



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde**

Anelise Russo

**“Avaliação de polimorfismos de genes
metabolizadores de xenobióticos em
pacientes com câncer de cabeça e
pescoço”.**

**São José do Rio Preto
2011**

Anelise Russo

**Avaliação de polimorfismos de genes
metabolizadores de xenobióticos em
pacientes com câncer de cabeça e pescoço**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Curso
de Pós-graduação em Ciências da Saúde,
Área de Concentração: Medicina e
Ciências Correlatas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eny Maria Goloni-Bertollo

São José do Rio Preto
2011

Russo, Anelise

“Avaliação de polimorfismos de genes metabolizadores de xenobióticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço”.

São José do Rio Preto, 2011.

114 p

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eny Maria Goloni-Bertollo

1. Metabolismo de xenobióticos; 2. Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço; 3. Polimorfismo genético.

Anelise Russo

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE
GENES METABOLIZADORES DE
XENOBIÓTICOS EM PACIENTES COM
CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO**

BANCA EXAMINADORA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE MESTRE**

Presidente e Orientador: Eny Maria Goloni-Bertollo

1º Examinador: Ana Elizabete Silva

2º Examinador: Luiz Fernando Molina

1º Suplente: Érika Cristina Pavarino

2º Suplente: Paula Rahal

São José do Rio Preto, 24/05/2011.

Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	ix
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	01
2. Artigos Científicos.....	12
Artigo 1. Polymorphisms of the CYP1A1 and CYP2E1 genes in head and neck squamous cell carcinoma.....	15
Artigo 2. Análise dos polimorfismos <i>GSTP1</i> A313G e <i>GSTP1</i> C341T em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.....	26
Artigo 3. Polimorfismos do gene EPHX1 em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.....	49
Artigo 4. Genetic polymorphisms of xenobiotics metabolism to head and neck squamous cell carcinoma.....	67
3. Conclusões.....	94
4. Referências Bibliográficas.....	97
5. Anexos.....	108
Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CEP).....	109
Anexo 2. Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	110
Anexo 3. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CEP) para análise molecular do genes estudados.....	111

Anexo 4. Figura 1. Análise molecular dos polimorfismos <i>CYP1A1</i> *2A (I), <i>CYP2E1</i> *5B (II), <i>CYP2E1</i> *6 (III), <i>CYP1A1</i> *2C -A2455G(IV).....	112
Anexo 5. Análise molecular dos polimorfismos <i>GSTP1</i> -A313G / Ile105Val (I), <i>GSTP1</i> -C341T / Ala114Val (II), <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> (III).....	113
Anexo 6. Análise molecular dos polimorfismos Tyr113His e His139Arg do gene <i>EPHX1</i>	114

Dedicatória

Aos meus pais Valmir e Angela

Por estarem sempre ao meu lado a cada passo de minha vida, ensinando a transformar uma dificuldade que aparece em meu caminho em sabedoria para a próxima. Além de ensinar a valorizar as alegrias que surgiram em minha vida. E acima de tudo me ensinaram que ter honestidade e humildade é uma virtude. Agradeço a vocês por existirem e por acreditarem no investimento de meus ideais. Dedico a vocês o meu amor incondicional!

A minha irmã Ariane

Pela amizade eterna e verdadeira, disposta a me ouvir com paciência e compreensão em qualquer momento sem se importar com o assunto, aconselhando-me nas decisões mais importantes. A final amiga é para essas coisas. Amo você!

Ao meu namorado Basilio

Pelo apoio e compreensão no dia-dia de meu trabalho, dizendo para ter calma que tudo se resolve. Ajudando a encontrar soluções para os problemas profissionais e familiares. Obrigada por ser motivo de alegria em minha vida! Amo você.

Aos meus avós, tios e primos

Por acreditar no meu potencial e incentivar meus estudos para um dia poder chegar onde sonhei. Obrigada por nos momentos de incerteza, cansaço, alegrias, conseguiram se manter simplesmente presente.

Aos amigos

Pela companhia nos momentos de risos e choros. Pela amizade sincera, com lealdade e confiança que me proporcionam, me aceitando do jeito que sou com meus defeitos e minhas qualidades. Obrigada por preservarem nossa amizade.

Agradecimentos

Á Deus

Pela benção de ter minha família ao meu lado, por reservar pessoas especiais para passar pela minha vida, pela proteção diária e por me confortar nos momentos de aflição.

Ao Diretor Geral Prof. Dr. Humberto Liedtke Junior

Pela direção da instituição com grande maestria incentivando as pesquisas para contribuir no desenvolvimento e fortalecimento desta Instituição.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da FAMERP e seus funcionários

Pela disponibilidade e atenção durante o desenvolvimento deste estudo pelo curso de pós-graduação da Instituição.

À Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo

Por me ensinar não só novos conhecimentos científicos para contribuir na minha formação como profissional, mas também novos conhecimentos para uma vida na minha formação como pessoa. Por me ensinar a lidar com as dificuldades no dia-dia do desenvolvimento deste estudo e com os conflitos de um ambiente de trabalho coletivo. Pela oportunidade de realizar este estudo em seu laboratório e por acreditar no meu potencial, assim como no meu sucesso.

À Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino

Pela co-orientação, nas práticas laboratoriais, nos relatórios e pela atenção, estando sempre disposta a ajudar, ensinar e corrigir contribuindo na minha formação profissional.

À Profa. Dra. Mariangela Torreglosa Ruiz

Pela Por toda paciência no início deste trabalho, quanto eu ainda não possuía conhecimentos suficientes para desenvolvê-lo e você generosamente contribuiu no dia-dia laboratorial, no conhecimento científico e na dissertação de relatórios e artigos.

As bolsistas técnicas no período de desenvolvimento deste estudo: Amanda, Tatiane, Glaucia e Gabriela e a estagiária Maysa.

Pela dedicação e atenção na rotina laboratorial, sempre prontas para me auxiliar, sem as quais não teria conseguido finalizar este trabalho a tempo. Por terem se tornadas minhas amigas.

As estagiárias de Iniciação Científica: Marianna, Aline, Pamela e Jéssika.

Pela colaboração no desenvolvimento deste estudo.

A todos os colegas de pós-graduação da UPGEM.

Pela contribuição de alguma maneira no desenvolvimento do estudo. A Ana Lívia, pelo conhecimento transmitido, pelas correções e cooperação nos momentos de aflição. A Cristiani, pela companhia nas inúmeras diluições ditando os volumes de água e DNA. A Bruna e a Lidia, pelas correções de inglês, dentre outras colaborações. A Joice e a Patricia nos testes práticos e pela atenção, dispostas a ajudar. A Camila, Rodrigo e Vitor pelas companhias, e aos Gustavos por estarem sempre dispostos para ajudar.

Ao Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Aos médicos, residentes e enfermeiras pela colaboração na obtenção das amostras e pela paciência colaborando com este trabalho.

Ao Hemocentro do Hospital de Base – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Pela colaboração paciência e na obtenção das amostras de sangue dos indivíduos doadores e disposição auxiliando nas coletas de finais de semana.

Aos pacientes do ambulatório e as pessoas doadoras de sangue

Por consentirem em participar da pesquisa e acreditar que a pesquisa é importante e poderá num futuro próximo desvendar os caminhos para melhorar o tratamento e quem sabe um dia, a cura de doenças.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

Pela bolsa concedida.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

Pelo auxílio financeiro para compra do material necessário para realização desta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Luiz Fernando Molina e Profa. Dra. Ana Elizabete Silva.

Pela disponibilidade e sugestões construtivas colaborando na correção da dissertação.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.

Epígrafe

“Uma pessoa inteligente aprende com os seus erros, uma pessoa sabia vai além, aprende com os erros dos outros, pois é observadora.

Procure um grande amor na vida e cultivem-no. Pois, sem amor a vida se torna um rio sem nascente, um mar sem ondas, uma história sem aventura! Mas, nunca esqueçam, em primeiro lugar tenham um caso de amor consigo mesmo”.

Romanov

Lista de Figuras:

Introdução **Figura1.** Esquema representativo do metabolismo de xenobióticos
e suas principais enzimas..... 06

Lista de Tabelas

<i>Artigo 1</i>	Table 1. Distribution of demographic data, risk factors, <i>CYP1A1</i> (<i>MspI</i>) genotypes, and odds ratio (OR) for head and neck squamous cell carcinoma.....	20
	Table 2. Distribution of demographic data, risk factors, <i>CYP2E1</i> (<i>PstI</i>) genotypes, and odds ratio (OR) for head and neck squamous cell carcinoma.....	20
	Table 3. Distribution of demographic data, risk factors, <i>CYP1A1</i> (<i>MspI</i>), <i>CYP2E1</i> (<i>PstI</i>) and <i>CYP2E1</i> (<i>DraI</i>) genotypes, and odds ratio (OR) for head and neck squamous cell carcinoma risk.....	21
	Table 4. Distribution of demographic data, risk factors, <i>CYP2E1</i> (<i>DraI</i>) genotypes, and odds ratio (OR) for head and neck squamous cell carcinoma.....	21
	Table 5. Distribution of clinical histopathological parameters in head and neck squamous cell carcinoma patients.....	22
<i>Artigo 2</i>	Tabela 1. Tamanhos dos fragmentos em pares de base (pb) gerados após digestão com a enzima de restrição.....	46
	Tabela 2. Dados demográficos, fatores de risco e polimorfismos dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço e indivíduos controle.....	47
	Tabela 3. Características clínico-patológicas e polimorfismos <i>GSTP1</i> ...	48
<i>Artigo 3</i>	Tabela 1. Dados demográficos e frequência de polimorfismos de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e indivíduos controles.....	64

	Tabela 2. Distribuição dos genótipos do polimorfismo Tyr113His e fatores de risco em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e indivíduos controles.....	65
	Tabela 3. Distribuição dos genótipos do polimorfismo His139Arg e fatores de risco em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e indivíduos controles.....	66
<i>Artigo 4</i>	Table I. Distribution of genotypes and percentages in univariate analysis.....	89
	Table II. Distribution of demographic data, risk factors, <i>CYP1A1*2A</i> , <i>CYP1A1*2C</i> , <i>CYP2E1*5B</i> , <i>CYP2E1*6</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTP1</i> A313G, <i>GSTP1</i> C341G, <i>EPHX1</i> Tyr113His and <i>EPHX1</i> His139Arg genotypes, and odds ratio (OR) for head and neck squamous cell carcinoma.....	90
	Table III. Distribution of clinical histopathological parameters in head and neck squamous cell carcinoma patients (OR (IC 95%), p value).....	92

Lista de abreviaturas e símbolos

A	Adenina
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
Ala	Alanina
Arg	Arginina
C	Citocina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior
CEP	<i>Research Ethics Committee</i>
CI 95%	<i>Confidence interval</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (<i>National Council for Scientific and Technological Development</i>)
CONEP	Comitê Nacional de Pesquisa (<i>National Research Commission</i>)
CYPs	Citocromo P450 (<i>Cytocrome P450</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>Desoxirribonucleic acid</i>)
EPHX1	Epóxide Hidrolase Microssomal (<i>Microsomal epoxide hydrolases</i>)
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (<i>São José do Rio Preto Medical School</i>)
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo State Research Foundation)
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
G	Guanina
GP-Ps	Glicoproteínas-P (<i>P-glycoproteins</i>)

GSTs	Glutathione-S-Transferases (<i>Glutathione-S-transferases</i>)
HB	Hospital de Base de São José do Rio Preto
His	Histidina
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPAs	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>
HPV	<i>Human Papiloma Virus</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer (<i>Brazilian National Cancer Institute</i>)
Ile	Isoleucina
MDR	<i>Multiple Drug Resistance</i>
mEH	Epóxido hidrolase microsossomal (<i>Microsomal epoxide hydrolase</i>)
NATs	N-acetiltransferases (<i>N-acetyltransferases</i>)
NNK	4-metilnitrosamino-1-3 piridil-butanona
OATs	Transportadores Ânion Orgânico
OCTs	Transportadores Cátion Orgânico
OR	Odds ratio
PB	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase chain reaction)
PCR-RFLP	Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism
SISNEP	Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (National Information System on Research Ethics involving Humans)

SLTs	Sulfotransferases
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos (<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)
TNM	Tamanho do tumor; Metástase á distância; Envolvimento de linfonodos
T	Timina
TNM	Classificação dos Tumores Malignos (<i>TNM classification</i>)
TPMTs	Thio-purina-S-metiltransferases
Tyr	Tirosina (<i>Tyrosine</i>)
UICC	<i>International Union of Cancer Control</i>
UGTs	UDP-glucoroniltransferases
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (<i>Genetics and Molecular Biology Research Unit</i>)
Val	Valina

RESUMO

Introdução: Alguns indivíduos podem apresentar risco aumentado de desenvolver o câncer devido às diferenças no biometabolismo. Polimorfismos em genes metabolizadores de xenobióticos, tais como os membros da família do Citocromo P450 (*CYP*), das Glutatião-S-Transferases (*GSTs*) e Epóxido Hidrolase Microsomal (*mEH*) mostram associação com a carcinogênese de cabeça e pescoço. **Objetivo:** Identificar a frequência de polimorfismos dos genes *CYP1A1* (*CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C*), *CYP2E1* (*CYP2E1*5B* e *CYP2E*6*), *GSTT1* (genótipo nulo), *GSTM1* (genótipo nulo), *GSTP1* (A313G e C341T) e *mEH* (Tyr113His e His139Arg) em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e em indivíduos sem história de neoplasia (controles), visando identificar biomarcadores de suscetibilidade para este tipo de câncer. Casuística e **Métodos:** Foram incluídos no estudo 1.100 indivíduos, 375 pacientes com diagnóstico patológico de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e 725 controles. As variáveis analisadas foram: idade, sexo, consumo de álcool e tabaco, sítio primário de ocorrência de tumor e evolução da doença. A genotipagem dos polimorfismos foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismos de Comprimentos de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP), PCR em Tempo Real (PCR-RT) e PCR multiplex. Os dados foram avaliados por Qui-quadrado e Regressão logística univariada e múltipla. **Resultados:** Idade acima de 49 anos, hábitos tabagista e etilista foram preditores para o desenvolvimento de neoplasias de cabeça e pescoço. Os polimorfismos *CYP2E1*6* (*CYP2E1-DraI*) e *GSTP1* A313G foram associados com esta doença na análise univariada. Na análise múltipla, a interação entre polimorfismo *CYP1A1*2C* com o gênero feminino (OR= 0,10; 95% CI=0,01-0,72; p< 0,05) e hábito não etilista (OR= 0,21; 95% CI=0,07-0,67; p< 0,05), *mEH* His139Arg e hábito etilista (OR= 0,49; 95%

CI=0,27-0,90; $p < 0,05$), *CYP2E1**5B e hábitos tabagista e etilista e idade ≥ 49 (OR = 4,10; CI 95% 2,44-6,89; $p < 0,001$; OR = 1,93; CI 95% 1,18-3,16; $p = 0,0084$; OR = 9,10; CI 95% 5,86-14,14; $p < 0,001$, respectivamente) e *GSTP1* A313G e hábitos tabagista e etilista, idade ≥ 48 anos e gênero masculino (OR=4,21; IC 95% 2,71-6,55; $p < 0,0001$; OR=1,65; IC 95% 1,07-2,55; $p=0,023$; OR=12,37; IC 95% 7,89-19,38; $p < 0,0001$, respectivamente); diminui o risco de câncer de cabeça e pescoço; enquanto *CYP1A1**2A e hábitos não tabagista e não etilista (OR= 2,84; 95% CI=1,01-7,97; $p < 0,05$; OR= 2,43; 95% CI=1,00-5,87; $p < 0,05$, respectivamente) aumentam este risco. O polimorfismo *CYP2E1**5B e hábito não tabagista (OR= 3,75; 95% CI=1,25-11,23; $p < 0,05$) também aumenta o risco para esta doença. Foi observada uma alta frequência dos polimorfismos *CYP1A1**2C (OR= 2,48; 95% CI=1,00-6,20; $p < 0,05$) *GSTT1* (OR= 3,35; 95% CI=1,67-6,72; $p < 0,05$) no grupo de pacientes com tumores primários de laringe; enquanto naqueles que tem a faringe como sítio primário o polimorfismo *GSTT1* (OR=0,29; 95% CI=0,12-0,71; $p < 0,05$) foi menos frequente. O polimorfismo *CYP1A1**2A foi associado com o envolvimento de linfonodo e risco aumentado para o câncer (OR=2,45; 95% CI=1,07-5,64). Conclusão: Nossos dados demonstram que a interação entre os polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos e os fatores demográficos e de risco podem modular o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço.

Palavras chave: Polimorfismo genético, câncer de cabeça e pescoço, metabolismo de xenobióticos, genes *CYP*, *GST* e *mEH*.

ABSTRACT

Introduction: Some individuals may be present increased risk of developing cancer due to differences in biometabolism. Polymorphisms in xenobiotic metabolizing genes, such as family members of Cytochrome P450 (*CYP*), of Glutathione-S-Transferases (*GSTs*) and Microsomal Epoxide Hydrolase (*mEH*) show association with the carcinogenesis of head and neck. **Objective:** Identify the frequency of genes polymorphisms *CYP1A1* (*CYP1A1*2A* and *CYP1A1*2C*), *CYP2E1* (*CYP2E1*5B* and *CYP2E*6*), *GSTT1* (null genotype), *GSTM1* (null genotype), *GSTP1* (A313G and C341T) and *mEH* (Tyr113His and His139Arg) in patients with head and neck cancer and in individuals with no cancer history (controls), to identify susceptibility biomarkers of this type of cancer. **Methods:** included 1,100 individuals, 375 patients with pathological diagnosis of squamous cell carcinoma of head and neck cancer and 725 controls. The variables analyzed were: age, sex, alcohol and tobacco, the occurrence primary site and progression of tumor. Genotyping of polymorphisms was performed by Polymerase Chain Reaction - Length Polymorphism, Restriction Fragment (PCR-RFLP), Real-Time PCR (RT-PCR) and multiplex PCR. Datas were evaluated by chi-square, univariate and multiple logistic regression. **Results:** Advanced age, smoking habits and alcohol consumption were predictors for the development of the head and neck tumors. The polymorphisms *CYP2E1*5B* (*CYP2E1-PstI*) and *GSTP1* A313G were associated with this disease in univariable analysis. In multivariable analysis the interaction among *CYP1A1*2C* polymorphism with the female gender (OR= 0.10; 95% CI=0.01-0.72; p< 0.05) and alcohol no-habit (OR= 0.21; 95% CI=0.07-0.67; p< 0.05), *mEH* His139Arg and alcohol habit (OR= 0.49; 95% CI=0.27-0.90; p< 0.05), *CYP2E1*5B* and habits tobacco and alcohol and ≥ 49 age (OR = 4.10; CI 95% 2.44-6.89; p < 0.001; OR = 1.93; CI 95% 1.18-3.16; p=0.0084; OR=9,10; CI 95% 5,86-14,14; p< 0,001, respectively) and

GSTP1 A313G and tobacco and alcohol habits, ≥ 48 age and male gender (OR=4.21; IC 95% 2.71-6.55; $p < 0.0001$; OR=1.65; IC 95% 1.07-2.55; $p = 0.023$; OR=12.37; IC 95% 7.89-19.38; $p < 0.0001$, respectively); decrease the head and neck cancer risk; while *CYP1A1**2A and tobacco and alcohol no-habits (OR= 2.84; 95% CI=1.01-7.97; $p < 0.05$; OR= 2.43; 95% CI=1.00-5.87; $p < 0.05$, respectively) increase this risk. The *CYP2E1**5B polymorphism and tobacco no-habit (OR= 3.75; 95% CI=1.25-11.23; $p < 0.05$) also increases the risk for this disease. Showed high frequency of the polymorphisms *CYP1A1**2C (OR= 2.48; 95% CI=1.00-6.20; $p < 0.05$) *GSTT1* (OR= 3.35; 95% CI=1.67-6.72; $p < 0.05$) in patients group with primary tumors of larynx; while those who have the pharynx as the primary site *GSTT1* (OR=0.29; 95% CI=0.12-0.71; $p < 0.05$) was less frequent. *CYP1A1**2A (*CYP1A1*-MspI) polymorphism was associated with lymph node involvement and increased risk for cancer (OR =2.45; 95% CI= 1.07-5.64). **Conclusion:** Our data demonstrate that the interaction between polymorphisms in genes that encode enzymes involved in xenobiotic metabolism and the demographic and risk factors may modulate the development of head and neck cancer.

