 35 ciclos com 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e;
- 1 ciclo final de 72°C por 10 minutos.

As reações de PCR tinham volume total de 25 $\mu$ l, compostos por:

- 9,8 uL de H<sub>2</sub>O
- 3,0 uL de dNTP
- 2,5uL de Buffer com BSA
- 2,0 uL de cada primer
- 0,2 uL de Taq DNA polimerase
- 3,0 uL de DNA

O produto da amplificação foi visualizado em eletroforese em gel de agarose a 2,5% e corado com brometo de etídio.

**d. Análise Estatística:**

Estatística descritiva foi utilizada para os dados demográficos. Para o cálculo de *Odds ratio*, intervalo de confiança e valor de  $p$  utilizou-se o programa WinPepi versão 11.26.

**e. Considerações Éticas:**

Este projeto faz parte do estudo “*Censo "Genética no Sertão": Epidemiologia clássica e molecular de doenças genéticas no município de Monte Santo-BA*”, com aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos-UFBA, sob Parecer nº 379.010 (Anexos II e III).

## V. RESULTADOS

Participaram do estudo um total de 152 indivíduos, sendo 76 casos com câncer e 76 indivíduos como controle. Os casos e controles foram caracterizados quanto a características sociodemográficas, conforme a Tabela 1. Observou-se que a idade média foi de 61,3 anos entre os casos. A amostra de casos foi composta de 36 (47,4%) indivíduos do sexo feminino e de 40 (52,6%) indivíduos do sexo masculino, com resultados semelhantes entre os dois grupos. No grupo controle, a média de idade foi de 41,3 anos, com 31 (40,8%) indivíduos do sexo masculino e 45 (59,2%) do sexo feminino. A diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa em relação a idade e sexo.

A história familiar de câncer entre os casos foi positiva em 53 (69,7%) indivíduos e negativa em 20 (26,3%) indivíduos. Para 3 indivíduos (3,9%) a informação não estava disponível. No grupo controle, a história familiar foi positiva em 32 (42,1%) indivíduos e negativa em 35 (46%) indivíduos. A informação não foi disponível para 9 (11,8%) indivíduos do grupo controle. A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa ( $p = 0.0018$ ).

Com relação aos hábitos de vida, o tabagismo foi relatado por 48,7% dos casos e 13,2% dos controles. O mesmo foi negado entre 46% dos casos e 77,6% dos controles. Tal diferença foi estatisticamente significativa ( $p = 0.0358$ ). Em ambos os grupos, a informação não foi disponível para 5,3% e 9,2% entre casos e controles, respectivamente. O etilismo foi relatado em 34,2% dos casos e 22,4% dos controles, sendo negado em 59,2% dos casos e 68,4% dos controles. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação a essa variável.

Os participantes da pesquisa foram avaliados também quanto à ancestralidade com base em dois sistemas de classificação: autodenominação e ancestralidade fenotípica. Com base na autodenominação, os indivíduos se classificaram de acordo com categorias do IBGE. Para este sistema, os casos se autotransclassificaram em: 51,3% pardos, 39,5% brancos e 9,2% negros ( $p = 0.16$ ). Nenhum caso se autodenominou como indígena. Os controles se autotransclassificaram em 42,1% pardos, 21% brancos, 14,5% negros, 7,9% indígenas e 9,2% não se classificaram.

A classificação racial fenotípica foi realizada pelos investigadores e se baseou na observação das seguintes características: cor da pele, textura do cabelo, formato do nariz e dos lábios. Os indivíduos foram então classificados nas seguintes categorias: branco, mulato claro, mulato médio,



mulato escuro, negro ou outro. Devido a diferenças discretas entre os grupos, os indivíduos foram agrupados em três grupos maiores: branco/mulato claro, mulato médio e mulato escuro/negro.

De acordo com a classificação fenotípica ( $p = 0.386$ ), os casos foram compostos por 65,8% de indivíduos brancos ou mulatos claros, 26,3% de mulatos médios, 7,9% de mulatos escuros ou negros. Entre os casos, 51,3% dos indivíduos foram classificados como brancos ou mulatos claros, 23,7% como mulatos médios, 13,2% como negros ou mulatos escuros e 11,8% dos indivíduos não foram classificados.

Os tipos de câncer observados na amostra estão descritos na Tabela 2, sem divisão por sexo. Os principais tipos de câncer encontrados foram: próstata (35,5%), mama (19,7%), pele (10,5%), útero (7,9%) e neoplasias hematológicas (6,6%). Ao todo, foram observados 13 tipos diferentes de câncer.

A partir da coleta de sangue dos pacientes, realizou-se extração de DNA genômico, com posterior realização de PCR- *multiplex* para análise dos marcadores genéticos. O resultado da amplificação foi visualizado em gel de agarose, conforme o padrão demonstrado na Figura 1.

Os dados obtidos através da genotipagem estão exibidos na Tabela 3. Observou-se que entre os casos, o gene *GSTT1* foi presente em 77,6% dos pacientes e deletado em 22,4% dos pacientes (*GSTT1 nulo*). Entre os controles, o gene *GSTT1* esteve presente em 63,2% dos indivíduos e deletado em 36,8% dos indivíduos. Não houve diferença estatisticamente significativa da deleção de *GSTT1* entre casos e controles. Com relação ao gene *GSTM1*, o mesmo foi presente em 36,8% dos casos e 47,4% dos controles e deletado (*GSTM1 nulo*) em 63,2% dos casos e 52,6% dos controles, não havendo diferença estatisticamente significativa.

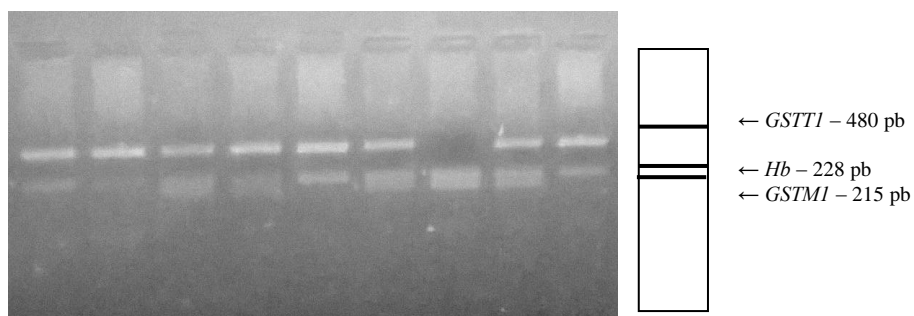
Na Tabela 4, os dados de genotipagem foram agrupados em quatro subgrupos: *GSTT1*[+] / *GSTM1*[+] (presença dos dois genes); *GSTT1* [+] / *GSTM1* [-] (presença do gene *GSTT1* e deleção do gene *GSTM1*); *GSTT1* [-] / *GSTM1* [+] (deleção do gene *GSTT1* e presença do gene *GSTM1*); e *GSTT1* [-] / *GSTM1* [-] (deleção de ambos os genes). O genótipo *GSTT1*[+] / *GSTM1*[+] foi tomado como referência e observou-se associação estatisticamente significativa com o genótipo *GSTT1* [+] / *GSTM1* [-].