Key words: Genetic polymorphism; head and neck cancer; xenobiotic metabolism, *CYP*, *GST* and *mEH* genes.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC – “Head and neck squamous cell carcinoma”) é um termo que engloba todas as neoplasias malignas localizadas na cavidade oral e trato aerodigestivo superior, com ocorrência de 40% na cavidade oral, 15% na faringe, 25% na laringe e 20% em outras localizações (glândula salivar, tireóide).⁽¹⁾ Em relação à histologia, mais de 90% dos cânceres de cabeça e pescoço são originados de células escamosas.^(2,3) Este tipo tumoral representa uma importante causa de morbidade e de mortalidade no mundo e atinge o quinto lugar em incidência entre todos os cânceres.^(3,4)

O diagnóstico precoce do HNSCC deste tipo de tumor é difícil devido à falta de sintomas específicos no início da doença bem como a sua etiologia e oncogênese não são ainda totalmente compreendidas.⁽⁵⁾ Esses tipos de cânceres têm uma taxa de sobrevida de cinco anos em menos de 50% dos casos, o que indica um sério problema de saúde.⁽¹⁾

No Brasil, foram estimados para o ano de 2010, pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) 18.130 casos novos de câncer da cavidade oral, o sítio mais representativo deste tipo de tumor, atingindo o quinto tipo mais comum de câncer em homens, com ocorrência de 13.250 novos casos e o sétimo tipo mais comum para o gênero feminino com 4.880 casos novos para este sítio anatômico.⁽⁴⁾ Em geral, HNSCC acomete três vezes mais o sexo masculino que o feminino.⁽⁶⁾ No entanto, alguns estudos relatam um aumento da incidência de HNSCC entre as mulheres nas últimas décadas.^(7,8)

Nos últimos dez anos, a incidência de HNSCC aumentou, especialmente em pessoas com memos de 45 anos de idade⁽⁹⁾, o que pode estar atribuído ao aumento de

infecções causadas pelo vírus papiloma humano (HPV),⁽¹⁰⁾ e do Epstein-Barr,^(11,12) em países desenvolvidos. Uma higiene oral inadequada⁽¹³⁾ também tem sido associada a ocorrência do HNSCC, pois alterações relacionadas ao estresse oxidativo na saliva impedem a ação antioxidativa das enzimas que atuam na saliva de exercer sua função de proteção, permitindo que compostos carcinogênicos e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio originados por meio do consumo do álcool e do cigarro atuem na cavidade oral.⁽¹⁴⁾

O desenvolvimento do HNSCC é resultado de interações entre fatores ambientais (hábitos tabagista e etilista) e fatores genéticos, portanto herança multifatorial.^(1,15-22)

Quanto aos fatores ambientais, o cigarro possui mais de 70 agentes carcinogênicos dentre eles hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) como os benzo[a] antracenos, os benzo[a] pirenos, os fluorantenos alquilados e os crisenos; as aminas aromáticas e os componentes nitroso,⁽²³⁾ que promovem mutações celulares e uma hiperplasia difusa da mucosa do trato aerodigestivo superior, o que favorece o crescimento de clones celulares alterados. Este processo pode ocorrer pela interação entre as N-nitrosaminas e aminas aromáticas do cigarro com o DNA, que resulta na formação de adutos de DNA. As enzimas envolvidas nesse processo podem ter polimorfismo genético e, algumas variantes, aceleram esse metabolismo.⁽²⁴⁾

Embora estudos em animais indiquem que o álcool não é genotóxico, este pode agir como solvente para a penetração de carcinógenos. Possui como metabólito primário o acetaldeído, o qual é altamente reativo ligando-se a proteínas, aos constituintes celulares e ao DNA, formando adutos estáveis.⁽²⁵⁻²⁷⁾ O consumo excessivo de álcool também pode levar a deficiências nutricionais devido á diminuição da absorção

intestinal e de alterações em diversas vias metabólicas.⁽²⁸⁾ O álcool também suprime a remoção de moléculas de nitrosaminas de baixo peso molecular liberadas pelo cigarro por meio da inibição de várias isoformas da superfamília do citocromo P450, o que aumenta a formação de adutos de DNA.⁽²⁹⁾

Em relação à composição genética, os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) são definidos como uma variação que está presente em pelo menos 1% da população e são responsáveis pela maioria da diversidade genética.⁽³⁰⁻³²⁾ A maior parte dos cânceres é de origem somática e apenas, aproximadamente, 5% a 10% são hereditários, provenientes de mutações na linhagem germinativa.^(18,21,33) Assim, o câncer caracteriza-se como uma doença genética em que a identificação e análise dos genes relacionados com sua gênese é imprescindível para a compreensão de suas bases moleculares.⁽³⁴⁾

A maquinaria de metabolização xenobiótica possui dois principais tipos de enzimas: as do metabolismo oxidativo mediado ou de Fase I; e as enzimas conjugadas ou de Fase II. Muitos compostos são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas da Fase I que são constituídas principalmente, pelas enzimas da super-família citocromo P-450 (CYPs) e pelas enzimas epóxido hidrolase microssomal (mEHs),⁽³⁵⁾ por meio da adição de um ou mais agrupamentos hidroxila no substrato, um pró-carcinógeno pode tornar-se carcinógeno. Em contraponto, as reações da Fase II envolvem a conjugação com o substrato endógeno (glutathiona, sulfato, glicose, acetato) por meio das glutathiona-S-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases (UGTs), N-acetiltransferases (NATs), Sulfotransferases (SLTs) e Thio-purina-S-metiltransferases (TPMTs) que agem então como enzimas inativadoras dos produtos da Fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção.^(36,37)

Omicinski *et al.*, (2011), relatam sobre a Fase III de biotransformação constituída de transportadores ativos de membrana, esta fase possui enzimas com a função de excretar drogas e outros xenobióticos através das membranas celulares.⁽³⁷⁾ As enzimas que atuam nesta fase são denominadas *Multiple drug resistance – MDR*, composta pela família *ATP-binding cassette – ABC* e glicoproteínas-P (GP-Ps) com os transportadores cátion orgânico – OCTs, que excretam substâncias de carga elétrica positiva e os transportadores ânion orgânico – OATs, que excretam substâncias de carga elétrica negativa.⁽³⁷⁻³⁹⁾

As enzimas que atuam na via de metabolização de xenobióticos, tais como, compostos provenientes do tabaco e álcool, podem participar de forma indireta do mecanismo de carcinogênese. Isso porque, desempenham função primordial na suscetibilidade individual à doença, uma vez que são responsáveis pela ativação e detoxificação destes compostos⁽⁴⁰⁻⁴³⁾ Figura 1.

1.1 Polimorfismos genéticos envolvidos no metabolismo de xenobióticos

A superfamília do citocromo P450 representa uma das principais classes de biotransformação da Fase I, por meio de suas mais de 500 isoenzimas. Estas enzimas encontram-se em animais, plantas, leveduras e bactérias e, somente em mamíferos, calcula-se que estejam presentes mais de 200 enzimas P450 funcionais. Estima-se que no genoma humano existam em torno de 60 a 100 genes codificadores de enzimas P450, sendo que cerca de 20 deles estão envolvidos na codificação de enzimas que metabolizam compostos exógenos. Essa variedade de enzimas participa tanto da biossíntese como da degradação de esteróides, vitaminas, ácidos graxos, prostaglandinas, aminas, ferormônios e metabólitos vegetais. Metabolizam ainda,

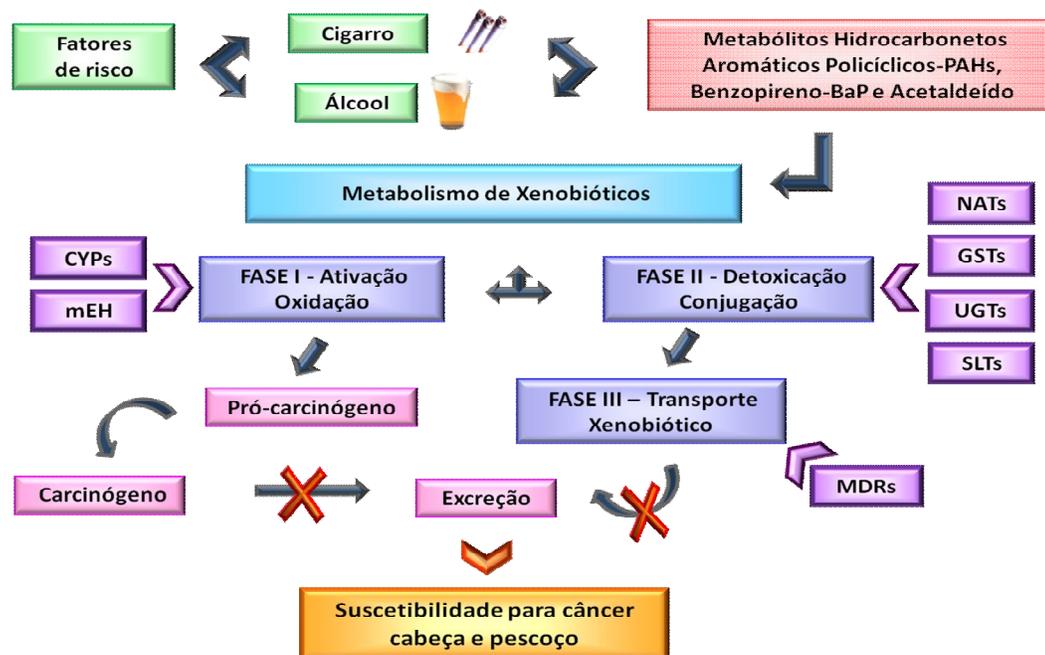


Figura 1. Esquema representativo do metabolismo de xenobióticos e suas principais enzimas – CYPs: Citocromos P450; mEH: Epóxide hidrolase microsomal; NATs: N-acetiltransferases; GSTs: Glutationa-S-Transferases; UGTs: UDP-Glucoroniltransferases; SLTs: Sulfotransferases; “MDRs: Multiple Drug Resistences”.

inúmeras drogas e carcinógenos / mutágenos químicos, entre outros poluentes ambientais denominados, em seu conjunto, como xenobióticos.⁽⁴⁴⁾

Em relação à superfamília *CYP*, os genes *CYP1A1* e *CYP2E1* apresentam grande importância no processo da carcinogênese humana. O gene *CYP1A1* localizado no cromossomo 15, tem como produto funcional a enzima aril hidrocarboneto hidroxilase (AHH), cuja transcrição, além de ser induzida por muitos agentes ambientais, tem expressão diferenciada entre os tipos celulares. No éxon 7, do gene *CYP1A1* existem dois polimorfismos, na extremidade 3' está localizado o polimorfismo de restrição para a enzima *Msp* I denominado *CYP1A1*2A*, que resulta na alteração de uma única base na posição 3801 da cauda poli (A) na região 3' não traduzida do gene e está associado à suscetibilidade de cânceres relacionados ao tabaco, tais como câncer oral.⁽⁴⁵⁾ O outro polimorfismo, denominado *CYP1A1*2C*, resulta na transição de adenina para guanina na posição 2455, causa a substituição de Isoleucina por Valina e está associado a um aumento de até duas vezes na atividade microsomal da enzima *CYP1A1*.⁽⁴⁶⁾ A frequência elevada deste polimorfismo foi observada em uma população japonesa com câncer de cabeça e pescoço, especificamente em pacientes com câncer de laringe,⁽⁴⁷⁾ enquanto que um estudo na população brasileira em câncer oral não encontrou associação desse polimorfismo com a doença.⁽⁴⁸⁾

O gene *CYP2E1*, localizado no cromossomo 10q24-3-qter, tem a transcrição induzida pelo etanol e seu produto (dimetilnitrosamina desmetilase) está envolvido no metabolismo oxidativo do próprio etanol, bem como de inúmeros carcinógenos ambientais como compostos hidrofílicos de baixo peso molecular, benzeno, cloreto de vinila e as nitrosaminas, entre elas a NNK (4-metilnitrosamino-1-3 piridil-butanona),

encontradas na fumaça do cigarro. Alterações neste gene estão associadas ao aumento do risco de câncer oral.⁽⁴⁹⁾

Os polimorfismos do gene *CYP2E1* têm sido considerados como um dos indicadores potenciais da suscetibilidade ao câncer. Dentre eles os polimorfismos mais estudados são *Pst* I (C-1019T), localizado na região promotora do gene, e o polimorfismo *Dra* I (A7766T) do íntron 6, são responsáveis pelos alelos *CYP2E1*5B* e *CYP2E1*6*, respectivamente. O alelo *CYP2E1*5B* foi relacionado aos níveis aumentados de ativação transcricional do gene com expressão elevada da proteína *CYP2E1*, enquanto o alelo *CYP2E1*6* está associado à maior formação de adutos de DNA. O estudo de Bouchardy e colaboradores demonstram que *CYP2E1*5B* e *CYP2E1*6*, estão associados ao risco aumentado de câncer no trato aéreo superior. Para o carcinoma espinocelular de esôfago foi observado risco aumentado para os indivíduos portadores do alelo polimórfico *CYP2E1*5B* e selvagem (genótipo DD) do alelo *CYP2E1*6*.⁽⁵⁰⁾

Os genes da família *GST* são agrupados em oito classes baseado na estrutura, substrato específico e propriedades imunológicas: *alpha*, *mu*, *kappa*, *pi*, *sigma*, *theta*, *zeta* e *omega*.⁽⁵¹⁾ O gene *GSTM1* (mapeado na região cromossômica 1p13.1) é polimórfico na população humana e 20 a 50% dos indivíduos não expressam a enzima devido a uma deleção gênica em homozigose (*GSTM1* 0*).⁽⁵²⁾ A frequência de indivíduos que não expressam a enzima é mais alta em caucasóides e asiáticos do que em africanos.⁽⁵³⁾ O gene *GSTT1* (localizado no cromossomo 22q11.2) também é polimórfico na população humana, apresentando fenótipo nulo por deleção (*GSTT1* 0*) e conseqüente perda completa da atividade enzimática. Aproximadamente 60% dos asiáticos, 40% dos africanos e 20% dos caucasóides não expressam esta enzima.^(54,55)

Os estudos dos polimorfismos de deleção *GSTT1* e *GSTMI* realizados em HNSCC são contraditórios. Vários autores demonstram uma associação com o genótipo *GSTMI* nulo,^(56,57) enquanto outros não.⁽⁵⁸⁻⁶¹⁾ Para o genótipo *GSTT1* nulo também foi demonstrada uma relação em alguns estudos,^(56,62) e ausência da mesma em outros.^(58-61,63) A combinação destes genótipos nulos e risco aumentado para este tipo de carcinoma também já foi observada.^(57,63) Além disso, o tempo e a quantidade de exposição à carcinógenos (álcool e tabaco) podem influenciar na interação destes genótipos ao desenvolvimento deste tipo de neoplasia.⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾

O gene *GSTP1* está localizado na região cromossômica 11q18 e polimorfismos neste gene estão associados a diversos tipos de cânceres. Duas variações genéticas estão presentes no gene *GSTP1*; uma A313G (Ile105Val) e a outra C341T (Ala114Val) que resultam em diferenças significativas na atividade enzimática e associação com os níveis de adutos de DNA.^(67,68)

Frequências aumentadas dos polimorfismos *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T foram observadas em pacientes com carcinoma espinocelular de esôfago quando comparados à população controle.^(69,70) Contudo, segundo Singh *et al.* (2008) a presença de pelo menos um alelo polimórfico *GSTP1* Ile105Val está associada à diminuição do risco de HNSCC.⁽⁴³⁾ Além disso, um aumento da frequência do alelo selvagem deste polimorfismo foi observada por Jain *et al.* (2006) em pacientes com câncer de esôfago,⁽⁶⁷⁾ e a combinação do genótipo selvagem 105Ile de *GSTP1* com genótipos nulos de *GSTMI* e *GSTT1* foi associada a aumento de quatro vezes no risco para desenvolver HNSCC.⁽⁴³⁾

Os SNPs Tyr113His e His139Arg foram identificados no gene *EPHX1*, que codifica a enzima *mEH* e estes estão associados com alterações enzimáticas. A variante

His114 mostrou uma diminuição de 40% na atividade da enzima enquanto a variante Arg139 mostrou um aumento de 25% de atividade.⁽⁷¹⁾

Alguns estudos investigaram o papel de polimorfismos do gene *EPHX1* na carcinogênese de cabeça e pescoço. Jourenkova-Mironova *et al.* (2000), em um estudo realizado na França, encontraram um aumento significativo do risco aumentado para câncer de orofaringe e laringe em indivíduos fumantes, etilistas e que apresentam o genótipo variante do polimorfismo Tyr113His do gene *EPHX1*.⁽⁷²⁾ Assim como, Park *et al.* (2003) demonstraram que o genótipo variante deste polimorfismo, que possui atividade aumentada da enzima, está associado ao risco aumentado de câncer de laringe e oral em indivíduos fumantes.⁽⁷³⁾ O estudo de Lacko e colaboradores (2008) mostraram associação do polimorfismo His139Arg e câncer de cabeça e pescoço.⁽⁷⁴⁾

Polimorfismos em genes que codificam as enzimas da via metabólica dos xenobióticos podem alterar sua expressão ou função, alterando a ativação ou detoxificação de compostos carcinogênicos.^(15,42,43,75-78) A combinação dos genótipos nulos *GSTT1* e *GSTM1*, assim como polimorfismos combinados entre os genes *GSTs*, *CYPs* e *mEHs* aumentam o risco para o carcinoma de cabeça e pescoço, bem como o potencial de metástase e agressividade do tumor.^(49,79-82) Por esta razão, inúmeros estudos têm sido realizados para verificar a associação entre determinados polimorfismos de genes codificadores de enzimas que participam do biometabolismo de xenobióticos e alguns tipos de tumores.⁽⁴¹⁾

1.2 Objetivos

Considerando as evidências apresentadas, este estudo teve como objetivos:

1. Avaliar a associação dos polimorfismos *CYP1A1**2A, *CYP1A1**2C, *CYP2E1**5B, *CYP2E**6, genótipos nulos *GSTT1* e *GSTM1*, *GSTP1* A313G, *GSTP1* C341T, *EPHX1* Tyr113His e *EPHX1* His139Arg no risco de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, em um estudo caso-controle.

2. Investigar a associação dos polimorfismos com os hábitos tabagista e etilista, gênero e idade (fatores de risco) no desenvolvimento dos tumores de câncer de células escamosas de cabeça e pescoço.

3. Verificar a associação entre os polimorfismos e os sítios primários de ocorrência, extensão do tumor, comprometimento de linfonodos e o prognósticos da doença.

2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados referentes a esta dissertação estão apresentados em forma de artigos. No total estão apresentados 04 artigos, um submetido para publicação e três a serem submetidos para publicação.

Artigo 1

Título: Polymorphisms of the *CYP1A1* and *CYP2E1* genes in head and neck squamous cell carcinoma risk.

Autores: Nathália Moreno Cury, Anelise Russo, Ana Lívia Silva Galbiatti, Mariângela Torreglosa Ruiz, Luiz Sérgio Raposo, José Victor Maniglia, Érika Cristina Pavarino, Eny Maria Goloni-Bertollo

Periódico: Molecular Biology Reports, submetido para publicação.

Artigo 2

Título: Análise dos polimorfismos *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.

Autores: Anelise Russo, Pamela Risardi Francelin, Marianna Angelo Palmejani, Aline Maria de Vita Marques, Ana Lívia da Silva Galbiatti, Lidia Maria Rebolho Batista da Silva, Mariângela Torreglosa Ruiz, José Victor Maniglia, Luis Sérgio Raposo, Érika Cristina Pavarino, Eny Maria Goloni-Bertollo

Periódico: Brazilian Journal of Otorhinolaryngology (BJORL), a ser submetido para publicação.

Artigo 3

Título: Polimorfismos do gene *EPHX1* em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

Autores: Anelise Russo, Mariangela Torreglosa Ruiz, Ana Livia Silva Galbiatti, Lidia Maria Rebolho Batista da Silva, José Victor Maniglia, Luís Sérgio Raposo, Érika Cristina Pavarino, Eny Maria Goloni-Bertollo

Periódico: Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB), a ser submetido para publicação.

Artigo 4

Título: Genetic polymorphisms of xenobiotics metabolism to head and neck squamous cell carcinoma risk.

Autores: Anelise Russo, Ana Livia Silva Galbiatti, Mariângela Torreglosa Ruiz, Luiz Sérgio Raposo, José Victor Maniglia, Érika Cristina Pavarino, Eny Maria Goloni-Bertollo

Periódico: Carcinogenesis, a ser submetido para publicação.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Artigo 1

Título: Polymorphisms of the *CYP1A1* and *CYP2E1* genes in head and neck squamous cell carcinoma risk.

Autores: Nathália Moreno Cury, Anelise Russo, Ana Livia Silva Galbiatti, Mariângela Torreglosa Ruiz, Luiz Sérgio Raposo, José Victor Maniglia, Érika Cristina Pavarino-Bertelli, Eny Maria Goloni-Bertollo

Periódico: Molecular Biology Reports, publicado online.

Polymorphisms of the *CYP1A1* and *CYP2E1* genes in head and neck squamous cell carcinoma risk

Nathália Moreno Cury · Anelise Russo · Ana Lívia Silva Galbiatti ·
Mariângela Torreglosa Ruiz · Luiz Sérgio Raposo · José Victor Maniglia ·
Érika Cristina Pavarino · Eny Maria Goloni-Bertollo

Received: 25 November 2010 / Accepted: 4 May 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract Polymorphisms in genes that encode P450 cytochrome enzymes may increase carcinogen activation or decrease their inactivation and consequently, promote the development of cancer. The aims of this study were to identify the *MspI-CYP1A1*, *PstI-CYP2E1* and *DraI-CYP2E1* polymorphisms in patients with head and neck cancer and to compare with individuals without cancer; to evaluate the association of these polymorphisms with risk factors and clinical histopathological parameters. In the study group, 313 patients were evaluated for *CYP1A1*, 217 for *CYP2E1 (PstI)* and 211 for *CYP2E1 (DraI)* and in the control group 417, 334 and 374 individuals, respectively. Molecular analysis was performed by PCR-RFLP technique, and chi-square and multiple logistic regression tests were used for statistical analysis. The result of analysis regarding individuals evaluated for *CYP1A1 (MspI)* showed that age (OR: 8.15; 95% CI 5.57–11.92) and smoking (OR: 5.37; 95% CI 3.52–8.21) were predictors for the disease; for the *CYP2E1 (PstI and DraI)*, there were associations with age (*PstI*-OR: 9.10; 95% CI 5.86–14.14/

DraI-OR: 8.07; 95% CI 5.12–12.72), smoking (*PstI*-OR: 4.10; 95% CI 2.44–6.89/*DraI*-OR: 5.73; 95% CI 3.34–9.82), alcohol (*PstI*-OR: 1.93; 95% CI 1.18–3.16/*DraI*-OR: 1.69; 95% CI 1.02–2.81), respectively, with disease development. *CYP2E1 (PstI)* was less frequent in patient group (OR: 0.48; 95% CI 0.23–0.98). Regarding clinical histopathological parameters, *CYP1A1* polymorphism was less frequent in the larynx primary anatomic site (OR = 0.45; 95% CI = 0.28–0.73; $P = 0.014$). In conclusion, we confirm that age, smoking and alcohol consumption are risk factors for this disease and the polymorphisms investigated have no association with the development of head and neck cancer.

Keywords Head and neck squamous cell carcinoma · Polymorphism · *CYP1A1* and *CYP2E1* genes

Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) includes all malignancies located in the upper aero digestive tract mucosa being that 40% occur in the oral cavity, 15% in the pharynx, 25% in larynx and 20% in other locations (salivary glands, thyroid) [1]. The most common histological type is squamous cell carcinoma, which represents more than 90% of cases [2].

Smoking and alcohol habits are the main risk factors for this disease [2–5]. Studies show that many carcinogens contained in cigarettes and from the alcohol degradation are metabolized to active forms having deleterious effects on the body. These substances can cause oxidative reactions in tissues, and initiate reactions that produce free radicals in different cellular events. The presence of reactive oxygen can cause damage to proteins, carbohydrates,

N. M. Cury · A. Russo · A. L. S. Galbiatti ·
M. T. Ruiz · É. C. Pavarino · E. M. Goloni-Bertollo
Genetics and Molecular Biology Research Unit-UPGEM, São
José do Rio Preto Medical School (FAMERP), São José do Rio
Preto, SP, Brazil

L. S. Raposo · J. V. Maniglia
Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck
Surgery, São José do Rio Preto Medical School (FAMERP), São
José do Rio Preto, SP, Brazil

E. M. Goloni-Bertollo (✉)
Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de
São José do Rio Preto (FAMERP), Av. Brigadeiro Faria Lima,
5416, São José do Rio Preto, SP CEP 15090-000, Brazil
e-mail: eny.goloni@famerp.br

lipids and DNA, consequently resulting in mutagenesis and alterations in the cellular cycle [6].