**TABELA 1.** Dados sociodemográficos da amostra avaliada.

<b>Variáveis</b>	<b>Casos (n= 76)</b>	<b>Controles (n=76)</b>	<b>p</b>
	<b>Média</b>		
<b>Idade</b>	61,3 anos	41,3 anos	0.069
	<b>n (%)</b>		
<b>Sexo</b>			
Masculino	40 (52,6%)	31 (40,8%)	0.193
Feminino	36 (47,4%)	45 (59,2%)	
<b>Histórico Familiar</b>			
Sim	53 (69,7%)	32 (42,1%)	0.0018
Não	20 (26,3%)	35 (46,0%)	
Sem informação	3 (3,9%)	9 (11,8%)	
<b>Tabagismo</b>			
Sim	37 (48,7%)	10 (13,2%)	0.0358
Não	35 (46%)	59 (77,6%)	
Sem informação	4 (5,3%)	7 (9,2%)	
<b>Etilismo</b>			
Sim	26 (34,2%)	17 (22,4%)	0.2683
Não	45 (59,2%)	52 (68,4%)	
Sem informação	5 (6,6%)	7 (9,2%)	
<b>Raça/Cor (autodenominação)</b>			
Branco	30 (39,5%)	16 (21,0%)	0.1600
Pardo	39 (51,3%)	32 (42,1%)	
Negro	7 (9,2%)	11 (14,5%)	
Indígena	0 (0%)	6 (7,9%)	
Sem informação	0 (0%)	7 (9,2%)	
<b>Caracterização fenotípica</b>			
Branco / Mulato Claro	50 (65,8%)	39 (51,3%)	0.3869
Mulato Médio	20 (26,3%)	18 (23,7%)	
Mulato Escuro / Negro	6 (7,9%)	10 (13,2%)	
Sem informação	0 (0%)	9 (11,8%)	

**TABELA 2.** Tipos de câncer encontrados nos casos que compõem a amostra.

Tipos de câncer	Casos (n = 76)
	n (%)
Próstata	27 (35,5%)
Mama	15 (19,7%)
Pele	8 (10,5%)
Útero	6 (7,9%)
Hematológico	5 (6,6%)
Cabeça e pescoço	4 (5,3%)
Colorretal	3 (3,9%)
Sistema nervoso central	2 (2,6%)
Renal	2 (2,6%)
Gástrico	1 (1,3%)
Bexiga	1 (1,3%)
Teratoma	1 (1,3%)
Ovário	1 (1,3%)

**FIGURA 1.** Gel de agarose com resultado de genotipagem das amostras.**TABELA 3.** Frequência gênica de *GSTT1* e *GSTM1* na amostra estudada.

Gene	Casos (n= 76)	Controles (n = 76)	OR (95%CI)	p
	n (%)	n (%)		
<b><i>GSTT1</i></b>				
Positivo	59 (77,6%)	48 (63,2%)	0,49 (0,24 – 1,01)	0,054
Negativo	17 (22,4%)	28 (36,8%)		
<b><i>GSTM1</i></b>				
Positivo	28 (36,8%)	36 (47,4%)	1,54 (0,80 - 2,96)	0,195
Negativo	48 (63,2%)	40 (52,6%)		

**TABELA 4.** Frequência de genótipos combinados para *GSTTI* e *GSTMI* na amostra.

Genótipo	Casos (n= 76)	Controles (n = 76)	OR (95%CI)	p
	n (%)	n (%)		
<i>GSTTI</i> [+]/ <i>GSTMI</i> [+]	21 (27,6%)	23 (30,3%)	Referência	
<i>GSTTI</i> [+]/ <i>GSTMI</i> [-]	38 (50,0%)	25 (32,9%)	1,66 (1,31 - 5,77)	<0,005
<i>GSTTI</i> [-]/ <i>GSTMI</i> [+]	6 (7,9%)	14 (18,4%)	0,47 (0,14 - 1,45)	0,229
<i>GSTTI</i> [-]/ <i>GSTMI</i> [-]	11 (14,5%)	14 (18,4%)	0,86 (0,28 - 2,57)	0,711

Nas Tabelas 5 e 6, as informações de genotipagem para o gene *GSTTI* e *GSTMI* foram comparadas às estimativas de ancestralidade fenotípica, respectivamente. O genótipo *GSTTI nulo* foi observado entre os casos em 22% dos indivíduos classificados como brancos/ mulatos claros, 30% dos mulatos médios e não foi observado entre os negros. Em relação ao controle, a deleção foi observada em 35,9% dos brancos/ mulatos claros, 33,3% dos mulatos médios e 40% dos mulatos escuros / negros, além da frequência observada entre os indivíduos não classificados (Tabela 5).

**TABELA 5.** Genotipagem para o *GSTTI* de acordo com a ancestralidade fenotípica.

Caracterização fenotípica	<i>GSTTI</i>		OR (95%CI)	p
	Casos (n= 76)	Controles (n = 76)		
	<i>Positivo</i>	<i>Positivo</i>		
	<i>Negativo</i>	<i>Negativo</i>		
	n (% por categoria)			
Branco/ Mulato Claro	39 (78%)	25 (64,1%)	0,50 (0,19 – 1,30)	0,129
	11 (22%)	14 (35,9%)		
Mulato Médio	14 (70%)	12 (66,7%)	0,86 (0,21 - 3,55)	0,867
	6 (30%)	6 (33,3%)		
Mulato Escuro/ Negro	6 (100%)	6 (60%)	0,00 (0,0 – 1,64)	0,176
	0 (0%)	4 (40%)		
Sem informação	0 (0%)	5 (55,5%)		
	0 (0%)	4 (44,5%)		

O genótipo *GSTMI nulo* foi observado entre os casos em 62% dos indivíduos classificados como brancos/ mulatos claros, 80% dos mulatos médios e 16,7% entre os negros. Em relação ao controle, a deleção foi observada em 53,9% dos brancos/ mulatos claros, 33,3% dos mulatos médios e 40% dos mulatos escuros / negros, além da frequência observada entre os indivíduos não classificados (Tabela 6).

TABELA 6. Genotipagem para o *GSTMI* de acordo com a ancestralidade fenotípica.

Caracterização fenotípica	<i>GSTMI</i>		OR (95%CI)	p
	Casos (n= 76) <i>Positivo</i> <i>Negativo</i>	Controles (n = 76) <i>Positivo</i> <i>Negativo</i>		
	n (% por categoria)			
Branco/ Mulato Claro	19 (38%)	18 (46,1%)	1,40 (0,59 – 3,30)	0,517
	31 (62%)	21 (53,9%)		
Mulato Médio	4 (20%)	9 (50%)	4,00 (0,93 – 18,20)	0,065
	16 (80%)	9 (50%)		
Mulato Escuro/ Negro	5 (83,3%)	4 (40%)	0,13 (0,00 – 1,62)	0,090
	1 (16,7%)	6 (60%)		
Sem informação	0 (0%)	5 (55,6%)		
	0 (0%)	4 (44,4%)		

## VI. DISCUSSÃO

Deleções de *GSTT1* e *GSTMI* têm sido associadas com suscetibilidade a diferentes tipos de câncer. Essas deleções são polimórficas e apresentam frequências que variam em função da população estudada (Arruda et al., 1998; Oliveira, 2014; Suarez-Kurtz et al., 2007). Em função da importância epidemiológica do câncer em Monte Santo, esse estudo avaliou a frequência dessas deleções e sua associação com a ocorrência de câncer no município, além de caracterização sociodemográfica da amostra.

A amostra de pacientes avaliada neste estudo foi composta de uma proporção semelhante de homens e mulheres, havendo uma ligeira diferença entre os controles. Entretanto, não houve diferença significativa por sexo entre os casos e controles. Os dados na literatura com relação ao sexo são divergentes e dependem do tipo de câncer e população avaliada, mas considera-se o sexo masculino como mais predisposto ao câncer (Dorak et al., 2012). No Brasil, as estimativas do INCA para o ano de 2016 são de cerca 295 mil casos novos de câncer por 100 mil habitantes no sexo masculino e de 300 mil casos novos por 100 mil habitantes no sexo feminino (INCA, 2016). Em estudo realizado por Oliveira (2013), avaliou-se dados da Pesquisa Nacional de Saúde do IBGE, onde apesar do câncer ter sido relatado mais em mulheres não houve diferença entre os sexos.

No que diz respeito à idade, a média encontrada entre os casos (61,3 anos) foi maior que entre os controles (41,3 anos), apesar de não haver diferença estatística entre os grupos. A informação obtida para a idade está de acordo com o relatado na literatura. Conforme relatado por Kumar (2013), a frequência do câncer aumenta com a idade, associada ao acúmulo de mutações somáticas, ocorrendo um pico de mortalidade entre os 55 e 75 anos de idade.

Nessa amostra, destaca-se a proporção elevada de histórico familiar positivo de câncer (69,7%) entre os casos, comparados ao controle. Essa diferença foi estatisticamente significativa ( $p = 0.0018$ ). Apesar da maioria dos casos de câncer ocorrer de forma esporádica, a concentração familiar tem sido descrita como fator de risco para o desenvolvimento de câncer (Wunsch Filho et al., 2001).

A exposição a fatores de risco foi avaliada a partir de hábitos de consumo de tabaco (tabagismo) e de bebidas alcoólicas (etilismo). Tais informações são importantes na medida em que estes fatores ambientais são conhecidos alvos das enzimas traduzidas pelos genes estudados e

atuam como fatores de risco para o desenvolvimento do câncer (Suarez-Kurtz et al., 2007; Di Pietro et al., 2010). O tabagismo esteve presente em 48,7% dos casos e em 13,2% dos controles ( $p = 0.0358$ ); e o etilismo esteve presente em 34,2% dos casos e em 22,4% dos controles ( $p = 0.2683$ ). Neste estudo, observou-se associação do câncer com o uso do tabaco.

Em um estudo brasileiro que avaliou a frequência de polimorfismos *GST* em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, foi encontrada associação positiva entre os dois fatores de risco, uma vez que são considerados fatores de risco mais potentes para este tipo de câncer (Leme et al., 2010). Apesar disso, considera-se complicada a avaliação isolada da participação destes fatores na carcinogênese, considerando que o fumante tende a consumir álcool e que existem evidências epidemiológicas indicando que os dois fatores podem atuar sinergicamente (Biselli et al., 2006).

Quando se avalia a classificação racial dos indivíduos da amostra, observou-se que em ambos os sistemas de classificação foi possível fazer diferenciação entre as categorias com relação à associação com o câncer: maior proporção de pardos (autodenominação) e brancos / mulatos claros (classificação fenotípica). No entanto, houve discordância na amostra entre as categorias de autodenominação e classificação fenotípica. Enquanto que a maioria dos indivíduos se classificou como pardos (51,3% dos casos e 42,1% dos controles), na classificação fenotípica prevaleceu a categoria de brancos e mulatos claros (65,8% dos casos e 51,3% dos controles). Essas diferenças podem ser explicadas pela dificuldade de se classificar a raça/cor em populações miscigenadas como a brasileira, além da percepção subjetiva do quesito raça/cor entre os indivíduos. Ainda assim, a classificação fenotípica, que é baseada em características morfológicas, também é subjetiva, varia em função do pesquisador e pode não representar de forma eficaz a contribuição das populações parentais (europeia, africana e asiática/ameríndia) na formação de populações miscigenadas (Machado, 2012; Leite et al., 2012; Pena et al., 2011; Lins et al., 2011; Magalhães da Silva et al., 2015).

Uma avaliação mais fidedigna da raça/cor dessa população é possível por meio da estimativa de ancestralidade genética utilizando marcadores informativos de ancestralidade (Machado, 2012; Oliveira, 2014). Um estudo anterior de ancestralidade genética na cidade de Monte Santo mostrou maior contribuição europeia na formação de sua população, estimando-se proporção de ancestralidade africana de 16,4%, europeia de 63,5% e ameríndia de 20,1% em 194 indivíduos residentes no município (Machado, 2012). Esses dados estão mais compatíveis com as proporções observadas no estudo através da classificação fenotípica, ainda que a presente amostra não tenha sido avaliada quanto a marcadores genéticos de ancestralidade até o momento.

Os tipos de câncer mais representativos na amostra foram câncer de próstata, mama, pele, útero e neoplasias hematológicas. As frequências obtidas na amostra se assemelharam com os tipos mais incidentes na população brasileira, exceto pela maior importância nesta amostra das neoplasias hematológicas (INCA, 2016). Com relação aos tipos mais frequentes na Bahia e em Monte Santo (DATASUS, 2016), não houve representação na amostra de câncer de tecidos moles, osso ou cartilagem e traqueia, brônquios e pulmões, apesar da sua importância epidemiológica no município. Não foi possível avaliar associação entre as deleções apresentadas e os tipos de câncer encontrados na amostra, possivelmente devido ao número reduzido de pacientes estratificados por tipo de neoplasia.

A deleção do gene *GSTT1* (*GSTT1 nulo*) foi observada em 22,4% dos casos e em 36,8% dos controles (OR = 0,9; IC95% = 0,24 – 1,01; p = 0,054), enquanto que a deleção do gene *GSTM1* (*GSTM1 nulo*) foi observada em 63,2% dos casos e 52,6% dos controles (OR = 1,54; IC95% = 0,8 – 2,96; p = 0,195). Observou-se que o genótipo *GSTT1 nulo* esteve mais representado entre os controles e que o genótipo *GSTM1 nulo* esteve mais representado entre os casos. Apesar disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre as deleções com a suscetibilidade ao câncer quando avaliados individualmente. Notou-se também que nesta amostra as deleções de *GSTM1* foram mais frequentes que as deleções em *GSTT1*, tanto entre os casos como nos indivíduos do grupo controle, o que pode estar relacionado à composição étnica desta população.

Quando avaliadas em conjunto, as deleções permitiram formar quatro genótipos combinados. Entre os casos, o genótipo combinado mais frequente foi o *GSTT1* [+] / *GSTM1* [-] (presença do gene *GSTT1* e deleção do gene *GSTM1*), com frequência de 50% em comparação a 32,9% nos controles. Nessa amostra, a presença desse genótipo foi associada com o risco de câncer (OR = 1,66; IC95% = 1,31 – 5,27; p <0,005).