Xenobiotic metabolism has two types of enzymes: mediated oxidative metabolism (Phase I), and enzyme conjugate (Phase II). Many compounds are converted to highly reactive metabolites by oxidative enzymes of Phase I, which are mainly enzymes of the cytochrome super family P-450 (CYP). These enzymes catalyze a variety of oxidation reactions and some reduction, involving thousands of substrates [7]. As a result, through the introduction of one or more hydroxyl groups on the substrate, a pro-carcinogen can become carcinogenic. On the other hand, Phase II reactions involve conjugation with endogenous substrates (glutathione, sulfate, glucose, acetate) by glutathione S-transferases (GSTs), UDP-glucuronosyltransferases and N-acetyltransferases (NATs), which act as inactivating enzymes of Phase I products, catalyze the conversion of the reactive electrophilic to inactive, water-soluble conjugates that can be easily removed [5].

Polymorphisms in genes encoding these enzymes may alter their expression or function, changing the activation or detoxification of carcinogenic compounds [8–11]. Therefore, it is likely that individuals with these polymorphisms have an increased cancer risk when exposed to carcinogens [12]. The review of Androtsopoulos et al. [13] showed that dietary constituents suppress cancer progression by inhibiting the CYP1A1-catalyzed metabolic activation and the CYP1A1 enzyme induction of carcinogens. It was confirmed by a recent *in vivo* investigations that suggest CYP1A1 may function as a carcinogen-detoxication enzyme, whereas the paradoxical activation of natural dietary compounds with chemopreventive activity provides further insight into the cancer protecting role of this enzyme [13]. Furthermore, simultaneous analysis of multiple polymorphic genes should be done to address the possibility of identifying gene–gene interactions. The results of such studies will allow us to estimate the relative contribution of individual genetic variations to overall HNSCC risk [5].

It has been observed that single-gene polymorphisms could affect treatment, whereas the coincidence of other gene mutations may increase the risk of human HNSCC development and this susceptibility [14, 15].

Studies of Gattas et al. [16], Liu et al. [17], Sreeja et al. [18] and Juárez-Cedillo et al. [19] confirmed an association with the risk increase for oral cancer related to *CYP1A1* and *CYP2E1* genes, esophagus cancer associated with the *CYP2E1* gene, lung cancer with *CYP1A1* gene, cervical cancer with *CYP1A1* gene, respectively, with polymorphisms evaluated in our study. While other studies of Gajeka et al. [20], Hildesheim et al. [21] showed no association of *CYP2E1* and *CYP1A1* genes and larynx cancer, *CYP2E1* gene and nasopharynx, respectively.

The aims of this study were to investigate the frequency of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *CYP1A1* (*MspI* polymorphism) and *CYP2E1* (*PstI* and *DraI* polymorphisms) genes in patients with HNSCC and to compare with a population of individuals without history of cancer, to evaluate the association between these polymorphisms and smoking and alcohol consumption, gender and age, and to evaluate the distribution of genotypes according to clinical histopathological parameters of HNSCC.

Patients and methods

The study was approved of by the Committee of Ethics in Research (CEP), Medical school of Sao Jose do Rio Preto (3342/2007) and the National Health Council—CONEP (5566/2005). We evaluated 730 samples, 313 patients with head and neck squamous cell carcinoma and 417 individuals without history of cancer for the *CYP1A1* polymorphism, 217 patients and 334 controls for *PstI* polymorphism and 211 patients and 374 controls for *DraI* polymorphism respectively, for the *CYP2E1* gene.

The case group included patients with head and neck squamous cell carcinoma from the Service of Otorhinolaryngology and Head and Neck Base Hospital, Medical School, Sao Jose do Rio Preto. The diagnosis was made from pathological specimens. The inclusion criterion was squamous cell carcinoma tumor cell types and the exclusion criterion was patients previously treated for tumors. The tumors were classified according to the primary anatomic site in oral cavity, pharynx and larynx, according to Lee [22] and the staging was performed according to the parameters of the International Union Control Cancer (IUC) and American Joint Committee for Cancer (AJCC) [23–25] on three criteria: tumor size (T), presence of regional lymph nodes involved (N) and presence of distant metastasis (M) [26].

The control group comprised of Brazilian blood donors without diagnoses of cancer according to government guidelines for donated blood that tests for 20 related diseases (<http://www.hemonline.com.br/portarias/rdc153/indexframe.htm>). The inclusion criteria was age greater than 40 years and the exclusion criteria was a family history of cancer.

Study participants were adults independent of gender, who agreed to participate in the research and signed an informed consent form. Demographic data of subjects (age, gender, smoking and alcohol consumption) were obtained from information provided by physicians and medical records. Smokers were defined as individuals who consumed at least 100 cigarettes during their lifetime, and alcohol consumers were those who drink more than four drinks per week [27, 28].

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using the technique of Miller and collaborators 1988, with modifications [29]. The investigation of the *CYP1A1* polymorphism in the 3' non-coding region of *CYP1A1*, is a polymorphic area for the restriction enzyme *MspI*. This polymorphism that results of the transition from thymine to cytosine poly (A) tail in the 3' non translated gene was investigated according to Arvanitis et al. [30]. For *CYP2E1* polymorphisms, a Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR–RFLP) technique was used with the *PstI* restriction enzyme for 1019 promoter region and *DraI* enzyme for polymorphism in intron 6 (7766). The first was related to increased levels of transcriptional activation of the gene with high expression of *CYP2E1* protein, while the second was associated with increased formation of DNA adducts [31, 32].

The Chi-square test was performed to verify whether genotype frequencies were in Hardy–Weinberg equilibrium (HWE). The multiple logistic regression test was used to determine the effect of variables on HNSCC risk. The model included age (reference <49 years; median), gender (reference: female), smoking habit (reference: non-smokers) and alcohol consumption (reference: non-drinkers).

The clinical histopathological parameters were also analyzed by a multiple logistic regression test. The T classification was divided in tumors with low extension (T1, T2) and high extension (T3, T4). The N classification was composed of lymph node involvement negative (N0) and positive (N1, N2, N3) [24, 26].

The results were presented in odds ratio (OR) and confidence interval of 95% (95% CI). *P* value less than or equal to 0.05 was considered significant for all analysis.

Results

The age median of the case group patients and control group was 49 years old. The case group showed a predominance of smokers of 84.34, 85.71, and 88.63% and alcohol consumers 70.29, 72.35, and 77.73% in the subgroup evaluated for *CYP1A1* (*MspI* polymorphism), *CYP2E1* (*PstI* polymorphism) and *CYP2E1* (*DraI* polymorphism), respectively. The control group showed 37.89, 45.81, and 41.44% smokers and 50.12, 49.10, and 51.87% alcohol consumers in the subgroup evaluated for *CYP1A1* (*MspI* polymorphism), *CYP2E1* (*PstI* polymorphism) and *CYP2E1* (*DraI* polymorphism), respectively.

The Hardy–Weinberg Equilibrium analysis showed that the genotype frequencies of *CYP1A1* and *CYP2E1* genes are in equilibrium in the patients (*CYP1A1*: $\chi^2 = 2.39$, $P = 0.12$; *CYP2E1*–*PstI* polymorphism: $\chi^2 = 0.36$, $P = 0.55$; *CYP2E1*–*DraI* polymorphism: $\chi^2 = 0.52$, $P = 0.47$). In the control group, the *CYP2E1* (*PstI* polymorphism) were in

equilibrium ($\chi^2 = 0.13$, $P = 0.72$). For the *CYP1A1* and *CYP2E1* polymorphisms (*DraI* polymorphism), the control group showed disequilibrium $\chi^2 = 6.55$, $P = 0.01$ and $\chi^2 = 5.09$, $P = 0.02$, respectively.

The multiple logistic regression analysis (adjusted for age, gender, smoking, alcohol and polymorphism) in the subgroup evaluated for *MspI* polymorphism showed that age over 49 years old (OR = 8.15; 95% CI 5.57–11.92; $P < 0.001$) and smoking (OR = 5.37; 95% CI 3.52–8.21; $P < 0.001$) were predictors for the disease. There was not significant difference between groups for gender (OR = 1.43; 95% CI 0.87–2.33; $P = 0.1543$), alcohol (OR = 1.38; 95% CI 0.90–2.09; $P = 0.1364$) and *MspI* genotypes (OR = 1.01; 95% CI 0.68–1.50; $P = 0.9522$) (Table 1).

Regarding the subgroup ($n = 217$) evaluated for *CYP2E1* (*PstI* polymorphism), age over 49 years (OR = 9.10; 95% CI 5.86–14.14; $P < 0.001$); smoking (OR = 4.10; 95% CI 2.44–6.89; $P < 0.001$) and alcohol (OR = 1.93; 95% CI 1.18–3.16; $P = 0.0084$) were predictors for the disease. We observed a low frequency of the C1C2 or C2C2 genotypes in the case group to 217 patients analyzed, (OR: 0.48; 95% CI 0.23–0.98; $P = 0.0449$) (Table 2), as well as to 174 patients genotyped in the analysis for *CYP1A1* (*MspI*), *CYP2E1* (*PstI*) e *CYP2E1* (*DraI*) polymorphisms together (OR: 0.41; 95% CI 0.18–0.96; $P = 0.039$) (Table 3).

The subgroup evaluated for *CYP2E1* (*DraI* polymorphism), age over 49 years (OR = 8.07; 95% CI 5.12–12.72; $P < 0.001$); smoking (OR = 5.73; 95% CI 3.34–9.82; $P < 0.0001$) and alcohol (OR = 1.69; 95% CI 1.02–2.81; $P = 0.00417$) were predictors for the disease (Table 4).

Regarding clinical histopathological parameters the *CYP1A1* polymorphism was less frequent in the larynx primary anatomic site (OR = 0.45; CI = 0.28–0.73; $P = 0.014$). We observed no significant association between other clinical histopathological parameters with the other polymorphisms (Table 5).

Discussion

This study confirms reports in the literature for HNSCC epidemiology, showing a higher frequency of this tumor type from the 5th decade of life and in the smokers and alcohol consumers [1, 3, 4, 33–35]. A multicenter study showed that cigarette smoking is a strong risk factor for HNSCC regardless of alcohol consumption [1, 3]. Alcohol, unlike smoking, is not genotoxic and has no tumorigenic effect in animals. However, this agent suppresses the removal of nitrosamine molecules of low molecular weight released by cigarettes in the liver and inhibiting several isoforms of the cytochrome P450 superfamily. Furthermore, there was an increase of nitrosamines to post-hepatic

Table 1 Distribution of demographic data, risk factors, *CYP1A1* (*MspI*) genotypes, and odds ratio (OR) for head and neck squamous cell carcinoma

Variables	Patients (<i>n</i> = 313) <i>n</i> (%)	Controls (<i>n</i> = 417) <i>n</i> (%)	OR (95% CI)	<i>P</i> -value
Age				
<49 years	63 (20.13)	115 (27.58)	1.00 (ref)	
>49 years	250 (79.87)	302 (72.42)	8.15 (5.57–11.92)	<0.0001
Gender				
Female	43 (13.74)	122 (29.26)	1.00 (ref)	
Male	270 (86.26)	295 (70.74)	1.43 (0.87–2.33)	0.1543
Smoking				
No	49 (15.65)	259 (62.11)	1.00 (ref)	
Yes	264 (84.35)	158 (37.89)	5.37 (3.52–8.21)	<0.0001
Alcohol				
No	93 (29.71)	208 (49.88)	1.00 (ref)	
Yes	220 (70.29)	209 (50.12)	1.38 (0.90–2.09)	0.1364
Genotype <i>CYP1A1</i>(<i>MspI</i>)				
wt/wt	207 (66.13)	262 (62.83)	1.00 (ref)	
wt/m1 + m1/m1	106 (33.87)	155 (37.17)	1.01 (0.68–1.50)	0.9522

The bold values indicate $P < 0.05$

Table 2 Distribution of demographic data, risk factors, *CYP2E1* (*PstI*) genotypes, and odds ratio (OR) for head and neck squamous cell carcinoma

Variables	Patients (<i>n</i> = 217) <i>n</i> (%)	Controls (<i>n</i> = 334) <i>n</i> (%)	OR (95% CI)	<i>P</i> -value
Age				
<49 years	43 (19.82)	244 (73.05)	1.00 (ref)	
>49 years	174 (80.18)	90 (26.95)	9.10 (5.86–14.14)	<0.0001
Gender				
Female	33 (15.21)	88 (26.35)	1.00 (ref)	
Male	184 (84.79)	246 (73.65)	0.99 (0.56–1.76)	0.9797
Smoking				
No	31 (14.29)	181 (54.19)	1.00 (ref)	
Yes	186 (85.71)	153 (45.81)	4.10 (2.44–6.89)	<0.0001
Alcohol				
No	60 (27.65)	170 (50.90)	1.00 (ref)	
Yes	157 (72.35)	164 (49.10)	1.93 (1.18–3.16)	0.0084
Genotype <i>CYP2E1</i> (<i>PstI</i>)				
C1C1	200 (92.17)	292 (87.43)	1.00 (ref)	
C1C2/C2C2	17 (7.83)	42 (12.57)	0.48 (0.23–0.98)	0.0449

The bold values indicate $P < 0.05$

tissues and an increase in DNA adduct formation, which can lead to cancer development [4, 36, 37].

Regarding gender, our study showed no significant association with HNSCC risk. Although the incidence of HNSCC among women in recent decades has been noted, many authors reported that males are still most affected by

such tumors [38, 39]. However, in our study the differences for gender were not significant.

In relation to age, the present study showed that age >49 years old was associated with HNSCC development. Salivary alterations related to oxidative stress may explain the high prevalence of oral cancer in the elderly. These

Table 3 Distribution of demographic data, risk factors, *CYP1A1* (*MspI*), *CYP2E1* (*PstI*) and *CYP2E1* (*DraI*) genotypes, and odds ratio (OR) for head and neck squamous cell carcinoma risk

Variables	Patients (n = 174) n (%)	Controls (n = 278) n (%)	OR (95% CI)	P-value
Age				
<49 years	29 (16.67)	201 (72.30)	1.00 (ref)	
≥49 years	145 (83.33)	77 (27.70)	8.89 (5.31–14.87)	<0.0001
Gender				
Female	27 (15.52)	67 (24.10)	1.00 (ref)	
Male	147 (84.48)	211 (75.90)	0.75 (0.38–1.49)	0.415
Smoking				
No	20 (11.50)	157 (56.47)	1.00 (ref)	
Yes	154 (88.50)	121 (43.53)	6.18 (3.31–11.52)	<0.0001
Alcohol				
No	44 (25.29)	140 (50.36)	1.00 (ref)	
Yes	130 (74.71)	138 (49.64)	1.86 (1.06–3.26)	0.030
Genotype <i>CYP1A1</i> (<i>MspI</i>)				
wt/wt	121 (69.54)	167 (60.07)	1.00 (ref)	
wt/m1 + m1/m1	53 (30.46)	111 (39.93)	0.84 (0.50–1.40)	0.496
Genotype <i>CYP2E1</i> (<i>PstI</i>)				
C1C1	160 (91.95)	242 (87.05)	1.00 (ref)	
C1C2/C2C2	14 (8.05)	36 (12.95)	0.41 (0.18–0.96)	0.039
Genotype <i>CYP2E1</i> (<i>DraI</i>)				
DD	144 (82.76)	227 (81.65)	1.00 (ref)	
DC/CC	30 (17.24)	51 (18.35)	1.27 (0.65–2.50)	0.480

The bold values indicate $P < 0.05$

Table 4 Distribution of demographic data, risk factors, *CYP2E1* (*DraI*) genotypes, and odds ratio (OR) for head and neck squamous cell carcinoma

Variables	Patients (n = 211) n (%)	Controls (n = 374) n (%)	OR (95% CI)	P-value
Age				
<49 years	35 (16.59)	263 (70.32)	1.00 (ref)	
>49 years	176 (83.41)	111 (29.68)	8.07 (5.12–12.72)	<0.0001
Gender				
Female	30 (14.22)	97 (25.94)	1.00 (ref)	
Male	181 (85.78)	277 (74.06)	1.00 (0.54–1.82)	0.9896
Smoking				
No	24 (11.37)	219 (58.56)	1.00 (ref)	
Yes	187 (88.63)	155 (41.44)	5.73 (3.34–9.82)	<0.0001
Alcohol				
No	47 (22.27)	180 (48.13)	1.00 (ref)	
Yes	164 (77.73)	194 (51.87)	1.69 (1.02–2.81)	0.00417
Genotype <i>CYP2E1</i> (<i>DraI</i>)				
DD	172 (81.52)	294 (78.61)	1.00 (ref)	
DC/CC	39 (18.48)	80 (21.39)	0.78 (0.46–1.32)	0.3545

The bold values indicate $P < 0.05$

Table 5 Distribution of clinical histopathological parameters in head and neck squamous cell carcinoma patients

Clinical characteristics	<i>CYP1A1</i> Gene OR (95% CI), <i>P</i> value	<i>CYP2E1(PstI)</i> Gene OR (95% CI), <i>P</i> value	<i>CYP2E1(DraI)</i> Gene OR (95% CI), <i>P</i> value
Primary anatomic site			
Oral cavity	0.80 (0.49–1.31); 0.38	1.79 (0.43–3.24); 0.75	1.52 (0.74–3.11); 0.25
Pharynx	1.02 (0.59–1.79); 0.94	1.35 (0.45–4.11); 0.59	0.88 (0.39–1.95); 0.77
Larynx	0.45 (0.28–0.73); 0.014	0.93 (0.31–2.79); 0.90	0.75 (0.34–1.68); 0.49
Tumor extension			
T1/T2	Reference	Reference	Reference
T3/T4	0.94 (0.57–1.55); 0.83	0.50 (0.16–1.53); 0.22	0.55 (0.25–1.19); 0.13
N* involvement			
No	Reference	Reference	Reference
Yes	1.13 (0.68–1.88); 0.63	1.17 (0.39–3.53); 0.78	1.87 (0.87–4.00); 0.11

* *N* regional lymph node

The bold values indicate $P < 0.05$

changes prevent the salivary antioxidant system from exerting its protective function, allowing compounds and reactive oxygen species (ROS) and nitrogen generated through the consumption of alcohol and smoking that act in the oral cavity [40].

ROS production can be promoted by a high glucose diet (HGD) that results in the increased gene expressions involved in fatty acid oxidation in peroxisome as *CYP2E1* and other cytochrome P450 family genes [41]. Experiments for carcinogenesis in animals have shown that repeated damage of the lining of the primary tumor area may increase the process of growth of cancer cells and reduce the latency period [1].

We did not find a significant interaction between *CYP1A1* polymorphism and HNSCC risk. The studies of Gajecka et al. [20], Gronau et al. [42], Buch et al. [43], Singh et al. [44] also showed no association of this polymorphism with HNSCC. However, other studies showed an association of this polymorphism with increased risk for lung cancer [18, 45–48], cervical cancer [19, 49] and oral cancer [50].

A meta-analysis performed by Vineis and collaborators [48] found a clear association between Caucasian individuals homozygous for the polymorphic allele (m1/m1) and the risk of lung cancer after adjusting for age and gender. Goodman et al. [49] found that cervical cancer was also associated with the *CYP1A1 MspI* polymorphism, and that the disease in homozygous women for the *CYP1A1 MspI* polymorphic allele (m1/m1) presented a risk of 3.4 times higher compared to women homozygous for the wild-type allele (wt/wt) [48, 49]. In another study, women with m1/m1 genotype had an increased risk (8.3 times) of cervical cancer developing compared to women with wt/wt genotype. However, when the smoking habit was considered,

smokers female with m1/m1 genotype had an increased risk of 19.4 times for cancer cervical [19].

In relation to oral cancer, Cha et al. [50] related the presence of the *CYP1A1* (wt/wt) genotype with increased risk for oral cancer regardless of smoking behavior in Korean populations [50].

The *CYP1A1* gene located on chromosome 15q 22–24, encodes an enzyme aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH), whose transcription, is induced by many environmental agents having differential expression between cell types, and encodes the P450-1A1 enzyme, that catalyzes the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and phenolic “epóxido” products [51]. The pattern of activity and induction capacity of this enzyme in humans, related to the formation of metabolites of PAHs can react with the DNA molecule and is, therefore, of great importance for estimating the risk of developing cancer [52].

Regarding for *CYP2E1-PstI* polymorphism we observed a low frequency of the C1C2 or C2C2 genotypes in the case group to 217 patients analyzed, (OR: 0.48; 95% CI 0.23–0.98; $P = 0.0449$), as well as to 174 patients genotyped for the analysis of *CYP1A1 (MspI)*, *CYP2E1 (PstI)* e *CYP2E1 (DraI)* polymorphisms together (OR: 0.41; 95% CI 0.18–0.96 $P = 0.039$). On the other hand, literature data showed that C1C2 genotype of *CYP2E1* may increase risk for upper aerodigestive tract cancer [53] and for oral cancer [16, 34, 54, 55, 56] compared with the C1C1 genotype.

Studies of the Hildesheim et al. [21], Hildesheim et al. [57] and Konguttannachok et al. [58] in nasopharyngeal carcinoma, Gonzales et al. [59] in the head and neck cancer, suggested that the C2/C2 genotype may increase risk for HNSCC. Gao et al. [60], also found that the *CYP2E1-PstI* variant increases colorectal cancer susceptibility.

For *CYP2E1* (*DraI* polymorphism), we found no association between this polymorphism and HNSCC risk. Consistent with our study, other studies also showed no relation of this polymorphism with larynx cancer [20] and nasopharynx cancer [21, 57]. However, Sugimura et al. [61] associated *CYP2E1-DraI* (CC vs DD) with oral cavity cancer. Other studies also showed an association between the *DraI* polymorphic genotypes and oral cancer risk [16, 55, 56].

Some studies confirmed an association of both polymorphisms of the *CYP2E1* gene. Bouchardy et al. [62] showed that *CYP2E1* (*PstI* polymorphism) and *CYP2E1* (*DraI* polymorphism) were associated with increased risk for upper aerodigestive tract cancer. In esophagus squamous cell, an increased risk was observed for individuals with *CYP2E1* C1C2 genotype (*PstI* polymorphism) and *CYP2E1* wide genotype (DD) (*DraI* polymorphism) [17]. Agulnik et al. [63], who evaluated haplotypes, observed a high frequency of C1C1 haplotype (*PstI*)/DC(*DraI*) for *CYP2E1* gene in HNSCC patients, which may reflect the deleterious effect of these alleles.

The *CYP2E1* gene located on chromosome 10q24-3-pter, encodes a product (dimetil nitrosamina desmetilase) involved in oxidative metabolism of ethanol, and numerous environmental carcinogens such as hydrophilic compounds of low molecular weight, benzene, vinyl chloride and nitrosamines, including the NNK (4-metilnitrosamino-1-3-butanone piridyl) found in cigarette smoke. The enzymatic expression of the *CYP2E1* gene is dramatically enhanced by ethanol and exposure to cigarette smoke and benzene and is associated with lung cancer and liver cancer [64].

For clinical histopathological parameter analysis, our study showed an association of *CYP1A1* *MspI* polymorphism was less frequent in the larynx. We found no association with tumor extension and lymph node involvement. Different from Matthias et al. [65], who associated the *PstI* polymorphism of the *CYP2E1* gene with T1 and T2 tumors.