Na literatura, os resultados em relação a esses polimorfismos diferem quanto à sua associação com o câncer, tanto em relação aos genótipos individuais quanto combinados. A maior parte dos estudos com polimorfismos *GST* avalia a sua relação com o câncer de cabeça e pescoço, uma vez que as enzimas *GST* são importantes na desativação de carcinógenos presentes no tabaco. Em uma revisão, relatou-se associação positiva entre as deleções de *GSTM1* e *GSTT1* para o câncer de pulmão, câncer de cabeça e pescoço e câncer de mama. Porém, alguns estudos relataram resultados conflitantes (Di Pietro et al., 2010). Em geral, essas variações estão relacionadas às populações estudadas, ao tipo de câncer avaliado e ao tamanho da amostra e seu poder estatístico.



Num estudo realizado no México (Jaramillo-Rangel et al., 2015), a deleção de *GSTM1* foi associada a risco aumentado de câncer de mama (OR = 2,19; IC 95% = 1,50-3,21; P = 0,001). Uma revisão sistemática (Yoon et al., 2014) de 7689 casos de câncer gástrico encontrou associação geral de risco com a deleção de *GSTT1* (OR = 1,17; IC 95 % = 1,06 – 1,31; p = 0.003), também observada entre os caucasianos. Numa população indiana (Sharma et al., 2015) o genótipo *GSTM1 nulo* foi associado a maior risco de câncer de pulmão (OR = 1,65; IC 95%= 1,16 – 2.3; p = 0.005) enquanto que as deleções combinadas foram associadas ao subtipo de adenocarcinoma. Hezova et al (2012) não encontraram associação entre as deleções e o câncer colorretal em uma amostra da Europa Central, enquanto que as mesmas foram associadas a esse tipo de câncer numa população chinesa (Cong et al., 2014).

Estudo empreendido por Leme e colaboradores (2010) em uma amostra brasileira mostrou associação entre o genótipo *GSTM1 nulo* e o câncer de cabeça e pescoço (OR = 2,25; IC95% = 1,05-4,84; p = 0,0368), além de associar o etilismo e o tabagismo como fatores preditores. Também associou o genótipo *GSTT1 [+]/GSTM1 [-]* com maior risco de câncer (OR = 7,64; IC 95% = 1,72-34,04; p = 0,0076), de modo semelhante ao observado neste estudo.

Entretanto, outros estudos em populações brasileiras não conseguiram encontrar associação entre as deleções e determinados tipos de câncer. Biselli e colaboradores (2006) avaliando 120 indivíduos não encontraram associação entre os genótipos *GSTT1 nulo* e *GSTM1 nulo* e o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Em um estudo realizado por Goloni-Bertollo e colaboradores (2006) também não foi observada associação entre a nulidade dos genótipos de *GSTT1* e *GSTM1* e o câncer de cabeça e pescoço. Sá et al (2014) avaliaram 196 pacientes com câncer de próstata e não encontrou associação significativa entre as deleções. Avaliando a associação das deleções com leucemia aguda, Rohr et al (2004) encontraram frequência significativa aumentada de *GSTT1 nulo* enquanto que não encontraram associação com o genótipo *GSTM1 nulo*.

Na Bahia, Oliveira (2014) avaliou 189 portadores de câncer de próstata e encontrou frequências das deleções de *GSTT1* e *GSTM1* em 18,3% e 58,8%, respectivamente. Foi observada associação positiva do genótipo *GSTM1 nulo* com o risco para o câncer de próstata, mas que não esteve relacionado a nenhum grupo estratificado por ancestralidade, nem com aumento da agressividade do tumor. A amostra também foi avaliada quanto à ancestralidade

genômica e apresentou estimativa de 47% de contribuição europeia. As proporções observadas para as deleções no estudo de Oliveira foram semelhantes às observadas na amostra da população de Monte Santo.

No presente estudo, a frequência de polimorfismos em *GST* também foi estratificada de acordo com as categorias de ancestralidade fenotípica. O genótipo *GSTT1 nulo* foi proporcionalmente menos frequente que o genótipo positivo entre os indivíduos classificados como brancos e mulatos claros tanto no grupo dos casos como nos controles. Não houve diferença estatística entre os dois grupos étnicos. Entre os mulatos médios, a deleção também foi proporcionalmente menor em casos e controles. A proporção do genótipo *GSTMI nulo* em relação ao genótipo positivo foi maior entre os indivíduos brancos e mulatos claros (62% e 53,9% em casos e controles) e chegando a 80% entre os indivíduos mulatos médios no grupo dos casos e 50% dos controles. Também não houve associação estatisticamente significativa.

As diferentes proporções observadas entre os grupos étnicos sugerem que a frequência das deleções pode variar a partir da estratificação da população, apesar de que o tamanho da amostra e o método de classificação racial tenham sido insuficientes para essa caracterização de forma estatisticamente significativa.

Diversos estudos têm relatado a frequência dessas deleções em diferentes populações geográficas. Uma revisão de literatura observou que nestes estudos as frequências do genótipo *GSTMI nulo* variam entre 34 a 58,3% em populações europeias, 47,6 a 56,2% em asiáticos, 44 a 56,3% em árabes e 17 a 46,7% entre afrodescendentes. Com relação ao genótipo *GSTT1 nulo*, relatam-se frequências de 12,9 a 27,6% em populações europeias, 17,6 a 64,4% em asiáticos, 14,7 a 29,5% em árabes e 17 a 44% em afrodescendentes. Quando se trata especificamente de populações ameríndias sul-americanas, as deleções em *GSTMI* e *GSTT1* variam de 0 a 43% e 0 a 38,2%, respectivamente (Di Pietro et al., 2010). Dessa maneira, é relatado que deleção de *GSTT1* é mais frequente em populações asiáticas e semelhante entre populações europeias e africanas; e a deleção de *GSTMI* é mais frequente em populações europeias e asiáticas do que nos afrodescendentes (Oliveira, 2014; Suarez-Kurtz et al., 2007).

Em populações miscigenadas como a brasileira, as frequências são variadas em função da região geográfica e processo de formação populacional de cada localidade. Gattás et al (2004) avaliaram 594 indivíduos de São Paulo e Bahia e encontrou frequência significativamente maior de deleções do gene *GSTMI* nos indivíduos classificados como brancos (55,4%) que em mulatos

(41,4%) e negros (32,8%). A deleção do gene *GSTT1* esteve presente em 23,1% da amostra, não havendo diferença entre os grupos.

O estudo de Arruda (1998) relatou frequências maiores do genótipo *GSTMI nulo* entre caucasianos (55%) que entre negros (33%) e ameríndios (20%); e uma proporção homogênea do genótipo *GSTT1 nulo* entre caucasianos e negros e baixa em ameríndios. Resultados semelhantes são observados em outros estudos com populações brasileiras (Hatagima et al., 2004; Gaspar et al., 2002; Hiragi et al., 2007; Magno et al., 2009). Na população baiana, um estudo avaliou 320 indivíduos saudáveis quanto a fatores de suscetibilidade ao câncer e relatou frequências de 44% e 23% das deleções em *GSTMI* e *GSTT1*, sendo o *GSTMI nulo* mais frequente nos indivíduos classificados fenotipicamente como brancos (Silva, 2013).

Este foi o primeiro estudo que avaliou a distribuição destes polimorfismos na população de Monte Santo, associando o genótipo *GSTT1* [+] / *GSTMI* [-] com o risco de câncer no município. As frequências encontradas para os polimorfismos estudados foram semelhantes às descritas em outras populações brasileiras, com ou sem associação ao câncer. Visto que a população de Monte Santo possui elevada contribuição europeia na sua formação, os dados obtidos estão de acordo com o esperado para grupos com ascendência europeia.