In conclusion, it was possible to establish an association between polymorphic genotypes and the low frequency in the study group for the *CYP2E1* *PstI* polymorphism. Age, smoking and alcohol consumption are risk factors for HNSCC. The *CYP1A1* *MspI* polymorphism are less frequent in the larynx. The identification of the association of these polymorphisms with the head and neck carcinoma development and its relation to response to carcinogens may help understand the mechanisms involved in the neoplastic process and the prevention strategies for this disease.

Acknowledgments The authors are grateful to participation of the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico-CNPq for their support and FAMERP/FUNFARME in this study.

References

- Ragin CC, Modugno F, Gollin SM (2007) The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res* 86:104
- Olivieri EHR, da Silva SD, Mendonça FF, Urata YN, Vidal DO, Faria MAM et al (2009) *CYP1A2*1C*, *CYP2E1*5B*, and *GSTM1* polymorphisms are predictors of risk and poor outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 45(9): 73–79
- Curado MP, Hashibe M (2009) Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 21:194–200
- Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP et al (2008) Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of HNSCC: pooled analysis in the international HNSCC epidemiology consortium. *J Natl Cancer Inst* 99(10):777–789, 2007. Erratum in: *J Natl Cancer Inst* 100(3):225
- Hiyama T, Yoshihara M, Tamaka S, Chayama K (2008) Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk. *Int J Oncol* 32: 945–973
- Zain RB (2007) Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer—a brief overview. *Oral Oncol* 37:205–210
- Guengerich FP (2007) Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: minireview. *J Biochem Mol Toxicol* 21(4):163–168
- Abbas A, Delvinquié K, Lechevreil M, Lebailly P, Gauduchon P, Launoy G et al (2004) *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *CYP1A1* genetic polymorphisms and susceptibility esophageal cancer in French population: Different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 23:3389–3393
- Evans AJ, Henner WD, Eilers KM, Montalto MA, Wersinger EM, Andersen PE et al (2004) Polymorphisms of *GSTT1* and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck* 26:63–70
- Liu S, Park JY, Schantz SP, Stern JC, Lazarus P (2001) Elucidation of *CYP2E1* 5' regulatory RsaI/PstI allelic variants and their role in risk of oral cancer. *Oral Oncol* 37:437–445
- Harth V, Schäfer M, Abel J, Maintz L, Neuhaus T, Besuden M et al (2008) Head and neck squamous-cell cancer and its association with polymorphic enzymes of xenobiotic metabolism and repair 2. *J Toxicol Environ Health* 71:887–897
- Wunsch A, Ahda Y, Banaz-YaSar F, Sonntag B, Nieschlag E, Simoni M et al (2005) Single-nucleotide polymorphisms in the promoter region influence the expression of the human follicle-stimulating hormone receptor. *Fertil Steril* 84(2):446–453
- Androtsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA (2009) Cytochrome P450 *CYP1A1*: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer* 9:187
- Rusin P, Marciewicz L, Majsterek I (2008) Genetic predeterminations of head and neck cancer. *Postepy Hig Med Dosw* 62: 490–501
- Božina N, Bradamante V, Lovrić M (2009) Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (Cyp) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh Hig Rada Toksikol* 60:217–242
- Gattas GJF, de Carvalho MB, Siraque MS, Curioni OA, Kohler P, Eluf-Neto J et al (2006) Genetic polymorphisms of *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, and *GSTT1* associated with head and neck cancer. *Head Neck* 28:819–826
- Liu R, Yin LH, Pu YP (2007) Association of combined *CYP2E1* gene polymorphism with the risk for esophageal squamous cell

- carcinoma in Huai'an population, China. *Chin Med J* 120: 1797–1802
18. Sreeja L, Syamala V, Hariharan S, Madhavan J, Devan SC, Ankathil R (2005) Possible risk modification by *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* gene polymorphisms in lung cancer susceptibility in a South Indian population. *J Hum Genet* 50:618–627
 19. Juárez-Cedillo T, Vallejo M, Fragoso JM, Hernández-Hernández DM, Rodríguez-Pérez JM, Sánchez-García S et al (2007) The risk of developing cervical cancer in Mexican women is associated to *CYP1A1 MspI* polymorphism. *Eur J Cancer* 43(10):1590–1595
 20. Gajicka M, Rydzanicz M, Jaskula-Sztul R, Kujawski M, Szyfter W, Szyfter K (2005) *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *NAT2*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms or their combinations are associated with the increased risk of the laryngeal squamous cell carcinoma. *Mutat Res* 574:112–123
 21. Hildesheim A, Anderson LM, Chen CJ, Cheng YJ, Brinton LA, Daly AK et al (1997) *CYP2E1* genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J Natl Cancer* 89:1207–1212
 22. Lee KJ (2003) Essential otorhinolaryngology. *Head Neck Surg* 8:1136
 23. Liu CJ, Chang CS, Lui MT, Dang CW, Shih YH, Chang KW (2005) Association of *GST* genotypes with age of onset and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 54:475–481
 24. Instituto Nacional do Câncer. UICC—União Internacional Contra o Câncer, 2002—TNM—Classificação de Tumores Malignos 6^o. Edição. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA 2004
 25. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M (2002) *AJCC Cancer Staging Manual*, 6th ed. New York, Springer
 26. Sobin LH, Wittekind CH (2000) *International union against cancer: TNM classification of malignant tumours*, 6th edn. Wiley, New York
 27. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang M-J, Jen J et al (2000) Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of *p53* mutations in nonsmall cell lung cancer. *Cancer Res* 60:3155–3159
 28. Kjaerheim K, Gaard M, Andersen A (1998) The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancers: a prospective study of 10,900 Norwegian men. *Cancer Causes Control* 9(1):99–108
 29. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215
 30. Arvanitis DA, Goumenou AG, Matalliotaski IM, Koumantaski EE, Spandidos DA (2001) Low penetrance genes are associated with increased susceptibility to endometriosis. *Fertil Steril* 76:1202
 31. Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Hoover RN, Trump BF, Sugimura H et al (1992) *Cytochrome P450H1E1* genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res* 52:6712–6715
 32. Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Karjalainen A, Antilla S, Vainio H (1993) The human *CYP2E1* gene and lung cancer: DraI and RsaI restriction length polymorphisms in a Finnish study population. *Carcinogenesis* 14:85–88
 33. Goldstein DP, Irish JC (2005) Head and neck squamous cell carcinoma in the young patient. *Curr Opin Otolaryngol & Head Neck Surg* 13:207–211
 34. Marques CFS, Koifman S, Koifman RJ, Boffetta P, Brennan P, Hatagima A (2006) Influence of *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM3* and *NAT2* genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: results from a case-control study in Rio de Janeiro. *Oral Oncol* 42:632–637
 35. Galbiatti AL, Ruiz MT, Rezende Pinto D, Raposo LS, Maníglia JV, Pavarino-Bertelli EC et al. (2010) *A80G* polymorphism of reduced folate carrier 1 (*RFC1*) gene and head and neck squamous cell carcinoma etiology in Brazilian population. *Mol Biol Rep*. doi:10.1007/s11033-010-0204-1
 36. Boffetta P, Hashibe M (2006) Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 7:149–156
 37. Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C (2008) Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral Oncol* 41:244–260
 38. Dedivitis RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV (2004) Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Ver Bras Otorhinolaryngol* 70:35–40
 39. Lung T, Tascou OC, Almasan HA, Muresan O (2007) Head and neck cancer, epidemiology and histological aspects Part 1: A decade's result 1993–2002. *J Craniomaxillofac Surg* 35:120–125
 40. Hershkovich O, Shafat I, Nagler RM (2007) Age-related changes in salivary antioxidant profile: possible implications for oral cancer. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62:361–366
 41. Du D, Shi YH, Le GW (2010) Oxidative stress induced by high-glucose diet in liver of C57BL/6 J mice and its underlying mechanism. *Mol Biol Rep* 37:3833–3839
 42. Gronau S, Koing-Greger D, Jerg M, Riechelmann H (2003) Gene polymorphisms in detoxification enzymes as susceptibility factor for head and neck cancer? *Otorhinolaryngol Head Neck Surg* 5:674–680
 43. Buch SC, Nazar-Stewart V, Weissfeld JL, Romkers M (2008) Case-control study of oral and oropharyngeal cancer in whites and genetic variation in eight metabolic enzymes. *Head Neck* 30:1139–1147
 44. Singh AP, Shah PP, Ruwali M, Mathur N, Pant MC, Parmar D (2009) Related articles polymorphism in cytochrome P4501A1 is significantly associated with head and neck cancer risk. *Cancer Invest* 27(8):869–876
 45. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, Shinoda N, Watanabe J (1999) Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the *cytochrome P4501A1* gene. *FEBS Lett* 263:131–133
 46. Houlston RS (2000) *CYP1A1* polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis. *Pharmacogenetics* 10(2):105–114
 47. Taioli E, Gaspari L, Benhamou S, Boffetta P, Brockmoller J, Butkiewicz D et al (2003) Polymorphisms in *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* and lung cancer below the age of 45 years. *Int J Epidemiol* 32:60–63
 48. Vineis P, Veglia F, Benhamou S, Butkiewicz D, Cascorbi I, Clapper ML et al (2003) *CYP1A1* T3801 C polymorphism and lung cancer: a pooled analysis of 2451 cases and 3358 controls. *Int J Cancer* 104:650–657
 49. Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B et al (2001) *CYP1A1*, *GSTM1*, and *GSTT1* polymorphisms and the risk of cervical squamous intraepithelial lesions in a multiethnic population. *Gynecol Oncol* 81:263–269
 50. Cha I-H, Park JY, Chung W-Y, Choi M-A, Kim H-J, Park K-k (2007) Polymorphisms of *CYP1A1* and *GSTM1* genes and susceptibility to oral cancer. *Yonsei Med J* 48:233–239
 51. Leichsenring A, Losi-Guembarovski R, Maciel ME, Losi-Guembarovski A, Oliveira BW, Ramos G et al (2006) *CYP1A1* and *GSTP1* polymorphisms in an oral cancer case-control study. *Braz J Med Biol Res* 39(12):1569–1574
 52. Bergheim I, Wolfgarten E, Bollschweiler E, Hölscher AH, Bode C, Parlesak A (2007) Cytochrome P450 levels are altered in patients with esophageal squamous-cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 13(7):997–1002
 53. Matthias C, Jahnke V, Jones PW, Hoban PR, Alldersea JE, Worrall SF et al (1999) Cyclin D1, glutathione S-transferase, and cytochrome P450 genotypes and outcome in patients with upper aerodigestive tract cancers: assessment of the importance of individual genes using multivariate analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:815–823
 54. Katoh T, Kaneko S, Kohshi K, Munaka M, Kitagawa K, Kunugita N et al (1999) Genetic polymorphisms of tobacco and alcohol-

- related metabolizing enzymes and oral cavity cancer. *Int J Cancer* 83:606–609
55. Neuhaus T, Ko YD, Lorenzen K, Fronhoffs S, Harth V, Bröde P et al (2004) Association of *cytochrome P450 2E1* polymorphisms and head and neck squamous cell cancer. *Toxicol Lett* 151:273–282
 56. Boccia S, Cadoni G, Sayed-Tabatabaei FA, Volante M, Arzani D, Lauretis A (2008) *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *EPHX1* exons 3 and 4, and *NAT2* polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 134:93–100
 57. Hildesheim A, Chen CJ, Caporaso NE, Cheng YJ, Hoover RN, Hsu MM et al (1995) *Cytochrome P4502E1* genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma: results from a case-control study conducted in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4:607–610
 58. Kongruttanachok N, Sukdikul S, Setavarin S, Kerekhjanarong V, Supiyaphun P, Voravud N et al (2001) *Cytochrome P450 2E1* polymorphism and nasopharyngeal carcinoma development in Thailand: a correlative study. *BMC Cancer* 1:4
 59. Gonzalez MV, Alvarez V, Pello MF, Menendez MJ, Suarez C, Coto E (1998) Genetic polymorphism of *N-acetyltransferase-2*, *glutathione S-transferase-M1*, and *cytochromes P450IIE1* and *P450IID6* in the susceptibility to head and neck cancer. *J Clin Pathol* 51:294–298
 60. Gao CM, Takezaki T, Wu JZ, Chen MB, Liu YT, Ding JH et al (2007) *CYP2E1 Rsa I* polymorphism impacts on risk of colorectal cancer association with smoking and alcohol drinking. *World J Gastroenterol* 13:5725–5730
 61. Sugimura T, Kumimoto H, Tohnai I, Fukui T, Matsuo K, Tsurusako S et al (2006) Gene-environment interaction involved in oral carcinogenesis: molecular epidemiological study for metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *J Oral Pathol Med* 35:11–18
 62. Bouchard C, Hirvonen A, Coutelle C, Ward PJ, Dayer P, Benhamou S (2000) Role of alcohol dehydrogenase 3 and cytochrome P-450E1 genotypes in susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract. *Int J Cancer* 87:734–740
 63. Agulnik M (2007) Malignancies of head and neck: the role for molecular targeted agents. *Expert Opin Ther Targets* 11(2):207–217
 64. Stewart BM, Kleihues P (2003) World cancer report. IARC Press, Lyon
 65. Matthias C, Bockmuhl U, Jahnke V, Jones PW, Hayes JD, Alldersea J et al (1998) Polymorphism in cytochrome P450 *CYP2D6*, *CYP1A1*, *CYP2E1* and glutathione S-transferase, *GSTM1*, *GSTM3*, *GSTT1* and susceptibility to tobacco-related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers. *Pharmacogenetics* 8:91–100

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Artigo 2

Título: Análise dos polimorfismos *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.

Autores: Anelise Russo, Pamela Risardi Francelin, Marianna Angelo Palmejani, Aline Maria de Vita Marques, Ana Livia da Silva Galbiatti, Lidia Maria Rebolho Batista da Silva, Mariângela Torreglosa Ruiz, José Victor Maniglia, Luis Sérgio Raposo, Érika Cristina Pavarino, Eny Maria Goloni-Bertollo

Periódico: Brazilian Journal of Otorhinolaryngology (BJORL)

Análise dos polimorfismos *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço

Anelise Russo¹, Pamela Risardi Francelin², Marianna Angelo Palmejani³, Aline Maria de Vita Marques², Ana Livia da Silva Galbiatti¹, Lidia Maria Rebolho Batista da Silva¹, Mariângela Torreglosa Ruiz⁴, José Victor Maniglia⁵, Luis Sérgio Raposo⁵, Érika Cristina Pavarino⁶, Eny Maria Goloni-Bertollo⁶

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – FAMERP, Unidade de Pesquisa em Biologia Molecular e Genética – UPGEM, bolsista CAPES.

² Acadêmica do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, bolsista CNPq – IC.

³ Acadêmica do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, bolsista FAPESP – IC.

⁴ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – FAMERP, Unidade de Pesquisa em Biologia Molecular e Genética – UPGEM, bolsista FAPESP.

⁴ Doutora em Ciências Biológicas, Bióloga – UPGEM – FAMERP.

⁵ Professor Adjunto, Livre-docente, Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço – FAMERP.

⁶ Professor Adjunto, Livre-docente, Departamento de Biologia Molecular, Livre-Docente da Disciplina de Genética – FAMERP.

Resumo

Introdução: O câncer de cabeça e pescoço é responsável por significativa morbimortalidade, corresponde à sexta causa de morte por câncer no mundo, e é um dos tumores mais prevalentes no Brasil. As variações de ativação e detoxificação de compostos químicos na metabolização de xenobióticos estão envolvidas na tumorigênese, assim como, polimorfismos em genes da superfamília de enzimas glutathione S-transferase, que atuam na fase II desta via metabólica. **Objetivo:** Investigar a frequência dos polimorfismos *GSTP1* A313G (rs1695) e *GSTP1* C341T (rs1138272) em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (grupo caso) e comparar com indivíduos sem história de neoplasia (grupo controle); avaliar a associação destes polimorfismos com os fatores de risco e as características histopatológicas do tumor. **Casuística e Métodos:** Foram incluídos 783 indivíduos, 264 pacientes e 519 controles. A análise molecular foi realizada pela técnica PCR-RFLP. Para a análise estatística foi utilizado o teste Qui-quadrado e a Regressão Logística Múltipla. **Resultados:** Os resultados mostraram que idade ≥ 48 anos (OR=12,37; IC 95% 7,89-19,38; $p < 0,0001$), tabagismo (OR=4,21; IC 95% 2,71-6,55; $p < 0,0001$) e etilismo (OR=1,65; IC 95% 1,07-2,55; $p = 0,023$) foram fatores preditores para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço, embora o polimorfismo *GSTP1* A313G foi mais freqüente nos indivíduos controles (OR=0,61; IC 95% 0,42-0,90; $p = 0,013$). Os parâmetros histopatológicos clínicos não foram associados à presença dos polimorfismos avaliados. **Conclusão:** Em conclusão, a presença da variante *GSTP1* A313G está associada à diminuição do risco para câncer de cabeça e pescoço e idade ≥ 48 anos, gênero masculino e hábitos tabagista e etilista estão associados com o risco aumentado para o desenvolvimento desta doença.

Palavra chave: Câncer de cabeça e pescoço, polimorfismo genético, *GSTP1*.

Abstract

Introduction: Head and neck cancer is responsible for significant morbidity and mortality, represents the sixth leading cause of cancer death worldwide, and is one of the most prevalent tumor in Brazil. Variations of activation and detoxification of chemical compounds in the xenobiotics metabolism are involved in tumorigenesis, even as polymorphisms in genes of the glutathione S-transferase superfamily, which act in phase II of this metabolic pathway. **Aim:** To investigate the frequency of *GSTP1* polymorphisms A313G (rs1695) and C341T *GSTP1* (rs1138272) in patients with head and neck cancer (case group) and compare with subjects with no history of cancer (control group) to evaluate the association between these polymorphisms and the risk factors and the histopathologic characters of the tumor. **Methods:** Were included 783 individuals, 264 patients and 519 controls. Molecular analysis was performed by PCR-RFLP. For statistical analysis we used the chi-square and multiple logistic regression. **Results:** Results showed that age \geq 48 years (OR=12,37; IC 95% 7,89-19,38; $p<0,0001$), smoking (OR=4,21; IC 95% 2,71-6,55; $p<0,0001$) and alcoholism (OR=1,65; IC 95% 1,07-2,55; $p=0,023$) were predictors for the development of cancer of the head and neck, while the *GSTP1* A313G polymorphism was more frequent in control individuals (OR=0,61; IC 95% 0,42-0,90; $p=0,013$). The clinical pathological parameters were not associated with the presence of the polymorphisms studied. **Conclusion:** In conclusion, the presence of *GSTP1* A313G variant is associated with decreased risk for head and neck cancer and age \geq 48 years, male gender and tobacco and alcohol consumption are associated with increased risk for developing this disease.

Keyword: head and neck cancer, genetic polymorphism, *GSTP1*.

Introdução

A denominação câncer de cabeça e pescoço refere-se a um conjunto de tumores do trato aerodigestivo superior, representado pela cavidade oral, faringe e laringe¹. O câncer da cavidade oral está entre as dez neoplasias mais frequentes no Brasil². Os principais fatores de risco para o câncer de cabeça e pescoço são tabagismo e o etilismo^{3,4}. Porém, a magnitude do risco conferido pela interação entre álcool e tabaco não é clara. Além disso, ainda não é conhecido se essas interações diferem por sítio de lesão, gênero, idade ou região geográfica⁵.

Na metabolização de xenobióticos a superfamília das glutathione S-transferases (*GSTs*) de detoxificação enzimática, composta por quatro principais genes: *GSTA* (alpha), *GSTT1* (theta) *GSTM1* (mu), and *GSTP1* (pi), além das variantes kappa e sigma^{6,7} estão envolvidas na fase II e são responsáveis por catalisarem a conjugação de xenobióticos à glutathione⁸⁻¹¹.

Polimorfismos genéticos existentes nos genes que codificam as *GSTs* modulam a ação dessas enzimas, pois estão associados à falta ou a redução da atividade enzimática sobre vários substratos, incluindo aqueles encontrados no tabaco^{6,12}. Variações em genes que codificam as enzimas *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* foram associadas com o desenvolvimento do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço^{11,13,14}.

O gene *GSTP1* está localizado na região cromossômica 11q18 e codifica uma enzima expressa em tecidos da placenta, baço, coração e pulmão. Seus polimorfismos estão associados a diversos tipos de cânceres, incluindo bexiga, testículos, próstata, pulmão e cabeça e pescoço^{15,16}. Esse gene é responsável por metabolizar carcinógenos relacionados ao tabaco e eliminar os produtos oxidativos da timidina, uracil propenal e

benzopireno, após indução da metabolização de tais compostos carcinogênicos pelo citocromo P450^{7,17}.

Os polimorfismos *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T resultam nas variações Ile105Val e Ala114Val, respectivamente, e podem ocasionar diferenças significativas na atividade enzimática, resultando em níveis alterados de adutos de DNA e aumento de risco para o câncer^{7,18}. Frequências aumentadas dos polimorfismos *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T foram observadas em pacientes com carcinoma espinocelular de esôfago quando comparados à população controle^{17,19}. Contudo, segundo Singh *et al.* (2008) a presença de pelo menos um alelo polimórfico *GSTP1* A313G está associada à diminuição do risco de HNSCC¹². Além disso, um aumento da frequência do alelo selvagem deste polimorfismo foi observada por Jain *et al.* (2006) em pacientes com câncer de esôfago⁷ e a combinação do genótipo selvagem 313AA de *GSTP1* com genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* foi associada a aumento de quatro vezes no risco para desenvolver HNSCC¹². Um papel protetor para o câncer de pulmão foi associado à presença do polimorfismo *GSTP1* A313G²⁰.

O objetivo deste trabalho foi analisar a frequência dos polimorfismos *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e comparar com indivíduos sem história de neoplasia; e avaliar a distribuição destes genótipos de acordo com os parâmetros histopatológicos do carcinoma de cabeça e pescoço.

Casuística e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (3342/2007). Neste trabalho foram analisados 783 indivíduos, 264 pacientes com câncer de cabeça e pescoço atendidos no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base / Faculdade de Medicina de São José

do Rio Preto e 519 indivíduos sem história de neoplasia provenientes do Hemocentro / IES (Instituição de Ensino Superior) Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Todas as amostras foram obtidas após consentimento livre e esclarecido de todos os participantes. Foram analisados o perfil sociodemográfico desses pacientes (gênero, idade) e sua exposição a fatores de risco (tabagismo e etilismo). Foram considerados tabagistas indivíduos que consomem cerca de 100 cigarros durante toda a vida e etilista aqueles que bebem mais que quatro drinques por semana^{21,22}.

Nos pacientes, foram analisados os sítios primários de ocorrência do tumor e os tumores foram classificados de acordo com os parâmetros da *Union International Control Cancer* (IUCC), 2002 e *American Joint Committee for Cancer* (AJCC), 2002, em três critérios: tamanho do tumor (T), presença de linfonodos regionais comprometidos (N) e presença de metástase à distância (M)^{23,24}.

O grupo controle foi constituído de indivíduos sem história de neoplasia, provenientes do Hemocentro da mesma IES, doadores de sangue, de acordo com o protocolo de doadores de sangue são excluídas a presença de 20 doenças crônicas, o que reforça um grupo controle de indivíduos saudáveis. A lista das doenças crônicas analisadas está disponível no site <http://www.hemonline.com.br/portarias/rdc153/indexframe.htm>. Além disso, o critério de exclusão por ausência de neoplasias foi realizado pela coleta da história da genealogia. O critério de inclusão foi idade acima de 40 anos para aproximar a idade do grupo caso.

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue periférico segundo Miller *et al.*, (1988), com modificações²⁵. Para a análise molecular dos polimorfismos foi realizada a técnica de amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase –

Polimorfismos de Comprimentos de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP). Foram utilizados *primers* complementares para a região próxima ao códon polimórfico 313 localizado no éxon 5 do gene *GSTP1* (*primer sense* 5' – ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA – 3'; *primer antisense* 5' – TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT – 3') e para a região próxima ao códon polimórfico 341 localizado no éxon 6 do gene *GSTP1* (*primer sense* 5' – GTA GTT TGC CCA AGG TCA AG – 3'; *primer antisense* 5' – AGC CAC CTG AGG GGT AAG – 3') para realizar a amplificação dos fragmentos de interesse. O produto amplificado foi submetido a restrição da enzima *Bsm*I para o polimorfismo A313G, segundo Harries *et al.* (1997), com modificações²⁶, e para o polimorfismo C341T foi utilizada a enzima de restrição *Ac*iI de acordo com Watson *et al.* 1998, com modificações²⁷. Após a digestão enzimática cada polimorfismo gerou distintos fragmentos de restrição para cada genótipo (Tabela 1).

O teste Qui-quadrado foi utilizado para verificar se a frequência genotípica está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). O teste de Regressão Logística Múltipla foi usado para determinar o efeito das variáveis no risco para HNSCC, o qual incluiu a idade (referência: < 48 anos, mediana dos dois grupos), gênero (referência: feminino), hábito tabagista (referência: não fumantes), hábito etilista (referência: não etilistas), polimorfismo *GSTP1* A313G (referência: 313AA) e polimorfismo *GSTP1* C341T (referência: 341CC). Também foi realizada a análise dos genótipos combinados, considerando os genótipos selvagens como referência (*GSTP1* 313AA / *GSTP1* 341CC).

Os parâmetros histopatológicos também foram analisados por regressão logística múltipla. A classificação T foi dividida em tumores com pequena extensão (T1, T2) e com grande extensão (T3, T4). A classificação N foi dicotomizada em

comprometimento de linfonodos negativo (N0) e positivo (N1, N2, N3)^{23,24}. A classificação M foi dividida em M0 como ausência de metástase e M1 como presença de metástase. Os estádios foram divididos em precoce (T1, T2, N0, M0) e categoria avançada da doença (T3, T4, N2-3, M1).

Os resultados foram apresentados em odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC – 95%). O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p \leq 0,05$).

Resultados

A análise de Hardy-Weinberg mostrou que as frequências genotípicas estavam em equilíbrio no grupo caso (*GSTPI* A313G: $X^2=0,52$, $p=0,46$ and *GSTPI* C341T: $X^2=0,05$, $p=0,82$) e no grupo controle (*GSTPI* A313G: $X^2=0,80$, $p=0,37$ and *GSTPI* C341T: $X^2=3,33$, $p=0,06$).

O teste de regressão logística múltipla para avaliação do efeito das variáveis: idade, gênero, tabagismo, etilismo e os polimorfismos investigados no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço confirmou que idade ≥ 48 anos, (OR=12,37; IC 95% 7,89-19,38; $p < 0,0001$), tabagismo (OR=4,21; IC 95% 2,71-6,55; $p < 0,0001$) e etilismo (OR=1,65; IC 95% 1,07-2,55; $p=0,023$) foram fatores preditores para o câncer de cabeça e pescoço. Para o polimorfismo *GSTPI* A313G, houve diferenças significativas entre os grupos caso e controle (OR=0,61; IC 95% 0,42-0,90; $p=0,013$), entretanto, não houve diferenças significativas entre os grupos para o polimorfismo *GSTPI* C341T (OR=1,22; IC 95% 0,68-2,19; $p = 0,511$). (Tabela 2).

Os resultados da análise de genótipos combinados não mostraram associação com o risco de carcinoma de cabeça e pescoço (OR=0.80; IC95% = 0.64 – 1.01; $p=0.06$) (Dados não mostrados).

Em relação aos parâmetros clínicos, nos pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, os sítios anatômicos de cavidade oral (39,78%) e laringe (29,92%) foram observados com maior ocorrência, assim como a extensão do tumor T1/T2 (43,18%) e a ausência de comprometimento linfonodal (70,45%). Não foi observada associação significativa entre os polimorfismos A313G e C341T e parâmetros clínicos analisados (Tabela 3).

A análise de interação entre os polimorfismos e as variáveis associadas ao câncer de cabeça e pescoço, mostrou que o polimorfismo *GSTPI* A313G apresentou menor frequência nos indivíduos tabagistas (OR=0,63; IC 95% 0,40-1,00; p=0,050), etilistas (OR=0,58; IC 95% 0,35-0,95; p=0,031) com idade ≥ 48 anos (OR=0,58; IC 95% 0,37-0,90; p=0,015) e gênero masculino (OR=0,54; IC 95% 0,35-0,82; p=0,005). No entanto, para o polimorfismo *GSTPI* C341T, não foi possível estabelecer associação com as variáveis estudadas (Dados não mostrados).

Discussão

O presente estudo confirmou que idade acima de 48 anos, gênero masculino e hábitos tabagista e etilista são fatores de risco para o câncer de cabeça e pescoço, o que está de acordo com dados da literatura^{3,28-33}. Estudos confirmam a relação entre a carcinogênese da região de cabeça e pescoço e tais hábitos de vida^{1,22,34,35}, constituindo-se nos fatores de risco mais importantes para esse tipo de neoplasia¹².

Os resultados do presente estudo mostraram que os genótipos variantes *GSTPI* 313AG ou GG estiveram presentes em 48% dos indivíduos controle, corroborando com Jain *et al* (2006) que encontraram uma frequência de 47,4% do polimorfismo em sua população de estudo⁷, frequência também similar a outros estudos reportados^{12,36,37}. Em

relação às frequências do grupo caso do nosso estudo, 51,89% dos pacientes apresentaram genótipo homocigoto selvagem AA. Frequências semelhantes foram observadas por outros estudos realizados em diferentes populações. Miller *et al.* (2002) evidenciaram frequências de 46% do genótipo AA em pacientes com câncer de pulmão³⁸. Honma *et al.* (2008) encontraram frequências semelhantes na população brasileira com câncer de pulmão³⁹, diferentemente das frequências observadas nas populações da Tailândia⁴⁰ e da Índia^{12,41}.

Para a variante *GSTPI* C341T foi observada que 89,21% dos indivíduos controle apresentaram genótipo homocigoto selvagem CC. Li *et al.*, (2010) encontraram frequência semelhante (88% para o genótipo CC) em indivíduos controle afro descendentes em estudo caso-controle de câncer de esôfago¹⁹. Em câncer cerebral, Schwartzbaum *et al.* (2007) encontraram uma frequência de 84,2% de indivíduos sem neoplasia com genótipo CC⁴². A frequência genótipo CC no grupo caso do nosso estudo foi de 86,74%, similar àquela observada no estudo em câncer de mama de Van Emburgh *et al.* (2008) de 84,97%⁴³. No entanto, a frequência encontrada no estudo de Li *et al.*, 2010 em pacientes afro descendentes com câncer de esôfago foi de 60% para genótipo CC¹⁹.

Nossos resultados mostraram uma associação entre os genótipos *GSTPI* 313AG ou 313GG com risco diminuído de neoplasia de cabeça e pescoço. Corroborando com o estudo de Singh *et al.*,(2008)¹² e Ruwali *et al.*, (2009)⁴¹. O Estudo de Ruwali e colaboradores encontraram que indivíduos com o genótipo polimórfico 313GG obtiveram 75% de melhora na resposta do tratamento com quimioterapia e radioterapia para esta doença⁴¹.

O estudo de Zafereo *et al.* (2009) encontraram risco aumentado dos indivíduos com idade avançada, tabagistas e etilistas para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço. Este estudo também observou uma associação estatisticamente significativa com o risco de recorrência do tumor de cabeça e pescoço⁴⁴. Alguns estudos evidenciam menor ocorrência desse polimorfismo em pacientes portadores de tumores de esôfago e cabeça e pescoço^{12,41,48,52,53}. E o estudo de Cho *et al.* (2006) demonstraram que a associação das variantes polimórficas dos genes *GSTP1* e *NQO1* com o tabagismo aumenta o risco de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço¹⁶. No entanto, outros estudos Jourenkova-Mironova *et al.*(1999); Olshan *et al.* (2000); Cheng *et al.* (2003); Hashibe *et al.*(2003), Peters *et al.*(2006) e uma metanálise realizada por Jain *et al.* (2006), não encontraram associação desse polimorfismo com esse tipo tumoral^{11,45-48}.

O polimorfismo *GSTP1* C341T não foi associado com a doença em nosso estudo, assim como os estudos de Hatagima *et al.* (2008) e Zafereo *et al.* (2009), que também não encontraram associação deste polimorfismo e o risco de câncer de cabeça e pescoço^{18,44}.

A associação dos polimorfismos do gene *GSTP1* com as neoplasias de cabeça e pescoço é contraditória. Estudos mostram que tais polimorfismos são fatores de risco para esses tumores^{49,17}. Os genótipos homozigotos polimórficos também têm sido associados a um risco maior de vários outros tipos de câncer, tais como esôfago, bexiga, testículo, próstata e mama^{7,15,16,26,50} e, em indivíduos tabagistas, foi observado um maior risco de câncer de esôfago e de cavidade oral^{7,51}.

Em conclusão, os fatores de risco idade (≥ 48 anos), hábito tabagista e etilista são preditores para o desenvolvimento de neoplasias de cabeça e pescoço e o genótipo *GSTP1* 313 AG ou GG está associado ao risco diminuído para a doença. Nossos

resultados mostram que a menor frequência do polimorfismo *GSTP1* A313G (pelo menos um alelo polimórfico) em indivíduos tabagistas, etilistas, com idade ≥ 48 anos e gênero masculino possa conferir uma menor suscetibilidade para o câncer de cabeça e pescoço. Considerando a complexidade do processo de carcinogênese e sua etiologia multifatorial, é essencial a realização de estudos adicionais para elucidar a associação entre polimorfismos genéticos de genes metabolizadores de xenobióticos e variáveis epidemiológicas com o câncer de cabeça e pescoço.

Referências Bibliográficas

1. Döbrossy, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev.* 2005; v.17, p. 24-29.
2. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acessado em 31 de janeiro de 2011.
3. Dedivitis RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004; v. 70, p. 35-40.
4. Stenson, KM, Brockstein, BE. Overview of head and neck cancer, UpToDate, 2009. Disponível em: < <http://www.uptodate.com/home/store/index.do>>.
5. 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; v. 18, n. 2, p. 541-550.
6. Hayes, JD, Strange, RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology.* 2000; v. 61, p. 154-66.
7. Jain M, Kumar S, Rastogi N, Lal P, Ghoshal UC, Tiwari A *et al.* *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1* genetic polymorphisms and interaction with tobacco, alcohol and occupational exposure in esophageal cancer patients from North India, *Cancer Lett.* 2006; v.242, p. 60-67.
8. Lai C, Shields PG. The role of interindividual variation in human carcinogenesis. *J Nutr.* 1999; v. 129, p. 552-55.
9. Geisler SA, Olshan AF. *GSTM1*, *GSTT1*, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2001; v. 154, p. 95-105.
10. Parl FF. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett.* 2005; v. 221, p. 123-29.
11. Peters ES, McClean MD, Marsit CJ, LUCKETT B, Kelsey KT. Glutathione S-Transferase Polymorphisms and the Synergy of Alcohol and Tobacco in Oral, Pharyngeal, and Laryngeal Carcinoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2006; v.15, p. 2196-02.

12. Singh M, Shah PP, Singh AP, Ruwali M, Mathur N, Pant MC, et al. Association of genetic polymorphisms in glutathione S-transferases and susceptibility to head and neck cancer. *Mutation Research*. 2008; v. 638, p. 184-94.
13. Widersten M, Pearson WR, Engström A, Mannervik B. Heterologous expression of the allelic variant Mu-class glutathione transferases m and y. *Biochem J*. 1991; v. 276, p.519-24.
14. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of *GSTM1* and *GSTT1* genes in population studies. *Cancer Lett*. 1996; v.107, p. 229-33.
15. Leichsenring A., Losi-Guembarovski R, Maciel ME, Losi-Guembarovski A, Oliveira BW, Ramos G, et al. *CYP1A1* and *GSTP1* polymorphisms in an oral cancer case-control study. *Braz J Med Biol Res*. 2006; v. 39, n.1569-1574.
16. Cho CG, Lee SK, Nam SY, Lee MS, Lee SW, Choi EK et al. Association of the *GSTP1* and *NQO1* polymorphisms and head and neck squamous cell carcinoma risk. *J Korean Med Sci*. 2006; v. 21, p. 1075-1079.
17. Yang C-X, Matsuo K, Wang Z-M, Tajima K. Phase I/II enzyme gene polymorphisms and esophageal cancer risk: A meta-analysis of the literature. *World J Gastroenterol*. 2005; v.11, p.2531-2538.
18. Hatagima A, Costa ECB, Marques CFS, Koifman RJ, Boffetta P, Koifman S. Glutathione S-transferase polymorphisms and oral cancer: A case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncology*. 2008; 44, 200-7.
19. Li D, Dandara C, Parker MI. The 341C/T polymorphism in the *GSTP1* gene is associated with increased risk of oesophageal cancer. *BMC Genet*. 2010; Jun 11;11:47.
20. Yang P, Yokomizo A, Tazelaar HD, Marks RS, Lesnick TG, Miller DL, et al. Genetic determinants of lung cancer short-term survival: the role of glutathione-related genes. *Lung Cancer*. 2002; Mar;35(3):221-9.
21. Kjaerhein K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancer: a prospective study of 10.900 Norwegian men. *Cancer Causes and Control* 1998; 9: 99-108.

22. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang M-J, Sidransky JJD. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2000; v. 60, p.3155-3159.
23. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <http://www.inca.gov.br> Instituto Nacional do Câncer. UICC- União Internacional Contra o Câncer, 2002 – TNM – Classificação de Tumores Malignos 6ª. Edição. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA 2004. Acessado em 15 de janeiro de 2011.
24. Sobin LH, Wittelind CH. Internacional union against cancer: TNM classification of malignant tumours, 6th ed edn. Wiley, New York. 2000.
25. Miller SA, Dikes DD e Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research.* 1988; 16: 1215.
26. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione-S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis.* 1997; v.18, p.641–644.
27. Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis.* 1998; Feb;19(2):275-80.
28. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002; v. 52, n.4, p.195-215.
29. Batista AB, Ferreira FM, Ignácio SA, Machado MAN, Lima AAS, Efeito do Tabagismo na Mucosa Bucal de Indivíduos Jovens: Análise Citomorfométrica. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2008; v. 54, n. 1, p. 5-10.
30. Alvarenga LM, Ruiz MT, Pavarino-Bertelli EC, Ruback MJC, Maniglia JV, Goloni-Bertollo EM. Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2008; 74: 68-73.
31. Teixeira AKM, Almeida MEL, Holanda ME, Sousa FB, Almeida PC. Carcinoma Espinocelular da Cavidade Bucal: um Estudo Epidemiológico na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2009; v.55, n.3, p.229-236.

32. Maio R, Berto JC, Correa CR, Campana AO, Paiva SAR. Estado Nutricional e Atividade Inflamatória no Pré-Operatório em Pacientes com Cânceres da Cavidade Oral e da Orofaringe. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2009; v. 55, n. 4, p. 345-353.
33. Carli ML, Santos SL, Pereira AAC, Hanemann JAC. Características Clínicas, Epidemiológicas e Microscópicas do Câncer Bucal Diagnosticado na Universidade Federal de Alfenas. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2009; v.55, n.3, p.205-211.
34. Casiglia J, Woo SB. A comprehensive review of oral cancer. *Gen Dent*. 2001; v. 49, p. 72-82.
35. Zain RB. Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer - a brief overview. *Oral Oncol*. 2001; v. 37, p. 205-210.
36. Van Lieshout EM, Roelofs HM, Dekke S, Mulder CJ, Wobbes T, Jansen JB, *et al.*, Polymorphic expression of the glutathione S-transferase P1 gene and its susceptibility to barrett's esophagus and esophageal carcinoma. *Cancer Res*. 1999; v. 59, p. 586-589.
37. Mishra DK, Kumar A, Srivastava DS, Mittal RD. Allelic variation of *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1* genes in North Indian population, *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2004; v. 5, p. 362-365.
38. Miller DP, Liu G, De Vivo I, Lynch TJ, Wain JC, Su L, *et al.* Combinations of the variant genotypes of *GSTP1*, *GSTM1*, and *p53* are associated with an increased lung cancer risk. *Cancer Res*. 2002; v. 62, n. 15, p.2819-2823.
39. Honma HN, De Capitani EM, Perroud Jr MW, Barbeiro AS, Toro IFC, Costa DB, *et al.* Influence of *p53* codon 72 exon 4, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1*B* polymorphisms in lung cancer risk in a brazilian population. *Lung Cancer*. 2008; v. 61, p. 152-162.
40. Lee JM, Lee YC, Yang SY, Shi WL, Lee CJ, Luh SP, *et al.* Genetic polymorphisms of *p53* and *GSTP1*, but not *NAT2*, are associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer*. 2000; v. 89, p.458-464.
41. Ruwali M, Pant MCS, Shah PP, Mishra M, Parmar D. Polymorphism in cytochrome P450 2A6 and glutathione S-transferase P1 modifies head and neck cancer risk and treatment outcome. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2009; v. 669, p., 36-41.

42. Schwartzbaum JA, Ahlbom A, Lönn S, Warholm M, Rannug A, Auvinen A, et al. An international case-control study of glutathione transferase and functionally related polymorphisms and risk of primary adult brain tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; Mar;16(3):559-65.
43. Van Emburgh BO, Hu JJ, Levine EA, Mosley LJ, Perrier ND, Freimanis RI, et al. Polymorphisms in *CYP1B1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1*, and susceptibility to breast cancer. *Oncol Rep.* 2008; May;19(5):1311-21.
44. Zafereo ME, Sturgis EM, Aleem S, Chaung K, Wei Q, Li G. Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of second primary malignancy after index squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Prev Res.* 2009; 2:432-9.
45. Jourenkova-Mironova N, Voho A, Bouchardy C, Wikman H, Dayer P, Benhamou S et al. Glutathione S-transferase *GSTM1*, *GSTM3*, *GSTP1*, and *GSTT1* genotypes and the risk of smoking-related oral and pharyngeal cancers. *Int J Cancer.* 1999; 81, 44-48.
46. Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, and *NAT1* polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers.* 2000; Prev, v. 9, p. 185-91.
47. Cheng YJ, Chien YC, Hildesheim A, Hsu MM, Chen IH, Chuang J , et al. No Association Between Genetic Polymorphisms of *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *NAT2*, and Nasopharyngeal Carcinoma in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; v. 12, p.179–80.
48. Hashibe M, Brennan P, Strange RC, Bhisay R, Cascorbi I, Lazarus P, *et al.*, Meta- and pooled analyses of *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, and *CYP1A1* genotypes and risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; v. 12, p. 1509-17.
49. Park JY, Muscat JE, Schantz SP, Stern JC, Richie JP, Jr., Lazarus P. Association between *GSTM* polymorphisms and risk for oral cancer in African Americans as compared to Caucasians. *GSTM* polymorphisms and oral cancer risk *Pharmacogenetics.* 2000; v.10, p. 123-31.
50. Curran EJ, Stephen R, Weinstein R, Griffiths L. Polymorphisms of Glutathione S-transferase genes (*GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1*) and breast cancer susceptibility, *Cancer Lett.* 2000; v.153, p.113–120.

51. Sikdar N, Paul RR, Roy B. Glutathione S-transferase M3 (A/A) genotype as a risk factor for oral cancer and leukoplakia among Indian tobacco smokers. *Int J Cancer*. 2004; v. 109, p. 95-101.
52. Morita S, Yano M, Tsujinara T, Ogawa A, Taniguchi M, Kaneko K, et al. Association between genetic polymorphisms of glutathione S-transferase P1 and N-acetyltransferase 2 and susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer*. 1998; v. 79, p.517-520.
53. Oude Ophuis MB, Roelofs HM, Van Den Brandt PA, Peters WH, Manni JJ. Polymorphisms of the glutathione- S-transferase P1 gene and head and neck cancer susceptibility, *Head Neck*. 2003; v. 25, p. 37–43.

Tabela1. Tamanhos dos fragmentos em pares de base (pb) gerados após digestão com a enzima de restrição.

Genótipos	<i>GSTPI</i> A313G	<i>GSTPI</i> C341T
Homozigoto Selvagem	176pb (AA)	247pb, 118pb, 55pb (CC)
Heterozigoto	176pb, 91pb, 85pb (AG)	365pb, 247pb, 118pb, 55pb (CT)
Homozigoto polimórfico	91pb, 85pb (GG)	365pb, 55pb (TT)

Tabela 2. Dados demográficos, fatores de risco e polimorfismos dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço e indivíduos controle.

Variáveis	Pacientes	Controles	OR (IC 95%)	p
	n(%)	n(%)		
N° de indivíduos	264	519		
Idade (mediana)				
< 48 anos	29 (10,98)	343 (66,08)	Referência	
≥ 48 anos	235 (89,02)	176 (33,92)	12,37 (7,89-19,38)	0,000
Gênero				
Feminino	32 (12,12)	146 (28,13)	Referência	
Masculino	232 (87,88)	373 (71,87)	1,46 (0,86-2,48)	0,158
Hábito tabagista				
Não Fumantes	42 (15,90)	314 (60,50)	Referência	
Fumantes	222 (84,10)	205 (39,50)	4,21 (2,71-6,55)	0,000
Hábito etilista				
Não etilista	70 (26,51)	262 (50,48)	Referência	
Etilistas	194 (73,49)	257 (49,52)	1,65 (1,07-2,55)	0,023
Genótipos				
<i>GSTPI A313G</i>				
AA	137 (51,90)	228 (43,93)	Referência	
AG e GG	127 (48,10)	291 (56,07)	0,61 (0,42-0,90)	0,013
<i>GSTPI C341T</i>				
CC	229 (86,74)	463 (89,21)	Referência	
CT e TT	35 (13,26)	56 (10,79)	1,22 (0,68-2,19)	0,511

Tabela 3. Características clínico-patológicas dos pacientes e polimorfismos *GSTP1*.