Novos estudos são necessários com avaliação de ancestralidade genômica, análise de outros marcadores para câncer e ampliação da amostra, na tentativa de melhor caracterizar a suscetibilidade desse grupo populacional em relação aos marcadores avaliados, bem como elucidar outros possíveis mecanismos que podem estar envolvidos nesse processo biológico.

## VII. CONCLUSÕES

1. Houve associação significativa do câncer com o histórico familiar e tabagismo na amostra.
2. Os tipos de câncer mais frequentes na amostra foram próstata, mama, pele, útero e hematológico.
3. As deleções individuais de *GSTT1* e *GSTMI* não foram associadas ao câncer na amostra avaliada. Porém, houve associação significativa do câncer com o genótipo combinado *GSTT1* [ + ] / *GSTMI* [ - ].
4. Não houve associação significativa entre as categorias raciais e as deleções em *GSTMI* e *GSTT1* na amostra. Entretanto, a população de Monte Santo possui elevada contribuição europeia e os dados são compatíveis com o observado na literatura para esse grupo populacional.
5. Novos estudos são necessários para caracterizar adequadamente a suscetibilidade ao câncer desta população.

## VIII. SUMMARY

**ASSOCIATION BETWEEN SUSCEPTIBILITY GENES (*GSTM1* AND *GSTT1*) AND CANCER IN MONTE SANTO-BA POPULATION.** Cancer is a group of genetic disorders that have in common the uncontrolled growth of cells in a tissue or organ, and may spread to other body areas. It is the result of a series of abnormalities in genes that are involved in tumor biology. The city of Monte Santo has a high rate of consanguinity and increased frequency of genetic disorders, which justifies the need to study the molecular basis of diseases such as cancer, which has increased its epidemiological importance in the region. The aim of this study was to investigate the association between deletions in *GSTM1* and *GSTT1* genes and cancer in a sample of the population of Monte Santo - Bahia. This study was approved by the Ethics Committee in Research and all patients signed an informed consent form prior to the collection of biological material. We selected 76 patients with different types of cancer and 76 healthy subjects. Molecular analysis was performed using PCR-multiplex and visualization on agarose gel 2.5% stained with ethidium bromide. The group of cases was composed of 52.6% men and 47.4% women, mean age of 61.3 years. Cancer family history (69.7%) and smoking (48.7%) were associated with risk of cancer among cases. There was no significant difference in relation to alcohol consumption. The sample consisted mostly of individuals classified phenotypically as white or light mulattoes. The major types of cancer are prostate, breast, skin, uterus and hematologic malignancies. The genotypes *GSTT1 null* and *GSTM1 null* showed frequency of 22.4% and 63.2% respectively between cases, but there was no significant difference compared to controls. The combined genotype *GSTT1 [+] / GSTM1 [-]* was present in 50% of cases and was significantly associated with the risk of cancer in this sample (OR = 1.66, 95% CI 1.31 to 5.27;  $p < 0.005$ ). There was no significant difference between cases and controls in relation to the studied deletions, when subjects were stratified by phenotypic classification. The frequencies obtained in this study were consistent with those observed in other Brazilian populations, with or without cancer. The high European contribution to the formation of the population of Monte Santo may be related to the frequency of polymorphisms observed in the sample. Further studies are needed to characterize more adequately the susceptibility of this population to the development of cancer.

Key Words: 1. Glutathione transferase; 2. Neoplasms; 3. Medical Genetics.

## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alves C, Morais Neto O. Trends in premature mortality due to chronic non-communicable diseases in Brazilian federal units. *Ciênc saúde coletiva*. 2015;20(3):641-654.
2. Arruda V, Grignolli C, Gonçaves M, Soares M, Menezes R, Saad S et al. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis?. *Clinical Genetics*. 2008;54(3):210-214.
3. Biselli J, Leal R, Ruiz M, Goloni-Bertollo E, Maníglia J, Rossit A et al. Polimorfismos GSTT1 e GSTM1 em indivíduos tabagistas com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2006;72(5):654-658.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2016.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.
6. Cong N, Liu L, Xie Y, Shao W, Song J. Association between Glutathione S-Transferase T1, M1, and P1 Genotypes and the Risk of Colorectal Cancer. *Journal of Korean Medical Science*. 2014;29(11):1488.
7. Costa-Motta F, Acosta A, Abé-Sandes K, Bender F, Schwartz I, Giugliani R et al. Genetic studies in a cluster of Mucopolysaccharidosis Type VI patients in Northeast Brazil. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2011;104(4):603-607.
8. DATASUS. Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/>. Acesso em 15 de agosto de 2016.
9. Di Pietro G, Magno L, Rios-Santos F. Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2010;6(2):153-170.
10. Djansugurova L, Perfilyeva A, Zhunusova G, Djantaeva K, Iksan O, Khussainova E. The Determination of Genetic Markers of Age-Related Cancer Pathologies in Populations from Kazakhstan. *Front Genet*. 2013;4.
11. Dorak M, Karpuzoglu E. Gender Differences in Cancer Susceptibility: An Inadequately Addressed Issue. *Front Gene*. 2012;3.

12. Gaspar P, Hutz M, Salzano F, Hill K, Hurtado A, Petzl-Erler M et al. Polymorphisms of CYP1a1, CYP2e1, GSTM1, GSTT1, and TP53 genes in Amerindians. *Am J Phys Anthropol.* 2002;119(3):249-256.
13. Goloni-Bertollo E, Biselli J, Corrêa L, Maníglia J, Rossit A, Ruiz M et al. Avaliação da influência da nulidade dos genótipos GSTT1 e GSTM1 na carcinogênese em cabeça e pescoço. *Revista da Associação Médica Brasileira.* 2006;52(5):365-368.
14. Hatagima A, Marques C, Krieger H, Feitosa M. Glutathione S-Transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) Polymorphisms in a Brazilian Mixed Population. *Human Biology.* 2004;76(6):937-942.
15. Hayes J, Flanagan J, Jowsey I. Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45(1):51-88.
16. Hezova R, Bienertova-Vasku J, Sachlova M, Brezkova V, Vasku A, Svoboda M et al. Common polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and susceptibility to colorectal cancer in the Central European population. *Eur J Med Res.* 2012;17(1):17.
17. Hiragi C, Oliveira S, Hatagima A, Ferreira L, Grisolia C, Klautau-Guimarães M. Glutathione S-Transferase M1 and T1 Polymorphisms in Brazilian African Descendants. *Human Biology.* 2007;79(1):131-140.
18. Huber P, Almeida W, Fátima Â. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova.* 2008;31(5):1170-1179.
19. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Cidades: Monte Santo - Bahia. Cidades. 2016. Disponível em: <http://cod.ibge.gov.br/K1J>. Acesso em 15 de agosto de 2016.
20. Instituto Nacional de Câncer. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: Inca, 2012.
21. Jaramillo-Rangel G, Ortega-Martínez M, Cerda-Flores R, Barrera-Saldaña H. Short Communication Polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, and GSTM3 genes and breast cancer risk in northeastern Mexico. *Genetics and Molecular Research.* 2015;14(2):6465-6471.
22. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Robbins S, Cotran R. Robbins Patologia Estrutural e Funcional. 8ª. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
23. Leite T, Fonseca R, França N, Parra E, Pereira R. Genomic Ancestry, Self-Reported “Color” and Quantitative Measures of Skin Pigmentation in Brazilian Admixed Siblings. *PLoS ONE.* 2011;6(11):e27162.
24. Leme C, Raposo L, Ruiz M, Biselli J, Galbiatti A, Maniglia J et al. Análise dos genes GSTM1 e GSTT1 em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. *Revista da Associação Médica Brasileira.* 2010;56(3):299-303.