	<i>GSTP1</i> A313G	<i>GSTP1</i> C341T
	OR (IC 95%), p	OR (IC 95%), p
Parâmetros clínicos		
Sítios de tumor*		
Cavidade oral	1,26 (0,76-2,11); 0,370	1,32 (0,63-2,77); 0,464
Faringe	0,90 (0,50-1,63); 0,730	0,69 (0,27-1,79); 0,445
Laringe	1,04 (0,60-1,79); 0,901	0,60 (0,25-1,43); 0,248
Extensão do tumor*		
T1/T2	Referência	Referência
T3/T4	1,71 (0,98-2,98); 0,060	1,64 (0,75-3,55); 0,214
Comprometimento dos linfonodos*		
Não	Referência	Referência
Sim	0,86 (0,49-1,53); 0,616	0,87 (0,38-2,02); 0,748

* Foi realizada a análise para os pacientes com dados completos.

ARTIGO CIENTÍFICO 3

Artigo 3

Título: Polimorfismos do gene *EPHX1* em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

Autores: Anelise Russo, Mariangela Torreglosa Ruiz, Ana Livia Silva Galbiatti, Lidia Maria Rebolho Batista da Silva, José Victor Maniglia, Luís Sérgio Raposo, Érika Cristina Pavarino, Eny Maria Goloni-Bertollo

Periódico: Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB)

Polimorfismos do gene *EPHX1* em pacientes com câncer de cabeça e pescoço

EPHX1 gene polymorphisms in patients with head and neck cancer

Anelise Russo, Mariangela Torreglosa Ruiz, Ana Livia Silva Galbiatti, Lidia Maria Rebolho da Silva, José Victor Maniglia, Luís Sérgio Raposo, Érika Cristina Pavarino, Eny Maria Goloni-Bertollo.

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Endereço:

Prof^a Dr^a Eny Maria Goloni-Bertollo

Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
– FAMERP.

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416

CEP 15090-000

São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Telefone: 17 3201-5720.

e-mail: eny.goloni@famerp.br

Resumo

Objetivo: Este trabalho teve como objetivo analisar os polimorfismos Tyr113His e His139Arg no gene *EPHX1*, em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e em indivíduos sem história de neoplasia e verificar a associação destes polimorfismos com os fatores de risco e características histopatológicas dos pacientes. **Métodos:** Foram avaliados 626 indivíduos, 224 pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço da Faculdade de Medicina / Hospital de Base de São José do Rio Preto, e 402 indivíduos sem história de neoplasia, Hemocentro da Faculdade de Medicina / Hospital de Base de São José do Rio Preto. As variáveis analisadas foram: idade, gênero e consumo de álcool e tabaco. A genotipagem dos polimorfismos foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Os achados moleculares e as informações sobre os fatores de risco e características histopatológicas foram avaliados estatisticamente, por meio do teste de regressão logística múltipla. **Resultados:** Os resultados mostraram que idade maior que 49 anos – mediana da idade entre os dois grupos (OR: 9,26; IC 95%: 5,91-14,51; $p < 0,0001$); consumo de cigarro (OR= 3,12; IC 95%: 1,93-5,07; $p < 0,0001$) e consumo de álcool (OR = 1,70; IC 95% = 1,07-2,70; $p = 0,026$) são fatores preditores da doença. **Conclusões:** Portanto, na população analisada não há associação entre os polimorfismos Tyr113His e His139Arg no gene *EPHX1* e câncer de cabeça e pescoço.

Palavras Chave: Câncer de Cabeça e Pescoço, polimorfismos, gene *EPHX1*

Summary

Background: To evaluate the polymorphisms in the *EPHX1* gene His139Arg and Tyr113His, in patients with head and neck cancer and in individuals with no cancer history and investigate the association of these polymorphisms and the risk factors and histopathological characteristics of patients. **Methods:** Investigated 626 individuals, 224 patients with head and neck squamous cell carcinoma from the Medical School/Base Hospital, Sao Jose do Rio Preto, and 402 individuals with no cancer history, Medical School Hemocentro/Base Hospital, Sao Jose do Rio Preto. The variables evaluated were: age, gender and alcohol and tobacco consumption. The polymorphisms genotyping was performed by Polymerase Chain Reaction in Real Time. The molecular findings and the information about risk factors and histopathological characters were statistically evaluated by multiple logistic regression test. **Results:** Results showed that age older than 49 years - the median age between the two groups (OR: 9.26; IC 95%: 5.91-14.51; $p < 0.0001$); tobacco consumption (OR= 3.12; IC 95%: 1.93-5.07; $p < 0.0001$) and alcohol consumption (OR = 1.70; IC 95% = 1.07-2.70; $p = 0.026$) were predictor factors of disease. **Conclusions:** Therefore, in the study population there is no association between Tyr113His and His139Arg *EPHX1* polymorphisms and gene and head and neck cancer.

Keywords: Head and Neck Cancer, polymorphisms, gene *EPHX1*.

I. Introdução

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) inclui tumores malignos que surgem em uma variedade de sítios no trato aero digestivo superior. O tipo histológico mais comum é o carcinoma de células escamosas e os sítios mais frequentes são a cavidade oral, faringe e a laringe. Mundialmente, este carcinoma é o sexto tipo mais comum de neoplasia¹.

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2010 o câncer na cavidade oral, sítio mais representativo, representará 18.130 novos casos, 13.250 homens e 4.880 mulheres no Brasil e para o estado de São Paulo, 5.360 novos casos². Na região noroeste do estado de São Paulo, um levantamento realizado mostrou 427 novos casos no período de 2000 a 2005, para a região anatômica de cabeça e pescoço³.

O tabagismo e o etilismo são os principais fatores de risco para o câncer de cabeça e pescoço⁴. O cigarro contém aproximadamente cerca de 70 tipos de carcinógenos, dentre eles as N-nitrosaminas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aminas aromáticas, esses carcinógenos podem levar à formação de adutos de DNA. A incidência de CCP é de quatro a sete vezes maior em indivíduos fumantes⁵.

Atualmente, o conceito do campo de cancerização é amplamente aceito como uma explicação para os efeitos carcinogênicos do cigarro na mucosa oral. A ação direta dos radicais livres e outros carcinógenos presentes no cigarro nas células epiteliais, gradualmente acumulam alterações levando à transformação maligna no local.⁶

Os carcinógenos presentes no cigarro podem ser ativados ou detoxificados por enzimas de biotransformação de fase I e fase II, respectivamente. O risco de um indivíduo desenvolver CCP após a exposição aos componentes carcinógenos do tabaco pode depender dos polimorfismos genéticos destas enzimas. A maquinaria de metabolização xenobiótica possui dois tipos de enzimas: as do metabolismo oxidativo mediado ou de Fase I; e as enzimas conjugadas ou de Fase II. As reações da fase I são mediadas pelas enzimas do citocromo P450 e pelas enzimas mEH (*Microsomal epoxide hydrolase*)⁷.

Dois polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) não sinônimos, Tyr113His (T/C) e His139Arg (A/G) foram identificados no gene *EPHX1*, que codifica a enzima mEH e estes estão associados com alterações enzimáticas. A variante His114 resulta em

uma diminuição de 40% na atividade da enzima enquanto a variante Arg139 em um aumento de 25% de atividade⁸.

Alguns estudos investigaram o papel de polimorfismos do gene *EPHX1* na carcinogênese de cabeça e pescoço. Jourenkova-Mironova e colaboradores (2000) mostraram um aumento significativo do risco aumentado para câncer de orofaringe e laringe em indivíduos fumantes, etilistas e que apresentam o genótipo variante do polimorfismo Tyr113His do gene *EPHX1*⁹. Park e colaboradores (2003) demonstraram que o genótipo variante deste polimorfismo e atividade aumentada da enzima está associado ao risco aumentado de câncer de laringe e oral em indivíduos fumantes¹⁰. O estudo de Lacko e colaboradores (2008) mostrou associação do polimorfismo His139Arg e câncer de cabeça e pescoço¹¹.

Baseado nessas evidências, o objetivo deste trabalho foi identificar os polimorfismos Tyr113His e His139Arg do gene *EPHX1* em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e em indivíduos sem história de neoplasia, avaliar a associação deste polimorfismo com características clínicas e investigar a associação dos dados demográficos (idade e gênero) e fatores de risco (tabagismo e etilismo) com a doença.

II. Casuística e Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em pesquisa – CEP da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP sob número 3342/2007.

Um total de 626 indivíduos foi incluído neste estudo, dos quais 224 (197 homens e 27 mulheres, média de idade $59 \pm 10,17$ anos) apresentam diagnóstico histopatológico de CCP e são procedentes de um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo e 402 indivíduos não apresentam história de neoplasia (288 homens e 114 mulheres, média de idade de $47 \pm 13,55$ anos). Os indivíduos foram incluídos no estudo após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

No grupo controle foram incluídos indivíduos provenientes do Hemocentro de São José de Rio Preto sem diagnóstico de câncer de acordo com o protocolo de doadores de sangue que avalia a ocorrência de 20 doenças (<http://www.hemonline.com.br/portarias/rdc153/indexframe.htm>). O critério de inclusão

foi idade acima de 40 anos e o critério de exclusão foi história familiar de câncer e presença de qualquer doença avaliada no protocolo de doação de sangue. O grupo caso foi composto de pacientes com diagnóstico de CCP realizado a partir de espécimes patológicos ou após excisão total ou biópsia. Como critério de inclusão foram avaliados apenas os pacientes com tumores do tipo histológico espinocelular e foram excluídos do estudo pacientes previamente tratados.

As variáveis analisadas foram idade, gênero, exposição a fatores de risco (consumo de álcool e cigarro) e parâmetros clínicos relacionados ao tumor. Foram considerados tabagistas indivíduos que consumiram cerca de 100 cigarros durante toda vida e etilistas aqueles que bebem mais de quatro drinques por semana^{12, 13}.

Quanto aos parâmetros clínicos, foram analisados os sítios primários de ocorrência do tumor (subdividos em cavidade oral, faringe e laringe) e os tumores foram classificados de acordo com os parâmetros da *Union International Control Cancer* (IUCC), 2002, em três critérios: tamanho do tumor (T), presença de linfonodos regionais comprometidos (N) e presença de metástase (M). Todas as informações sobre os parâmetros histopatológicos foram obtidas por meio de prontuários médicos^{14, 15}.

O DNA genômico extraído segundo Miller e colaboradores com modificações (1988)¹⁶. A análise dos polimorfismos Tyr113His e His139Arg foram realizadas por meio da reação de PCR em Tempo Real em volume final de 5 µL contendo 10 ng de DNA genômico, 2,5 µL *Taqman* Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystems*), 0,9 µM dos *primers* sense e anti-sense e 0,2 µM das sondas específicas para cada alelo investigado, marcadas com fluoróforos e *primers* e sondas *TaqMan* para detecção do polimorfismo. As reações foram realizadas em placas de 96 poços, no equipamento *Step One Plus™ Real-Time PCR System*. *Primers* e sondas específicos para esta variante são disponibilizados pelo fabricante (Assay ID C__14938_30 e rs1051740-Tyr113His / Assay ID C__11638783_30 e rs2234922-His139Arg).

O modelo de regressão logística múltipla foi utilizado para avaliar o efeito das variáveis e da distribuição genotípica entre os grupos. As variáveis incluídas no modelo foram: idade (referência: idade abaixo da mediana de ambos os grupos), gênero (referência: sexo feminino), hábito tabagista (referência: não fumantes); hábito etilista (referência: não etilistas), o polimorfismo *EPHX1* Tyr113His (referência: Tyr113) e o polimorfismo *EPHX1* His139Arg (referência: His139).

As características histopatológicas também foram analisadas por regressão logística múltipla. A classificação T foi classificada em tumores com pequena extensão (T1, T2) e com grande extensão (T3, T4). A classificação N foi dividida em comprometimento de linfonodos negativo (N0) e positivo (N1, N2, N3). A classificação M foi dividida em M0 como ausência de metástase e M1 como presença de metástase. Os estádios foram divididos em precoce (T1, T2, N0, M0) e categoria avançada da doença (T3, T4, N2-3, M1). Para análise da agressividade, foram considerados tumores não agressivos aqueles com a classificação T1 ou T2 e N0 e agressivos os tumores T3 ou T4 e N1 ou N2 ou N3.

Os resultados foram apresentados em odds ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC – 95%). O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p \leq 0,05$). A análise estatística foi realizada por meio dos programas computacionais Bioestat e Instat.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi realizado pelo teste do qui-quadrado.

III. Resultados

As frequências genotípicas dos polimorfismos His139Arg e Tyr113His encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o grupo de pacientes (*His139Arg*: $X^2 = 0,34$; $p = 0,55$ e *Tyr113His*: $X^2 = 0,72$; $p = 0,19$) e para o grupo controle (*His139Arg* $X^2 = 0,003$; $p = 0,96$ e *Tyr113His*: $X^2 = 0,002$; $p = 0,96$).

A Tabela 1 apresenta os dados demográficos e genótipos dos polimorfismos Tyr113His e His139Arg do gene *EPHX1* de 224 pacientes com CCP e 402 indivíduos sem história de neoplasia.

O modelo de regressão logística múltipla mostra que idade maior que 49 anos – mediana da idade entre os dois grupos (OR: 9,26; IC 95%: 5,91-14,51; $p < 0,0001$); consumo de cigarro (OR= 3,12; IC 95%: 1,93-5,07; $p < 0,0001$) e consumo de álcool (OR = 1,70; IC 95% = 1,07-2,70; $p = 0,026$) são fatores preditores da doença. Não houve associação dos polimorfismos estudados e o risco de CCP.

Quando os genótipos combinados dos dois polimorfismos foram analisados com os dados demográficos e fatores de risco, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes (OR = 0,95; IC 95%: 0,75-1,20; $p = 0,65$) (dados não mostrados).

A interação entre a distribuição dos polimorfismos Tyr113His e His139Arg e a exposição aos fatores de risco para CCP estão apresentadas na Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente. A frequência do polimorfismo His139Arg foi menor entre os pacientes que consomem álcool (OR = 0,55; IC 95% = 0,32-096; p = 0,04).

Em relação aos parâmetros clínicos não houve diferenças entre as variáveis analisadas (dados não mostrados).

IV. Discussão

Confirmando os dados encontrados na literatura, nosso estudo demonstrou que essa doença é mais frequente em pessoas tabagistas, etilistas e acima de 49 anos de idade (mediana da idade dos grupos estudados).

O CCP é uma doença frequentemente observada entre a quinta e sétima década de vida¹⁷. Uma das hipóteses para prevalência aumentada desse tipo tumoral nesta faixa etária é a redução dos mecanismos antioxidantes da saliva e/ou aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas ao nitrogênio (RNS) que resulta em alterações no DNA¹⁸.

Embora mais que 90% dos pacientes com CCP tenham mais de 45 anos, a incidência desta doença em indivíduos mais jovens vem aumentando, com maior ocorrência na cavidade oral. Os mecanismos etiológicos nesta faixa etária ainda não estão bem esclarecidos. Há relatos que infecções virais (vírus papiloma humano e vírus Epstein-Barr) possam contribuir para o desenvolvimento desta neoplasia¹⁹, e também que pacientes jovens parecem exibir predisposição à instabilidade genética, mostrando uma alta frequência de instabilidade de microssatélites²⁰.

Os nossos resultados mostram uma alta frequência de pacientes com os hábitos tabagista e etilista o que está de acordo com os dados da literatura que mostram que esses fatores estão associados ao risco de desenvolvimento desta doença²¹.

Em relação aos polimorfismos estudados, nossos resultados não demonstraram associação entre os polimorfismos His139Arg e Tyr113His do gene *EPHX1* e o risco de CCP, o que corrobora com os estudos de Buch e colaboradores (2008)²², Boccia e colaboradores (2008)²³ e Varela-Leme e colaboradores (2008)²⁴ que também não

encontraram diferenças significantes entre o grupo de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e indivíduos controle²²⁻²⁴.

O nosso estudo foi o primeiro a avaliar estes polimorfismos na população brasileira com CCP. Foi realizado um único estudo da frequência destes polimorfismos na população brasileira em pacientes com leucemia linfoblástica aguda que mostrou que estes possuem um papel protetor para esta doença²⁵.

Segundo a revisão de literatura realizada por Lacko e colaboradores (2009), alguns estudos mostram uma associação entre os polimorfismos His139Arg e Tyr113His do gene *EPHX1* e risco para CCP. Park e colaboradores (2003) demonstraram que o polimorfismo Tyr113His está associado ao risco aumentado de câncer de laringe e oral em indivíduos fumantes que apresentam o genótipo variante que confere atividade aumentada da enzima¹⁰. Jourenkova-Mironova e colaboradores (2000) em um estudo com câncer de orofaringe e laringe demonstraram que indivíduos fumantes, etilistas e com o genótipo variante do polimorfismo Tyr113His do gene *EPHX1* são mais suscetíveis ao desenvolvimento desses tumores⁹. Lacko e colaboradores (2008) observaram uma frequência aumentada do genótipo 139Arg/Arg em pacientes com carcinoma de hipofaringe¹¹.

O polimorfismo Tyr113His do gene *EPHX1* também foi associado com câncer de mama²⁶, câncer de ovário²⁷, câncer de pulmão^{28, 29}, câncer de esôfago³⁰.

Em nosso estudo, a análise de interação dos polimorfismos com fatores relacionados ao desenvolvimento de CCP demonstrou uma frequência do polimorfismo His139Arg diminuída entre os indivíduos que consomem álcool o que pode sugerir um papel protetor deste polimorfismo em indivíduos etilistas no risco da doença. Entretanto, outros estudos em diferentes populações são necessários para confirmar este resultado.

Os parâmetros clínicos avaliados não foram associados com a presença das variantes polimórficas His139Arg e Tyr113His do gene *EPHX1* e não há na literatura estudos que avaliam a relação dessas variáveis com CCP.

Em conclusão, nossos resultados não demonstram associação entre os polimorfismos Tyr113His e His139Arg do gene *EPHX1* e câncer de cabeça e pescoço. Entretanto, a menor frequência do polimorfismo His139Arg do gene *EPHX1* observada

em pacientes etilistas, sugere que a presença desse polimorfismo em indivíduos etilistas possa conferir uma menor probabilidade de desenvolvimento da doença.

Referências Bibliográficas

1. Cripps C, Winqvist E, Devries MC, Stys-Norman D, Gilbert R. Epidermal growth factor receptor targeted therapy in stages III and IV head and neck cancer. *Curr Oncol* 2010; Jun;17(3):37-48.
2. Instituto Nacional do Câncer – <http://www.inca.gov.br>. Acessado em 31 de janeiro de 2011.
3. Alvarenga Lde M, Ruiz MT, Pavarino-Bertelli EC, Ruback MJ, Maniglia JV, Goloni-Bertollo M. Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. *Braz J Otorhinolaryngol* 2008 Jan-Feb;74(1):68-73.
4. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Current Opinion in Oncology* 2009; 21, 94–200.
5. Licitra L, Rossini C, Bossi P, Locati L. Advances in the changing patterns of aetiology of head and neck cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 14, 95-9.
6. Nagler R, Dayan D. The dual role of saliva in oral carcinogenesis. *Oncology* 2006;71(1-2):10-7. Epub 2007 Mar 5.
7. Lacko M, Ophuis MBO, Peters WHM, Manni1 JJ. Genetic polymorphisms of smoking-related carcinogen detoxifying enzymes and head and neck cancer susceptibility. *Anticancer Research* 2009; 29: 753-62.
8. Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk (Review). *Int J Oncol* 2008; 32: 945-73.
9. Jourenkova-Mironova N, Mitrunen K, Bouchardy C, Dayer P, Benhamou S, Hirvonen A. High-activity microsomal epoxide hydrolase genotypes and the risk of oral, pharynx, and larynx cancers. *Cancer Res* 2000; Feb 1;60 (3):534-6.
10. Park JY, Schantz SP and Lazarus P: Epoxide hydrolase genotype and orolaryngeal cancer risk: interaction with GSTM1 genotype. *Oral Oncol* 2003; 39: 483-90.
11. Lacko M, Roelofs HM, Te Morsche RH, Voogd AC, Oude Ophuis MB, Peters WH, et al., Microsomal epoxide hydrolase genotypes and the risk for head and neck cancer. *Head Neck* 2008; 30(7):836-44.
12. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang M-J, Sidransky JJD. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000; v. 60, p.3155-3159.
13. Kjaerhein K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancer: a prospective study of 10.900 Norwegian men. *Cancer Causes and Control* 1998; 9: 99-108.
14. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <http://www.inca.gov.br> Instituto Nacional do Câncer. UICC- União Internacional Contra o Câncer, 2002 – TNM – Classificação de Tumores Malignos 6ª. Edição. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA 2004.

15. Sobin LH, Wittelind CH (2000) *Internacional union against cancer: TNM classification of malignant tumours*, 6th ed edn. Wiley, New York
16. Miller SA, Dikes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
17. Kim L, King T, Agulnik M. Head and neck cancer: changing epidemiology and public health implications. *Oncology* 2010; 24(10):915-924.
18. Hershkovich O, Shafat I, Nagler RM. Age-related changes in salivary antioxidant profile: possible implications for oral cancer. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007; 62:361-6.
19. Evans M, Powell NG. The changing aetiology of head and neck cancer: the role of human papillomavirus. *Clin Oncol* 2010; 22(7):538-46.
20. Wang Y, Irish J, MacMillan C, Brown D, Xuan Y, Boyington C, et al. High frequency of microsatellite instability in young patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma: lack of involvement of the mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2. *Int J Cancer*. 2001; 93:353-60.
21. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; Jan;11(1):9-22.
22. Buch SC, Nazar-Stewart V, Weissfeld JL, Romkes M. Case-control study of oral and oropharyngeal cancer in whites and genetic variation in eight metabolic enzymes. *Head Neck* 2008; 30(9):1139-47.
23. Boccia S, Cadoni G, Sayed-Tabatabaei FA, Volante M, Arzani D, De Lauretis A, Cattel C, Almadori G, van Duijn CM, Paludetti G, Ricciardi G. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, EPHX1 exons 3 and 4, and NAT2 polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008; Jan; 134(1): 93-100.
24. Varela-Lema L, Ruano-Ravina A, Juiz Crespo MA, Kelsey KT, Loidi L, Barros-Dios JM. CYP1A1, mEH, and GSTM1 Polymorphisms and Risk of Oral and Pharyngeal Cancer: A Spanish Case-Control Study. *J Oncol* 2008; 74:1310.
25. Silveira Vda S, Canalle R, Scrideli CA, Queiroz RG, Tone LG. Role of the CYP2D6, EPHX1, MPO, and NQO1 genes in the susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Brazilian children. *Environ Mol Mutagen* 2010; 51(1):48-56.
26. Khedhaier A, Hassen E, Bouaouina N, Gabbouj S, Ahmed SB, Chouchane L. Implication of Xenobiotic Metabolizing Enzyme gene (CYP2E1, CYP2C19, CYP2D6, mEH and NAT2) polymorphisms in breast carcinoma. *BMC Cancer* 2008; 18;8:109.
27. Goode EL, White KL, Vierkant RA, Phelan CM, Cunningham JM, Schildkraut JM, et al. Xenobiotic-Metabolizing gene polymorphisms and ovarian cancer risk. *Mol Carcinog* 2010; Dec 28. [Epub ahead of print].
28. Benhamou S, Reinikainen M, Bouchardy C, Dayer P, Hirvonen A. Association between lung cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Cancer Res* 1;58(23):5291-3, 1998.