25. Lins T, Vieira R, Abreu B, Gentil P, Moreno-Lima R, Oliveira R et al. Genetic Heterogeneity of Self-Reported Ancestry Groups in an Admixed Brazilian Population. *Journal of Epidemiology*. 2011;21(4):240-245.
26. Machado T, Bomfim T, Souza L, Soares N, Santos F, Acosta A et al. Types of marriages, population structure and genetic disease. *J Biosoc Sci*. 2012;45(04):461-470.
27. Machado, T. Migração, estrutura populacional, tipos de casamentos e doenças genéticas em Monte Santo-Ba. 2012. 102 f. Tese (Doutorado em Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.
28. Magalhães da Silva T, Sandhya Rani M, de Oliveira Costa G, Figueiredo M, Melo P, Nascimento J et al. The correlation between ancestry and color in two cities of Northeast Brazil with contrasting ethnic compositions. *Eur J Hum Genet*. 2014;23(7):984-989.
29. Magno L, Talbot J, Talbot T, Borges Santos A, Souza R, Marin L et al. Glutathione S-Transferase Variants in a Brazilian Population. *Pharmacology*. 2009;83(4):231-236.
30. Manzoli G, Abe-Sandes K, Bittles A, da Silva D, Fernandes L, Paulon R et al. Non-syndromic hearing impairment in a multi-ethnic population of Northeastern Brazil. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2013;77(7):1077-1082.
31. Nussbaum R, McInnes R, Willard H. Thompson & Thompson *Genética Médica*. 7th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
32. Oliveira M, Malta D, Guauche H, Moura L, Silva G. Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil: dados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Rev bras epidemiol*. 2015;18:146-157.
33. Oliveira, P. Ancestralidade genética e genes de susceptibilidade em portadores de câncer de próstata do Estado da Bahia. 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.
34. Pena S, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro J, Hutz M, Kehdy F et al. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. *PLoS ONE*. 2011;6(2):e17063.
35. Rebeck, TM. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997; 6(9):733-43.
36. Sá R, Moreira A, Cabello P, Ornellas A, Costa E, Matos C et al. Human glutathione S-transferase polymorphisms associated with prostate cancer in the Brazilian population. *International braz j urol*. 2014;40(4):463-473.



37. Santos M, Oliveira M, Andrade S, Nunes M, Malta D, Moura L. Tendências da morbidade hospitalar por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2002 a 2012. *Epidemiol Serv Saúde*. 2015;24(3):398-389.
38. Setiawan V, Zhang Z, Yu G, Li Y, Lu M, Tsai C, Cordova D, Wang M, Guo C, Yu S, Kurtz R. GSTT1 and GSTM1 null genotypes and the risk of gastric cancer: a case-control study in a Chinese population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000; 9(1):73-80.
39. Sharma N, Singh A, Singh N, Behera D, Sharma S. Genetic polymorphisms in GSTM1, GSTT1 and GSTP1 genes and risk of lung cancer in a North Indian population. *Cancer Epidemiology*. 2015;39(6):947-955.
40. Silva, D. Análise da ancestralidade e da suscetibilidade genética e ambiental ao carcinoma escamocelular oral na Bahia / Daniel Sann Dias da Silva. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013. 95f.
41. Suarez-Kurtz G, Vargens D, Struchiner C, Bastos-Rodrigues L, Pena S. Self-reported skin color, genomic ancestry and the distribution of GST polymorphisms. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2007;17(9):765-771.
42. Wong K, Hudson T, McPherson J. Unraveling the Genetics of Cancer: Genome Sequencing and Beyond. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2011;12(1):407-430.
43. Wünsch Filho V, Gattás G. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. *Cadernos de Saúde Pública*. 2001;17(3).
44. Yoon J, Hyun M, Yang J, Park M, Park S. Ethnic differences in the association of the glutathione S-transferase T1 (GSTT1) null genotype and risk of gastric carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Molecular Biology Reports*. 2014;41(6):3867-3879.

## **X. ANEXOS**

<b>ANEXO I</b>
----------------

Ficha de coleta de dados – subprojeto câncer

1	<b>Data da entrevista:</b>	<b>Entrevistador:</b>	
2	<b>Nome do entrevistado:</b>		
3	<b>Nome do pai:</b>		
4	<b>Nome da mãe:</b>		
5	<b>Filiação biológica:</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 3. Não sabe informar		
6	<b>Data de nascimento:</b>	<b>Idade:</b>	
7	<b>Cidade de nascimento:</b>	<b>Cidade de residência:</b>	
8	<b>Endereço:</b>	<b>CEP:</b>	
		<b>PSF:</b>	
9	<b>Telefone:</b>		
10	<b>RG:</b>	<b>CPF:</b>	<b>SUS:</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA</b>			
11	<b>Raça/Cor</b> ( ) 1. Negro ( ) 2. Pardo ( ) 3. Branco ( ) 4. Indígena <b>(Auto-denominação):</b> ( ) 5. Outro _____		
12	<b>Cabelo (Textura):</b> ( ) 1. Crespo ( ) 2. Ondulado ( ) 3. Liso		
13	<b>Nariz:</b> ( ) 1. Achatado ( ) 2. Médio ( ) 3. Fino		
14	<b>Lábios (Forma):</b> ( ) 1. Grossa ( ) 2. Média ( ) 3. Fina		
15	<b>Pele (Cor):</b> ( ) 1. Preta ( ) 2. Marrom ( ) 3. Branca		
16	<b>Raça/Cor</b> ( ) 1. Negro ( ) 2. Mulato Escuro ( ) 3. Mulato Médio ( ) 4. Mulato Claro <b>(Análise fenotípica):</b> ( ) 5. Branco ( ) 6. Outros _____		
<b>ANCESTRALIDADE REFERIDA DOS PAIS E AVÓS DO PACIENTE</b>			
(1) Negro (2) Mulato (3) Branco (4) Índio (5) Não sabe informar (6) Outro			
17	<b>Pai :</b> ( )	Local de nascimento:	
18	<b>Avó Paterna:</b> ( )	Local de nascimento:	
19	<b>Avô Paterno:</b> ( )	Local de nascimento:	

20	<b>Mãe:</b> ( )	Local de nascimento:
21	<b>Avó Materna:</b> ( )	Local de nascimento:
22	<b>Avô Materno:</b> ( )	Local de nascimento:

### DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS

23	<b>Tipo de câncer:</b>		
24	<b>Diagnóstico histopatológico:</b>		
	Data:	Onde foi realizado:	
	Peso na data de diagnóstico:	Atura:	IMC:
25	<b>Estadiamento:</b> ( ) 1.I ( ) 2.II ( ) 3.III ( ) 4.IV T: N: M: ( ) ( ) 0. Não tem dados		
25	<b>Grau histológico:</b> ( ) 1. Bem diferenciado ( ) 2. Moderadamente diferenciado ( ) 3. Pouco diferenciado ( ) 4. Indiferenciado ( ) 5. Não avaliado		
26	<b>Tratamento:</b>		
	1. Cirurgia:	( ) 1.Sim	( ) 2.Não
	2. Radioterapia :	( ) 1.Sim	( ) 2. Não
	Associado a hormonioterapia	( ) 1.Sim	( ) 2.Não
	3. Hormonioterapia:	( ) 1. Sim	( ) 2. Não
	4. Observação :		
27	<b>Recidiva:</b> ( ) 1.Sim ( ) 2.Não	Data:	
	Tipo:		
28	<b>Metástase:</b> ( ) 1.Sim ( ) 2.Não	Local:	
<b>HISTÓRICO DE CÂNCER E HÁBITOS</b>			
29	<b>Histórico familiar de câncer:</b> ( ) 1.Sim ( ) 2.Não		
	Parentesco:	Tipo:	Parentesco:
			Tipo:
30	<b>Hábito de fumar:</b> ( ) 1.Sim ( ) 2.Não		
	Tipo de fumo:	Frequência:	
31	<b>Hábito de ingerir bebida alcoólica:</b> ( ) 1.Sim ( ) 2.Não		
	Tipo de bebida:	Frequência:	

## ANEXO II

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
 PROF. EDGARD SANTOS-  
 UFBA - HUPES



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** CENSO "GENÉTICA NO SERTÃO": EPIDEMIOLOGIA CLÁSSICA E MOLECULAR DE DOENÇAS GENÉTICAS NO MUNICÍPIO DE MONTE SANTO-BA.

**Pesquisador:** Angelina Xavier Acosta

**Área Temática:** Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 17885313.1.1001.0049

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Prof. Edgard Santos-UFBA

**Patrocinador Principal:** Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 379.010

**Data da Relatoria:** 09/09/2013

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional descritivo e analítico, realizado em corte transversal, que será constituído em duas etapas: primeiro será elaborado um censo populacional para a determinação da prevalência de patologia genéticas, e numa segunda etapa, será realizada uma amostragem randomizada desta população, para elaboração de estudos de caso-controle para validação do questionário aplicado e análise dos fatores de risco genéticos e ambientais envolvidos.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

Desenvolver e validar um questionário capaz de identificar doenças genéticas no contexto da Estratégia de Saúde da Família.

**Objetivo Secundário:**

Realizar a busca ativa de casos suspeitos, determinar a prevalência de surdez congênita, deficiência mental, câncer e outras doenças de provável etiologia genética, e sua distribuição geográfica em Monte Santo-BA.

**Endereço:** Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar

**Bairro:** Canela

**CEP:** 40.110-060

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3283-8043

**Fax:** (71)3283-8140

**E-mail:** cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
 PROF. EDGARD SANTOS-  
 UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 379.010

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Não haverá riscos aos sujeitos da pesquisa.

Um completo programa de genética médica foi estabelecido em Monte Santo, um município do interior do estado da Bahia, que apresenta alta prevalência de diversas doenças genéticas autossômicas recessivas, incluindo a surdez hereditária não sindrômica (SHNS), fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito e mucopolissacaridose tipo VI (síndrome de Maroteaux-Lamy). Educação em saúde, aconselhamento genético e tratamento são fornecidos localmente ou na capital do Estado, em colaboração com o Hospital Universitário

da Universidade Federal da Bahia. Um programa inédito de triagem neonatal para MPSVI também foi estabelecido no município, onde a prevalência da doença é a maior do mundo (ACOSTA, ABÉ-SANDES, GIUGLIANI e BITTLES, 2013).

Introdução:

Tamanho da Amostra no Brasil: 15.600

Benefícios:

Determinação da confiabilidade, sensibilidade e especificidade de um instrumento de coleta de informações com uso destinado aos ACS para identificação de doenças genéticas; Conhecimento da prevalência de surdez congênita, deficiência mental, câncer e outras doenças de provável etiologia genética, e o mapeamento das condições de saúde por seguimentos, áreas, micro-áreas de saúde do município de Monte Santo-BA;

Estimativa da prevalência de mutações genéticas ou fatores não genéticos causadores ou de risco para as doença identificadas e seu mapeamento por seguimentos, áreas, micro-áreas de saúde do município de Monte Santo-BA; Conhecimentos das mutações genéticas ou fatores de risco ambientais associadas ao aumento do risco de câncer e identificação de grupos ou áreas de risco.

Estimativa da contribuição das populações ancestrais africana, européia e ameríndia e a identificação de grupos étnico-geográficos de risco para doenças genéticas investigadas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Vide conclusões.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide conclusões.

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar  
 Bairro: Canela CEP: 40.110-060  
 UF: BA Município: SALVADOR  
 Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
 PROF. EDGARD SANTOS-  
 UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 379.010

**Recomendações:**

vide Conclusões.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

- Revisar metodologia com maior clareza das etapas, grupos experimentais, instituições envolvidas. (Adequado)
- Formulários e dados coletados em cada etapa. (Adequado)
- TCLE não deve ser dispensado e devem ser dois: para o censo com formulário especial e outro para a etapa de coleta de material biológico. (Adequado)
- Incluir riscos referente a constrangimento no censo e material biológico, determinar destino do material biológico (biorrepositório?). (Adequado)

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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 em substituição a Res CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

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 Item III.3.z), 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 (Item V.3) 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 Item V.4). É papel do 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.

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar  
 Bairro: Canela CEP: 40.110-060  
 UF: BA Município: SALVADOR  
 Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
PROF. EDGARD SANTOS-  
UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 379.010

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.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ e ao término do estudo.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo-HUPES, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

SALVADOR, 30 de Agosto de 2013

---

Assinador por:  
**Roberto José da Silva Badaró**  
(Coordenador)

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar  
Bairro: Canela CEP: 40.110-060  
UF: BA Município: SALVADOR  
Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com



## ANEXO III

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



**Universidade Federal da Bahia**  
**Complexo Hospitalar Prof. Edgard Santos-UFBA**  
**Serviço de Genética Médica**  
 Rua Augusto Viana, s/n 6º Andar – Canela  
 Salvador – Bahia- CEP.40110-060 Tel. 3283-8109



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Nome do projeto:** CENSO "GENÉTICA NO SERTÃO": EPIDEMIOLOGIA CLÁSSICA E MOLECULAR DE DOENÇAS GENÉTICAS NO MUNICÍPIO DE MONTE SANTO-BA.