29. Graziano C, Comin CE, Crisci C, Novelli L, Politi L, Messerini L, et al. Functional polymorphisms of the microsomal epoxide hydrolase gene: a reappraisal on a early-onset lung cancer patients series. *Lung Cancer*;63(2):187-93, 2009.
30. Jain M, Tilak AR, Upadhyay R, Kumar A, Mittal B. Microsomal epoxide hydrolase (EPHX1), slow (exon 3, 113His) and fast (exon 4, 139Arg) alleles confer susceptibility to squamous cell esophageal cancer. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15;230(2):247-51, 2008.

Tabela 1. Dados demográficos e frequência de polimorfismos de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e indivíduos controles.

Variáveis	Pacientes n (%)	Controles n (%)	OR (IC 95%)	p
Idade				
Mediana				
< 49 anos	39 (17,41)	277 (68,90)	Referência	
>49 anos	185 (82,59)	125 (31,10)	9,26 (5,91-14,51)	<0,0001
Gênero				
Feminino	27 (12,05)	114 (28,36)	Referência	
Masculino	197 (87,95)	288 (71,64)	1,57 (0,90-2,75)	0,113
Consumo de cigarro				
Não	38 (16,96)	225 (55,97)	Referência	
Sim	186 (83,04)	177 (44,03)	3,12 (1,93-5,07)	<0,0001
Consumo de álcool				
Não	62 (27,68)	218 (54,23)	Referência	
Sim	162 (72,32)	184 (45,77)	1,70 (1,07-2,70)	0,026
Polimorfismo				
Tyr113His				
TT	114 (50,89)	209 (51,99)	Referência	
TC e CC	110 (49,11)	193 (48,01)	0,88 (0,59-1,32)	0,541
Polimorfismo				
His139Arg				
AA	148 (66,07)	240 (59,70)	Referência	
AG e GG	76 (33,93)	162 (40,30)	0,95 (0,63-1,45)	0,815

Tabela 2. Distribuição dos genótipos do polimorfismo Tyr113His e fatores de risco em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e indivíduos controles.

Variável	TT (Caso/Controle)	OR (95% IC)*	TC e CC (Caso/Controle)	OR (95% IC)*	p
Genêro					
Feminino	13/55	1,00 (ref)	14/59	0,60 (0,23 -1,56)	0,29
Masculino	99/154	1,00 (ref)	98/134	0,95 (0,61- 1,49)	0,82
Idade					
< 48	14/143	1,00 (ref)	18/122	0,89 (0,41 - 1,90)	0,76
> 48	100/66	1,00 (ref)	92/71	1,15 (0,69 - 1,91)	0,57
Consumo de cigarro					
Não fumantes	17/117	1,00 (ref)	21/108	0,69 (0,32-1,51)	0,36
Fumantes	97/92	1,00 (ref)	89/85	0,97 (0,51-1,85)	0,93
Consumo de álcool					
Sim	80/89	1,00 (ref)	32/95	0,88 (0,52-1,50)	0,64
Não	30/120	1,00 (ref)	82/98	0,97 (0,51-1,85)	0,93

Tabela 3. Distribuição dos genótipos do polimorfismo His139Arg e fatores de risco em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e indivíduos controles

Variável	AA (Caso/Controle)	OR (95% IC)*	AG e GG (Caso/Controle)	OR (95% IC)*	p
Genêro					
Feminino	09/67	1,00 (ref)	18/47	1,01 (0,39- 2,65)	0,98
Masculino	130/173	1,00 (ref)	67/115	0,94 (0,59- 1,51)	0,80
Idade					
< 48	22/147	1,00 (ref)	10/118	0,89 (0,41- 1,90)	0,62
> 48	126/93	1,00 (ref)	66/44	1,15 (0,69 1,91)	0,59
Consumo de cigarro					
Não fumantes	27/134	1,00 (ref)	11/91	0,79 (0,34 – 1,82)	0,58
Fumantes	121/106	1,00 (ref)	65/71	1,76 (0,56-1,52)	0,76
Consumo de álcool					
Sim	106/108	1,00 (ref)	56/76	0,55 (0,32-0,96)	0,04
Não	42/132	1,00 (ref)	20/86	1,76 (0,92-3,36)	0,09

ARTIGO CIENTÍFICO 4

Artigo 4

Título: Genetic polymorphisms of xenobiotics metabolism to head and neck squamous cell carcinoma risk.

Autores: Anelise Russo, Ana Livia Silva Galbiatti, Mariângela Torreglosa Ruiz, Luiz Sérgio Raposo, José Victor Maniglia, Érika Cristina Pavarino, Eny Maria Goloni-Bertollo

Periódico: Carcinogenesis, a ser submetido para publicação.

Genetic polymorphisms of xenobiotics metabolism to head and neck squamous cell carcinoma risk

Anelise Russo¹, Ana Livia Silva Galbiatti¹, Mariângela Torreglosa Ruiz¹, Luiz Sérgio Raposo², José Victor Maniglia², Érika Cristina Pavarino¹, Eny Maria Goloni-Bertollo¹

¹ Genetics and Molecular Biology Research Unit - UPGEM, São José do Rio Preto Medicine School – FAMERP – Brazil.

² Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery Department of the São José do Rio Preto Medicine School – FAMERP – Brazil.

Address correspondence to:

Prof^a Dr^a Eny Maria Goloni-Bertollo

Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416

CEP 15090-000

São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Phone: +55 17 3201-5720.

e-mail: eny.goloni@famerp.br

ABSTRACT

INTRODUCTION: Genes polymorphisms involved in xenobiotic metabolism can modify the activation or detoxification of smoke and alcohol metabolites and consequently increase risk for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

OBJECTIVES: Investigate the frequency of single nucleotide polymorphisms (SNPs), *CYP1A1**2A, *CYP1A1**2C, *CYP2E1**5B, *CYP2E1**6, *GSTP1* A313G, *GSTP1* C341G, *GSTT1* and *GSTM1*null, *mEH* Tyr113His and *mEH* His139Arg polymorphisms in patients with HNSCC and to compare with individuals without neoplasia history; evaluate the association between these polymorphisms and risk factors (tobacco, alcohol, gender and age) and evaluate the distribution of genotypes according to clinical histopathological parameters of HNSCC. **METHODS:** Molecular analysis was performed by the techniques of Polymerase Chain Reaction and Length Polymorphism, Restriction Fragment (PCR-RFLP) and Real Time. Statistical analysis was performed using the chi-square test and multiple logistic regression. **RESULTS:** Using univariate analysis, the results showed significant differences for *CYP2E1**6 and *GSTP1* A313G polymorphisms (at least polymorphic allele) between patients and controls. Multivariable analysis showed that age \geq 49 years, tobacco and alcohol may be predictors of the disease. Polymorphisms *CYP1A1**2C, *mEH* His139Arg, *CYP1A1**2A, *CYP2E1**5B associated with variables such as gender, tobacco and/or alcohol habits modulate the risk for developing HNSCC. Clinical histopathological parameters analysis showed association between *CYP1A1**2C polymorphism with larynx primary site and *GSTT1* polymorphism with larynx and pharynx, the *CYP1A1**2A polymorphism is associated with lymph node involvement and increased risk for HNSCC. **CONCLUSION:** Our data shows that polymorphisms in genes that encode enzymes

involved in xenobiotic metabolism associated to demographic data and risk factors modulate the risk for developing HNSCC.

Key words: head and neck squamous cell carcinoma, polymorphism, *CYP1A1*, *CYP2E1*, *mEH*, *GSTP*, *GSTT1* and *GSTM1* genes.

INTRODUCTION

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) includes all malignancies located in the oral cavity and upper aero digestive tract being that 40% occur in the oral cavity, 15% in the pharynx, 25% in larynx and 20% in other locations (salivary glands, thyroid) (1). The most common histological type is squamous cell carcinoma, which represents more than 90% of cases (2,3). The development of this disease is the result of the interaction of both environmental factors (tobacco and alcohol habits) and genetic inheritance, so multifactorial. (4-8). The inherited differences in the capacity of xenobiotic metabolizing enzymes have been found to be an important factor determinant the genetic susceptibility to aerodigestive tract cancer (9).

The machinery of xenobiotic metabolizing has two main types of enzymes: the oxidative metabolism or Phase I mediated by cytochrome P450 (CYPs) enzymes and Microsomal epoxide hydrolase (mEHs) that convert many compounds to highly reactive metabolites in carcinogenic, (10); and the enzyme conjugate or Phase II reactions that involves glutathione S-transferases (GSTs), UDP-glucuroniltransferases (UGTs), N-acetyltransferases (NATs), Sulfotransferases (SLTs) and Thio-purina-S-metiltransferases (TPMTs), enzymes that act as inactivating the products of Phase I, (4,11-14). Omiecinski et al., 2011, have reported about Phase III biotransformation that may active membrane transporters that function to shuttle drugs and other xenobiotics across cellular membranes (15).

Polymorphisms in genes that encode enzymes involved in xenobiotic metabolism can modify the function these enzyme and result in incorrect activation or detoxification of smoke and alcohol metabolites (15-17).

The *CYP1A1* and *CYP2E1* genes were associated with increased risk for oral cancer (18). However, the studies of Hildesheim et al. 1997 and Gajeka et al. 2005 did not show association of *CYP1A1* and *CYP2E1* polymorphisms with larynx and nasopharynx cancers, respectively (19,20).

The results of literature data for *GSTT1* and *GSTM1* deletion polymorphisms in HNSCC are contradictory. Some studies showed the association of HNSCC with *GSTT1* and *GSTM1* nulls (7,10,13,21-23). However, other studies did not show association (24-30). The *GSTP1* A313G and *GSTP1* C341T polymorphisms have a positive association with levels of DNA adducts, increasing the risk of cancer (30,31). However, in HNSCC, the *GSTP1* polymorphism was associated with decreased of risk for this disease (13) Singh et al., 2008). The wild genotype combination of *GSTP1* with *GSTT1* and *GSTM1* null had association the 4-fold increase in risk for HNSCC developing (13).

The *mEH* gene Tyr113His and His139Arg polymorphisms also were investigated in HNSCC development. Studies confirmed association of these polymorphisms with increased risk for HNSCC in smokers individuals (30,31). Lacko et al. (2008) showed association of His139Arg polymorphism and increased risk of HNSCC (32).

Different combinations, in a single individual biometabolism, of *GSTs*, *CYPs* and *mEHs* polymorphisms associated with smoking and alcohol consumption may increase the risk for HNSCC. In addition, these polymorphisms also may influence in the metastasis and aggressiveness potential. (12,13,17,18,35,36).

Therefore, the aims of this study were to investigate the frequency of single nucleotide polymorphisms (SNPs), *CYP1A1* T3801C, *CYP1A1* A2455G, *CYP2E1* C-

1019T, *CYP2E1* A7766G, *GSTP1* A313G, *GSTP1* C341G (also known as *MspI*, *NcoI*, *PstI*, *DraI*, *BsmI* and *AciI* polymorphisms respectively); *GSTT1* and *GSTM1* null; *mEH* Tyr113His and *mEH* His139Arg polymorphisms in patients with HNSCC and to compare with a population of individuals without history of neoplasia, evaluate the association between these polymorphisms and risk factors (tobacco, alcohol, gender and age) and evaluate the distribution of genotypes according to clinical histopathological parameters of HNSCC.

PATIENTS AND METHODS

Study subjects: After approval by the National Ethics Committee (CONEP—No. 5566/2005) Research Ethics Committee(CEP – No. 3342/2007) of Medicine School – FAMERP and obtaining of the Consent Term, peripheral blood leukocyte samples were collected from 1.100 individuals 375 patients with HNSCC and 725 individuals without history of cancer – controls. The case group (87.32% men and 12.68% women) was treated at the Hospital de Base, a Public Institution, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. Diagnosis was made from pathological specimens after either total excision or biopsy. Patients with squamous cell carcinoma tumour cell types were included and patients previously treated for tumors were excluded. The TNM classification was utilized to stage tumors following three criteria: extension of the tumor (T), presence of regional lymph node involvement (N) and presence of metastasis at a distance (M) (37). The clinical stage (TNM) also was used to analyze aggressiveness being the tumors classified as non-aggressive (Stages I and II) and aggressive (Stages III and IV).

The control group comprised Brazilian blood donors (71.89% men and 28.11% women) without cancer according to the government guidelines for blood donation which include tests for 20 related diseases (<http://www.hemonline.com.br/portarias/rdc153/indexframe.htm>). Individuals with family history of cancer were excluded and individuals aged over 40 years were included in this study. Each eligible subject was interviewed to obtain data on demographic and lifestyle factors.

Genotyping: To determine the individual genotypes, genomic DNA was obtained from peripheral blood according to the technique of Miller et al. (38). The PCR-RFLP assay was used to identify the *CYP1A1**2A (T3801C), *CYP2E1**5B (C-1019T), *CYP2E1**6 (A7766G), *GSTP1* A313G and *GSTP1* C341T polymorphisms with *MspI*, *PstI*, *DraI*, *BsmI*, and *AciI* enzymes, respectively (39-43). The conventional polymerase chain reaction (PCR) technique was utilized for genotyping of *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms observing difference in size of amplification. A sequence of *CYP1A1* gene was used as control. The allelic discrimination for Real-Time PCR - SNP Genotyping Assay was used to identify the *CYP1A1**2C (TaqMan probe: Assay C__25624888_50), *mEH* Tyr113His (TaqMan probe: Assay C__14938_30) and *mEH* His139Arg (TaqMan probe: Assay C__11638783_30) polymorphisms in Step One Plus TM Real-Time PCR System equipment (Applied Biosystems).

Statistical analysis: Groups were compared by the chi-square test (univariate analysis), utilizing the BioEstat computer program. The total number of individuals used in the statistical analysis for each polymorphism is specified on Table I. In order to perform multivariable analysis, only patients with all the variables were included, resulting in 615 individuals, including 213 patients with HNSCC and 402 controls. The

following variables were included: gender (reference: female), tobacco habit (reference: non-smokers), alcohol habit (reference: non-drinkers) and polymorphisms (reference: selvage genotype) using the Minitab for Windows computer program (Version 12.22). This model was also used to determine the interaction effect between the genetic polymorphism and variables related to head and neck squamous cell carcinoma.

We also evaluated the association between the disease risk and the combined risk alleles, being considered risk 0 for one deleterious allele, as reference, because there was no individual that presented all wild-type genotypes, risk 1 for two or three deleterious allele, risk 2 for four or five deleterious alleles, risk 3 for six or seven deleterious alleles and risk 4 for eight deleterious alleles or more.

Individuals who had smoked more than 100 cigarettes in their lifetime were considered smokers and individuals who drank 4 doses of alcohol per week were considered alcohol consumers (44,45). The clinical histopathological parameters (primary site, TNM staging and aggressiveness) and association with polymorphisms also were analyzed by Multiple Regression Logistic test. Results are shown as odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% CI). $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

To evaluate survival rates was used the Kaplan-Meier method, the period between the diagnosis of disease and death was considered as *end point*.

RESULTS

There were statistically significant differences between patients and controls regarding *CYP2E1**6 and *GSTP1* A313G polymorphisms ($p < 0.05$) (Table I, univariate analysis).

In the multivariable analysis, the results showed that age ≥ 49 years (OR=10.52; 95% CI=6.49-17.04; $p < 0.05$), tobacco (OR=3.60; 95% CI=2.15-6.02; $p < 0.05$) and alcohol (OR=1.62; 95% CI=0.99-2.65; $p < 0.05$) confer an increased risk to HNSCC. Regarding genotype distributions, the differences were not statistically significant between groups and did not show association with HNSCC risk (Table II).

The distribution of the genotypes and exposure to risk factors for head and neck cancer showed decreased HNSCC risk for the presence of *CYP1A1*2C* polymorphism (at least one polymorphic allele) in the subgroup of female gender individuals with OR = 0.10 (95% CI=0.01-0.72; $p < 0.05$) and of the alcohol no-habit individuals with OR = 0.21 (95% CI=0.07-0.67; $p < 0.05$), and for the presence of *mEH* His139Arg polymorphism (at least one polymorphic allele) in alcohol habit individuals with OR= 0.49 (95% CI=0.27-0.90; $p < 0.05$).

The increased HNSCC risk was observed in tobacco and no-alcohol habit individuals in the presence of the *CYP1A1*2A* polymorphism (at least one polymorphic allele) (OR= 2.84; 95% CI=1.01-7.97; $p < 0.05$ and OR= 2.43; 95% CI=1.00-5.87; $p < 0.05$, respectively). The presence of *CYP2E1*5B* polymorphism (at least one polymorphic allele) in tobacco no-habit individuals increases the risk of HNSCC (OR= 3.75; 95% CI=1.25-11.23; $p < 0.05$).

For deleterious alleles analysis, we did not find any relation between allele number and increased risk for head and neck cancer (risk 1: reference; risk 2: OR: 0.71; 95% CI: 0.17-2.98, $p=0.641$; risk 3: OR: 1.00; 95% CI: 0.26-3.92, $p=0.998$; risk 4: OR: 1.27; 95% CI: 0.33-4.91, $p=0.726$).

Regarding the analysis of polymorphisms and clinical parameters, there were higher frequency of *CYP1A1*2C* polymorphism (OR= 2.48; 95% CI=1.00-6.20; $p <$

0.05) and *GSTT1* polymorphism (OR= 3.35; 95% CI=1.67-6.72; $p < 0.05$) in the group of patients with larynx as primary site; *GSTT1* polymorphism (OR=0.29; 95% CI=0.12-0.71; $p < 0.05$) presents lower frequency in the group of patients with pharynx as primary site with. *CYP1A1**2A polymorphism was associated lymph node involvement and increased risk for HNSCC (OR =2.45; 95% CI= 1.07-5.64) (Table III).

Among the studied polymorphisms *CYP1A1**2A ($p = 0,696$), *CYP1A1**2C ($p = 0,837$), *CYP2E1**5B ($p = 0,199$), *CYP2E1**6 ($p = 0,728$), *GSTT1* ($p = 0,895$), *GSTM1* ($p = 0,220$), *GSTP1* A313G ($p = 0,895$), *GSTP1* C341G ($p = 0,682$), *mEH* Tyr113His ($p = 0,566$) and *mEH* His139Arg ($p = 0,436$) none were associated to overall survival (data not shown).

DISCUSSION

The results of this study confirms reports in the literature on HNSCC epidemiology, showing a higher frequency of this tumor type in individuals with the age ≥ 49 years (25,46,47), smokers and alcohol consumers (8,16,48-50).

The results of univariate analysis showed significant differences between groups with respect genotype distributions for *CYP2E1**6 and *GSTP1* A313G polymorphisms similar to the data reported by Sugimura et al. in 2006 (51) and Singh et al. in 2008 (13), respectively.

Sugimura et al (2006) that evaluated 122 oral squamous cell carcinoma cases (OSCC) and 241 controls Japanese found that *CYP2E1**6 polymorphic genotype was significantly associated the OSCC risk (51), and Singh et al (2008) that studied 175 HNSCC patients and 200 healthy controls showed that *GSTP1* 313AG or GG genotypes modified the susceptibility to HNSCC (13).

Multivariable analysis performed after adjusting for age, gender, tobacco and alcohol consumption showed that *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C*, *CYP2E1*5B*, *CYP2E1*6*, *GSTT1*, *GSTMI*, *GSTP1 A313G*, *GSTP1 C341G*, *mEH Tyr113His* and *mEH His139Arg* polymorphisms did not associated with HNSCC risk. According to studies of Boccia et al. (2008), Buch et al. (2008) and Canova et al. (2009) that also did not found association between these polymorphisms and HNSCC (48,52,53).

In other hand, studies showed association between polymorphic genotype and the increased risk for disease to polymorphisms *CYP1A1*2A* (39,54-57), *CYP1A1*2C* (57-59), *CYP2E1*5B* (18,60-62), *CYP2E1*6* (51,63,64), *GSTT1* (10,13,22,23,30,46), *GSTMI* (10,13,22,23,46,65), *GSTP1 A313G* (13,66-68), *GSTP1 C341G* (69-71), *mEH Tyr113His* (33,34,72) and *mEH His139Arg* (21,32,34,73).

In our study, the analyses of polymorphisms and risk factors in the subgroup of female gender and of alcohol no-habit individuals showed that the *CYP1A1*2C* polymorphism decreased risk for HNSCC, it strengthens our multivariable analysis, in which the alcohol no-habit and the presence of this polymorphism were not related to the development of HNSCC. Regarding the decreased risk for HNSCC in the presence of the polymorphism in female gender there are no studies investigating this interaction, furthermore it is known that male gender is a risk factor well-established for HNCC (74).

The decreased risk for HNSCC in the presence of *mEH His139Arg* polymorphism in alcohol habit individuals also has not yet been reported in literature. Study have shown that the presence of polymorphism *mEH* can be associated with increased enzymatic activity (16), potentiating the carcinogenic effects, however, in our population this effect was no evidenced.

We also found increased risk for HNSCC in individuals that present *CYP1A1*2A* polymorphism and alcohol no-habit, and that present the *CYP2E1*5B* polymorphism with tobacco no-habit, suggesting that these polymorphisms in those subgroup of individuals studied may influence the HNSCC development even without the exposition to risk factors, corroborating with study performed by Sam et al. 2008 that showed association of *CYP1A1*2A* polymorphic genotype with alcohol no-habit in Indian population (56). However, our study showed association between tobacco habit and *CYP1A1*2A* polymorphism as Sam et al. (56) study. Sugimura et al. (51) showed that the *CYP2E1*5B* polymorphism was associated with tobacco habit, different from our finding.

The analysis for deleterious alleles showed no association between allele number and increased risk for head and neck cancer. There are no studies in the literature relating deleterious alleles and all polymorphisms evaluated in this study.

Concerning the clinical parameters, our results showed a higher frequency of *CYP1A1*2C* polymorphism in patients with larynx as primary site, confirming studies of Varzim et al., 2003; Gattas et al., 2006; Tai et al., 2010 (18,59,75). The *GSTT1* polymorphism presented lower frequency in patients with pharynx as primary site, as study of Evans et al., 2004 (11).