**Pesquisador Responsável:**

Dra Angelina Xavier Acosta  
 Professora Adjunta da FMB/UFBA  
 Chefe do Serviço de Genética Médica do HUPES/UFBA

**Dúvidas:**

E-mail: axacosta@hotmail.com  
 Telefones: (71) 3283 8109/ (71) 3176 2246

**Instituições Envolvidas:**

Laboratório de Genética Médica HUPES/UFBA  
 Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular-  
 LABIMUNO/ICS/UFBA  
 Departamento de Ciências da Vida – DCV/UNEB  
 Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais –  
 APAE/Salvador

**Comitê de Ética em Pesquisa:**

CEP HUPES  
 Hospital Universitário Prof. Edgar Santos  
 Av Augusto Viana, s/n, Canela  
 Telefone: (71) 3283 8043

Você está sendo convidado a participar como voluntário de um projeto de pesquisa que irá estudar – analisar, pesquisar – doenças genéticas no município de Monte Santo. Este município está localizado no chamado polígono da seca (IBGE-2003) e possui uma população de aproximadamente 53.429 habitantes. Desde o ano de 2006, inúmeros estudos têm sido realizados no município, evidenciando a presença de variadas condições clínicas de etiologia genética que incluem surdez congênita, câncer, deficiência mental, distúrbios metabólicos, anomalias congênitas e outras síndromes genéticas. Neste estudo, pretende-se através da estratégia de saúde da família, realizar um censo com todas as famílias cadastradas no município, objetivando identificar doenças genéticas, como se distribuem e quais os elementos determinantes, ambientais ou moleculares, utilizando-se para isso de ferramentas de epidemiologia molecular para a elaboração de políticas de saúde pública no município.

Além disso, será analisado o material genético das pessoas afetadas por alguma dessas doenças citadas acima, com a finalidade de diagnóstico, bem como daquelas que não tiverem doença genética, para a comparação entre elas. O material genético é composto pelo DNA, que é responsável por determinar a vida e funcionamento das células (menor unidade do corpo humano) e é passado de pais para filhos. Algumas alterações no DNA podem ocasionar atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, deficiência mental, malformações ao nascimento, surdez, retardo de crescimento, regressão neurológica, convulsões, hipotonia, dismorfias, câncer, dentre outros. O estudo do DNA também pode informar qual a ancestralidade da pessoa (origem da pessoa). Isso também será feito neste estudo para sabermos se a ancestralidade pode ser considerada um outro fator de risco para doenças genéticas em Monte Santo.

A participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resoluções no. 196/96, 340/04 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde.

Você irá compor um grupo de pessoas que, provavelmente, possui alguma doença genética (casos) ou o grupo de pessoas consideradas sem doença genética (controle). Caso você concorde em participar desta pesquisa irá responder um questionário para coleta de dados pessoais e informações sobre o histórico pessoal e familiar e, além disto, será realizada a coleta de sangue e/ou urina em quantidade variável, a depender da necessidade do exame que seja solicitado, utilizando material apropriado (tubos e agulhas estéreis e descartáveis). Essa coleta poderá provocar

desconforto temporário causado pela picada de agulha, queimor, e, muito raramente, hematoma (roxidão) e infecção. A participação no estudo também autoriza que as amostras coletadas sejam armazenadas. Entretanto, para o caso de ser necessária a utilização da amostra em novos estudos, você será comunicado e será solicitada uma nova autorização, desde que os estudos adicionais sejam também analisados pelo CEP.

Você pode auxiliar neste estudo autorizando a realização de exames médicos, exame físico, exames bioquímicos, citogenéticos e de biologia molecular, permitindo o uso de fotografias quando a equipe médica julgar alguma característica relevante e por fim, autorizando a publicação desses dados.

O material coletado e o questionário respondido serão processados, analisados e estocados no Laboratório de Genética Médica do HUPES/UFBA. Você terá acesso ao mesmo e também poderá solicitar sua retirada a qualquer tempo, basta que entre em contato com o pesquisador responsável e faça a solicitação.

Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o(a) pesquisador(a) e o(a) orientador(a) terão conhecimento dos dados, que serão tabulados sem a identificação do nome. Os dados, quando publicados em meios científicos não mencionarão a identidade dos participantes da pesquisa.

O estudo não desempenhará quaisquer riscos a saúde dos mesmos, todavia a coleta do material biológico, como mencionado, poderá causar leve desconforto. Você será beneficiado participando desta pesquisa, pois esta irá gerar informações sobre doenças genéticas no município de Monte Santo, além de desenvolver e validar um questionário capaz de identificar estas doenças no contexto da Estratégia de Saúde da Família e realizar a busca ativa de casos suspeitos, determinando, assim, a prevalência de surdez congênita, deficiência mental, câncer e outras doenças de provável etiologia genética. Além disso, caso seja diagnosticado alguma das doenças genéticas citadas acima, o paciente será encaminhado para acompanhamento em serviços especializados e a família realizará o aconselhamento genético apropriado com especialistas na área.

Esperamos que este estudo possa contribuir com informações que auxiliem nas medidas de saúde para a diminuição da incidência dessas doenças, através do aconselhamento genético. Você terá a opção de escolher conhecer ou não os resultados dos seus exames e neste caso, a informação será passada em reunião, em data e local combinados após contato telefônico.

Você não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

#### **Programa de Orientação de Conduta e Encaminhamento para Câncer**

Caso esta pesquisa verifique a existência de marcadores genéticos que estejam desempenhando aumento no risco de desenvolvimento de câncer na população de Monte Santo, o (a) senhor (a), sendo identificado como portador de algum desses marcadores genéticos, será considerado como integrante de grupo de risco. Desta forma, será contatado e convidado (a) a participar de uma reunião na qual será informado (a) sobre os resultados da pesquisa, os índices de risco mensurados sob o ponto de vista populacional, e receberá orientações, em conjunto ou individualmente, sobre as formas de prevenção ou de redução de danos, disponíveis. Ressalta-se que ser considerado integrante de grupo de risco não significa que irá desenvolver ou que seus descendentes irão desenvolver o câncer, apenas identifica a presença do risco, podendo ou não resultar na doença, que por sua vez dependerá das condições e estilo de vida de cada indivíduo.

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Eu recebi uma cópia deste documento, e tenho o direito de negar ou desistir de participar deste estudo em qualquer momento. A PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA É VOLUNTÁRIA.

Eu \_\_\_\_\_, R.G. \_\_\_\_\_, reafirmando que tenho ciência do acima exposto, concordo em participar desse estudo, e estou ciente que tenho:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa a que serei submetido;
2. A liberdade de não querer saber os resultados dos meus exames;
3. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação dos meus cuidados;
4. A segurança de que, em caso de serem realizados novos estudos, nos quais os dados fornecidos, coletados e obtidos poderão ser utilizados, serei consultado para autorização da utilização do meu material nestes estudos, e somente quando isso não for possível, o Comitê de Ética em Pesquisa poderá ser contatado para que seja justificada impossibilidade de nova autorização. Contudo, opto pela:
  - ( ) 1. Necessidade de novo consentimento a cada pesquisa;
  - ( ) 2. Dispensa de novo consentimento a cada pesquisa.
5. A garantia de livre acesso aos meus exames genéticos e a liberdade de solicitar retirada do meu material do banco de armazenamento a qualquer momento;
6. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com minha privacidade, bem como as informações coletadas somente serão acessíveis aos pesquisadores, não sendo permitido acesso à terceiros.
7. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
8. A disponibilidade de tratamento médico e indenização que legalmente teria direito, em caso de danos diretamente causados pela pesquisa que os justifique, serão custeados pelos pesquisadores;
9. O conhecimento de que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

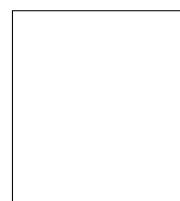
Monte Santo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Participante ou Responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável

Testemunha 1: \_\_\_\_\_

Testemunha 2: \_\_\_\_\_



Polegar direito