In other hand, our study found that the *GSTT1* polymorphism was more frequent in patients with larynx as primary site and we found that lymph node involvement was associated with *CYP1A1*2A* polymorphism and increased risk for HNSCC. There are no data in literature that confirm these results.

In conclusion, this study confirm that variables age ≥ 49 years, tobacco and alcohol habits increase the risk of HNSCC and that *CYP2E1*6* and *GSTP1 A313G*

polymorphisms can be associated with this disease. The polymorphisms *CYP1A1*2C*, *mEH His139Arg*, *CYP1A1*2A*, *CYP2E1*5B* associated with demographics data and risk factors such as gender, tobacco and/or alcohol habits modulate the risk for developing HNSCC. In addition, *CYP1A1*2C*, *GSTT1* e *CYP1A1*2A* polymorphisms present different frequencies in specific primary sites and that the *CYP1A1*2A* polymorphism is associated with lymph node involvement and increased risk for HNSCC.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to participation of the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq for their support and FAMERP/FUNFARME in this study.

REFERENCES

1. Ragin CC, Modugno F, Gollin S M. (2007) The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res*. 86: 104.
2. Olivieri EHR, da Silva SD, Mendonça FF, Urata YN, Vidal DO, Faria MAM et al. (2009) *CYP1A2*1C*, *CYP2E1*5B*, and *GSTM1* polymorphisms are predictors of risk and poor outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol*, 45(9): 73-9.
3. Marcu LG, Yeoh E. (2009) A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment. *J Cancer Res Clin Oncol*, 135:1303-14.
4. Abbas A, Delvinquiére K, Lechevrel M, Lebailly P, Gauduchon P, Launoy G, Sichel F. (2004) *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *CYP1A1* genetic polymorphisms and susceptibility esophageal cancer in French population: Different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol*, 23, 3389-93.
5. Ruiz MT, Pavarino-Bertelli E, Maniglia JV, Ruback MJC, Goloni-Bertollo E. (2006) Head and neck cancer epidemiology and biomarkers. *Arq Ciênc Saúde*, 13: 34-38.
6. Rusin P., Markiewicz Ł., Majsterek I. (2008) Genetic predeterminations of head and neck cancer. *Postepy Hig Med Dosw*, 62: 490-501.
7. Colombo J, Rahal P. (2009) Alterações genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 55(2):165-174.
8. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. (2011) The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. Jan;11(1):9-22.
9. Hung R.J., Van Der H.O., Tavtigian S.V., Brennan P., Boffetta P. and Hashibe M. (2005) Perspectives on the molecular epidemiology of aerodigestive tract cancers, *Mutat Res*; 592 (1-2), pp. 102-118.
10. Lacko M, Oude Ophuis MB, Peters WH, Manni JJ. (2009) Genetic polymorphisms of smoking-related carcinogen detoxifying enzymes and head and neck cancer susceptibility. *Anticancer Res*, 29(2):753-61.
11. Evans 4AJ, Henner WD, Eilers KM, Montalto MA, Wersinger EM, Andersen PE, Cohen JI, Everte EC, MC Williams JE, Beer TM. (2004) Polymorphisms of *GSTT1* and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck*, 26, 63-70.
12. Liu CJ, Chang CS, Lui MT, Dang CW, ShihYH, Chang KW. (2005) Association of *GST* genotypes with age of onset and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol*, 54, 475-81.

13. Singh M, Shah PP, Singh AP, Ruwali M, Mathur N, Pant MC, Parmar D. (2008) Association of genetic polymorphisms in glutathione S-transferases and susceptibility to head and neck cancer. *Mutat Res*, Feb 1; 638(1-2): 184-94.
14. Jancovaa P, Anzenbacherb P, Anzenbacherovaa E. (2010) Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. Jun; 154(2):103–116.
15. Omiecinski C J, Vanden Heuvel J P, Perdew G H, Peters J M. (2011) Xenobiotic Metabolism, Disposition and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities. *Toxicol Sci*. Mar;120 Suppl 1:S49-75.
16. Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. (2008) Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk (Review). *Int J Oncol*. 32: 945-73.
17. Sumathi B, Ramalingam S, Navaneethan U, Jayanthi V. (2009) Risk factors for gastric cancer in South India. *Singapore Med J*. 50(2): 147-51.
18. Gattas GJF, De Carvalho MB, Siraque MS, Curioni OA, Kohler P, Eluf-Neto J, et al. (2006) Genetic polymorphisms of *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, and *GSTT1* associated with head and neck cancer. *Head Neck* 28: 819-826.
19. Hildesheim A, Anderson LM, Chen CJ, Cheng YJ, Brinton LA, Daly AK, et al. (1997) *CYP2E1* genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J Natl Cancer*. 89: 1207-1212.
20. Gajecka M, Rydzanicz M, Jaskula-Sztul R, Kujawski M, Szyfter W, Szyfter K. (2005) *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *NAT2*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms or their combinations are associated with the increased risk of the laryngeal squamous cell carcinoma. *Mutat Res*. 574: 112-123.
21. Amador AG, Righi PD, Radpour S, Everett ET, Weisberger E, Langer M, et al. (2002) Polymorphisms of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 93(4):440-5.
22. Sam SS, Vinod T, Reddy KS, Gopalakrishnan S, Adithan C. (2007) Genetic polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) and upper aerodigestive tract cancer risk among smokers, tobacco chewers and alcoholics in a Indian population. *Eur J Cancer*, 43(18):2698-706.
23. Singh H, Sachan R, Devi S, et al. (2008) Association of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTM3* gene polymorphisms and susceptibility to cervical cancer in aNorth Indian population. *Am J Obstet Gynecol*, 198:303.e1-303.e6.

24. To-Figueras J, Gené M, Gómez-Catalán J, Piqué E, Borrego N, Caballero M, et al. (2002) Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphism in relation to laryngeal carcinoma risk. *Cancer Lett*, 187:95-101.
25. Buch SC, Notani PN, Bhisey RA. (2002) Polymorphism at *GSTM1*, *GSTM3* and *GSTT1* gene loci and susceptibility to oral cancer in an Indian population. *Carcinogenesis*. 23(5):803-807.
26. Chang HW, Ling GS, Wei WI, Yuen AP. (2004) Smoking and drinking can induce p15 methylation in the upper aerodigestive tract of healthy individuals and patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 101:125-32.
27. Biselli JM, Leal RCAC, Ruiz MT, Maniglia JV, Rossit ARB, et al (2006) Polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* em indivíduos tabagistas com carcinoma epinocelular de cabeça e pescoço. *Rev Bras Otorinolaringol*. 72: 654-8.
28. Goloni-Bertollo EM, Biselli JM, Correa LCL, Maniglia JV, Rossit ARB, Ruiz MT. et al., (2006) Avaliação da influência da nulidade dos genótipos *GSTT1* e *GSTM1* na carcinogênese em cabeça e pescoço. *Rev Assoc Med Bras* 52, 365-8.
29. Rossini A, Rapozo DCM, Soares Lima SC, Guimarães DP, Ferreira MA, Teixeira R, et al. (2007) Polymorfisms of *GSTP1* and *GSTT1*, but not of *CYP2A6*, *CYP2E1* or *GSTM1*, modify the risk for esophageal cancer in a western population. *Carcinogenesis*, 28(12):2537-2542.
30. Hatagima A, Costa ECB, Marques CFS, Koifman RJ, Boffetta P, Koifman S. (2008) Glutathione S-transferase polymorfisms and oral cancer: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncology*. 44:200-207.
31. Jain M, Kumar S, Rastogi N, Lal P, Ghoshal UC, Tiwari A et al. (2006) *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1* genetic polymorphisms and interaction with tobacco, alcohol and occupational exposure in esophageal cancer patients from North India. *Cancer Lett*; 242: 60-67.
32. Jourenkova-Mironova N, Mitrunen K, Bouchardy C, Dayer P, Benhamou S, Hirvonen A. (2000) High-activity microsomal epoxide hydrolase genotypes and the risk of oral, pharynx, and larynx cancers. *Cancer Res*; 60 (3): 534-6.
33. Park JY, Schants SP and Lazarus P (2003) Epoxide hydrolase genotype and oropharyngeal cancer risk: interaction with *GSTM1* genotype. *Oral Oncol* 39: 483-490.
34. Lacko M, Roelofs HM, Te Morsche RH, Voogd AC, Oude Ophuis MB, Peters WH, et al., (2008) Microsomal epoxide hydrolase genotypes and the risk for head and neck cancer. *Head Neck*; 30(7): 836-44.

35. Leichsenring A., Losi-Guembarovski R, Maciel ME, Losi-Guembarovski A, Oliveira BW, Ramos G, et al. (2006) CYP1A1 and GSTP1 polymorphisms in an oral cancer case-control study. *Braz J Med Biol Res*; 39: 1569-1574.
36. Ho T, Wei Q, Sturgis EM. (2007) Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*; 29(7): 682-99.
37. Sobin LH, Wittelind CH. (2000) Internacional union against cancer: TNM classification of malignant tumours. 6th ed edn. *Wiley, New York*.
38. Miller SA, Dikes DD, Polesky HF. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16:1215.
39. Cha I-H, Park JY, Chung W-Y, Choi M-A, Kim, H-J, Park K-k. (2007) Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 genes and susceptibility to oral cancer. *Yonsci Med J*; 48: 233-9.
40. Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Hoover RN, Trump BF, Sugimura H, et al. (1992) Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res*; 52: 6712-6715
41. Hirvonen A, Husgafvel-Pursianen K, Karjalainen A, Antilla S, Vainio H (1993) The human CYP2E1 gene and lung cancer: DraI and RsaI restriction length polymorphisms in a Finnish study population. *Carcinogenesis*; 14: 85-88.
42. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. (1997) Identification of genetic polymorphisms at the glutathione-S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*; v.18, p.641-644.
43. Watson MA, Stewart RK, Smith GBJ, et al. (1998) Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*, 19:275-80.
44. Kjaerhein K, Gaard M, Andersen A. (1998) The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancer: a prospective study of 10.900 Norwegian men. *Cancer Causes and Control*, 9: 99-108.
45. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang M-J, Sidransky JJD. (2000) Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, v. 60, p.3155-3159.
46. Leme CV, Raposo LS, Ruiz MT, Biselli JM, Galbiatti AL, Maniglia JV, Pavarino-Bertelli EC, Goloni-Bertollo EM. (2010) GSTM1 and GSTT1 genes analysis in head and neck cancer patients. *Rev Assoc Med Bras*. May-Jun; 56(3):299-303.

47. Galbiatti AL, Ruiz MT, Rezende Pinto D, Raposo LS, Maníglia JV, Pavarino-Bertelli EC, Goloni-Bertollo EM. (2011) A80G polymorphism of reduced folate carrier 1 (RFC1) gene and head and neck squamous cell carcinoma etiology in Brazilian population. *Mol Biol Rep.* Feb; 38(2): 1071-8.
48. Boccia S, Cadoni G, Sayed-Tabatabaei FA, Volante M, Arzani D, De Lauretis A, Cattel C, Almadori G, van Duijn CM, Paludetti G, Ricciardi G. (2008) *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *EPHX1* exons 3 and 4, and *NAT2* polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* Jan; 134(1): 93-100.
49. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, et al. (2009) 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.* 18 (2):541–50.
50. Attar E, Dey S, Hablas A, Seifeldin IA, Ramadan M, Rozek LS, Soliman AS. (2010) Head and neck cancer in a developing country: a population-based perspective across 8 years. *Oral Oncol;* Aug; 46(8): 591-6.
51. Sugimura T, Kumimoto H, Tohnai I, et al (2006) Gene-environment interaction involved in oral carcinogenesis: molecular epidemiological study for metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *J Oral Pathol Med*, 35: 11-18.
52. Buch SC, Nazar-Stewart V, Weissfeld JL, Romkes M. (2008) Case-control study of oral and oropharyngeal cancer in whites and genetic variation in eight metabolic enzymes. *Head Neck*; 30(9):1139-47.
53. Canova C, Hashibe M, Simonato L, Nelis M, Metspalu A, Lagiou P, et al., (2009) Genetic associations of 115 polymorphisms with cancers of the upper aerodigestive tract across 10 European countries: the ARCAGE project. *Cancer Res*; Apr 1; 69(7): 2956-65.
54. Houlston RS (2000) CYP1A1 polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis. *Pharmacogenetics* 10(2): 105-114.
55. Goodman M T, McDuffie K, Hernandez B et al (2001) CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and the risk of cervical squamous intraepithelial lesions in a multiethnic population. *Gynecol Oncol* 81: 263-269.
56. Sam SS, Thomas V, Reddy SK, Surianarayanan G, Chandrasekaran A. (2008) *CYP1A1* polymorphisms and the risk of upper aerodigestive tract cancers in an Indian population. *Head Neck*, Dec;30(12):1566-74.

57. Singh AP, Shah PP, Mathur N, Buters JT, Pant MC, Parmar D. (2009) Genetic polymorphisms in cytochrome P4501B1 and susceptibility to head and neck cancer. *Mutat Res.* Mar 1;639(1-2):11-9. Epub 2007 Nov 5.
58. Hashibe M, Brennan P, Strange RC, Bhisey R, Cascorbi I, Lazarus P, et al., (2003) Meta- and pooled analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 12, 1509-17.
59. Tai J, Yang M, Ni X, Yu D, Fang J, Tan W, Huang Z, Wu C, Chen X, Wang G, Zhou W, Chen X, Zhang W, Ma L, Lin D, Han D. (2010) Genetic polymorphisms in cytochrome P450 genes are associated with an increased risk of squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx in a Chinese population. *Cancer Genet Cytogenet.* 1;196(1):76-82.
60. Matthias C, Jahnke V, Jones PW, Hoban PR, Alldersea JE, Worrall SF, et al (1999) Cyclin D1, Glutathione S-Transferase, and Cytocrome P450 genotypes and outcome in patients with upper aerodigestive tract cancers: assessment of the importance of individual genes using multivariate analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 815-823

SUPPLEMENTAL INFORMATION

61. Neuhaus T, Ko YD, Lorenzen K, Fronhoffs S, Harth V, Bröde P et al (2004) Association of cytochrome P450 2E1 polymorphisms and head and neck squamous cell cancer. *Toxicol Lett* 151: 273-282.
62. Marques CFS, Koifman S, Koifman RJ, Boffetta P, Brennan P, Hatagima A (2006) Influence of CYP1A1, CYP2E1, GSTM3 and NAT2 genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: results from a case-control study in Rio de Janeiro. *Oral Oncol.* 42: 632-637.
63. Kongruttanachok N, Sukdikul S, Setavarin S, et al., (2001) Cytochrome P4502E1 polymorphism and nasopharyngeal carcinoma development in Thailand: a correlative study. *BMC Cancer* 1: 4.
64. Agulnik M. (2007) Malignancies of head and neck: the role for molecular targeted agents. *Expert Opin Ther Targets.* Feb;11(2):207-17. Review
65. Zhuo W, Wang Y, Zhuo X, Zhu Y, Wang W, Zhu B, Li D, Chen Z. (2009) *CYP1A1* and *GSTM1* polymorphisms and oral cancer risk: association studies via evidence-based meta-analyses. *Cancer Investigation*, 27(1):86-95.
66. Park JY, Schantz SP, Stern JC, Kaur T and Lazarus P (2000) Association between glutathione S-transferase π genetic polymorphisms and oral cancer risk.

- Pharmacogenetics* 9(4): 497-504, 1999. Erratum in: *Pharmacogenetics*. Jun; 10(4):371.
67. Cho CG, Lee SK, Nam SY, Lee MS, Lee SW, Choi EK et al. (2006) Association of the GSTP1 and NQO1 polymorphisms and head and neck squamous cell carcinoma risk. *J Korean Med Sci.*; v. 21, p. 1075-1079.
68. Chen YC, Hunter DJ. (2008) Molecular Epidemiology of Cancer. *CA Cancer J Clin.*; 55: 45-54.
69. Li D, Wang LE, Chang P, El-Naggar AK, Sturgis EM, Wei Q. (2007) In vitro benzo[a]pyrene diol epoxide-induced DNA adducts and risk of squamous cell carcinoma of head and neck. *Cancer Res.* 15; 67(12): 5628-34.
70. Ada AO, C Kunak S, Hancer F, Bilgen S, Suzen SH, Alpar S, Gulhan M, Kurt B, Iscan M. (2010) CYP and GST polymorphisms and survival in advanced non-small cell lung cancer patients. *Neoplasma*; 57(6): 512-21.
71. Northwood EL, Elliott F, Forman D, Barrett JH, Wilkie MJ, Carey FA, Steele RJ, Wolf R, Bishop T, Smith G. (2010) Polymorphisms in xenobiotic metabolizing enzymes and diet influence colorectal adenoma risk. *Pharmacogenet Genomics*. May;20(5):315-26.
72. Wenghoefer M, Pesch B, Harth V, et al. (2003) Association between head and neck cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Arch Toxicol*, 77: 37-41.
73. Varela-Lema L, Ruano-Ravina A, Juiz Crespo MA, Kelsey KT, Loidi L, Barros-Dios JM. (2008) *CYP1A1*, *mEH*, and *GSTM1* Polymorphisms and Risk of Oral and Pharyngeal Cancer: A Spanish Case-Control Study. *J Oncol*, 741310.
74. Instituto Nacional do Câncer – <http://www.inca.gov.br>. Acessado em 31 de janeiro de 2011.
75. Varzim G, Monteiro E, Silva RA, Fernandes J and Lopes C (2003) *CYP1A1* and *XRCC1* gene polymorphisms in SCC of the larynx. *Eur J Cancer Prev*, 12: 495-499.

Table I. Distribution of genotypes and percentages in univariate analysis.

Genotypes	Patients n (%)	Controls n (%)	p-value
<i>CYP1A1</i>*2A⁺	334	546	0.49
TT	220 (65.87)	347 (63.56)	
TC	108 (32.33)	164 (30.04)	
CC	6 (1.80)	35 (6.40)	
<i>CYP1A1</i>*2C⁺⁺	350	519	0.92
AA	275 (78.57)	409 (78.80)	
AG	72 (20.57)	93 (17.92)	
GG	3 (0.86)	17 (3.28)	
<i>CYP2E1</i>*5B⁺⁺⁺	328	533	0.32
C1C1	289 (88.11)	457 (85.74)	
C1C2	39 (11.89)	76 (14.26)	
<i>CYP2E1</i>*6⁺⁺⁺⁺	352	533	0.01
DD	253 (71.88)	419 (78.61)	
DC	98 (27.84)	109 (20.45)	
CC	1 (0.28)	5 (0.94)	
<i>GSTT1</i>	350	538	0.08
(+)	227 (64.86)	415 (77.14)	
(-)	123 (35.14)	123 (22.86)	
<i>GSTMI</i>	350	538	0.68
(+)	190 (54.28)	284 (52.79)	
(-)	160 (45.72)	254 (47.21)	
<i>GSTP1</i> A313G	285	536	0.01
AA	149 (52.28)	233 (43.47)	
AG	109 (38.24)	234 (43.67)	
GG	27 (9.48)	69 (12.86)	
<i>GSTP1</i> C341T	265	530	0.30
CC	230 (86.79)	473 (89.24)	
CT	34 (12.83)	53 (10.00)	
TT	1 (0.38)	4 (0.76)	
<i>mEH</i> Tyr113His	225	451	0.70
TT	115 (51.11)	237 (52.55)	
TC	89 (39.56)	180 (39.91)	
CC	21 (9.33)	34 (7.54)	
<i>mEH</i> His139Arg	235	421	0.15
AA	154 (65.53)	252 (59.86)	
AG	68 (28.94)	148 (35.15)	
GG	13(5.53)	21(4.99)	

⁺ The polymorphism *CYP1A1**2A result in the alteration T3801C;

⁺⁺ The polymorphism *CYP1A1**2C result in the alteration A2455G;

⁺⁺⁺ The polymorphism *CYP2E1**5B result in the alteration C-1019T;

⁺⁺⁺⁺ The polymorphism *CYP2E1**6 result in the alteration A7766G.

Table II. Distribution of demographic data, risk factors, *CYP1A1**2A, *CYP1A1**2C, *CYP2E1**5B, *CYP2E1**6, *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* A313G, *GSTP1* C341G, *mEH* Tyr113His and *mEH* His139Arg genotypes, and odds ratio (OR) for head and neck squamous cell carcinoma in multivariable analysis.

Variables	Patients (n=213)	Controls (n=402)	OR (IC 95%)	p-value
	n (%)	n (%)		
Age				
< 49 years	29 (13.61)	273 (67.91)	1.00 (ref)	
≥ 49 years	184 (86.39)	129 (32.08)	10.52 (6.49-17.04)	< 0.05
Gender				
Female	27 (12.68)	113 (28.11)	1.00 (ref)	
Male	186 (87.82)	289 (71.89)	1.46 (0.81-2.64)	0.209
Tobacco Habit				
No	34 (15.96)	229 (56.97)	1.00 (ref)	
Yes	179 (84.04)	173 (43.03)	3.60 (2.15-6.02)	< 0.05
Alcohol Habit				
No	57 (26.76)	213 (52.99)	1.00 (ref)	
Yes	156 (73.24)	189 (47.01)	1.62 (1.00-2.65)	< 0.05
<i>CYP1A1</i>*2A⁺ genotype				
wt/wt	136 (63.85)	247 (61.44)	1.00 (ref)	
wt/ml or ml/ml	77 (36.15)	155 (38.56)	1.41 (0.83-2.39)	0.199
<i>CYP1A1</i>*2C⁺⁺ genotype				
AA	166 (77.93)	314 (78.11)	1.00 (ref)	
AG/GG	47 (22.07)	88 (21.89)	0.85 (0.46-1.55)	0.595
<i>CYP2E1</i>*5B⁺⁺⁺ genotype				
C1C1	188 (88.26)	355 (88.30)	1.00 (ref)	
C1C2/C2C2	25 (11.74)	47 (11.70)	1.23 (0.64-2.36)	0.538
<i>CYP2E1</i>*6⁺⁺⁺ genotype				
DD	163 (76.53)	319 (79.35)	1.00 (ref)	
DC/CC	50 (23.77)	83 (20.65)	1.14 (0.68-1.89)	0.625
<i>GSTT1</i> genotype				
(+)	140 (65.73)	311 (77.36)	1.00 (ref)	
(-)	73 (34.27)	91 (22.64)	1.40 (0.87-2.24)	0.164
<i>GSTM1</i> genotype				
(+)	115 (54.99)	218 (54.23)	1.00 (ref)	
(-)	98 (46.01)	184 (45.77)	0.99 (0.65-1.51)	0.954
<i>GSTP1</i>A313G genotype				
AA	104 (48.83)	176 (43.78)	1.00 (ref)	
AG/GG	109 (51.17)	226 (56.22)	0.78 (0.51-1.20)	0.257
<i>GSTP1</i>C341T genotype				

CC	185 (86.85)	355 (88.31)	1.00 (ref)	
CT/TT	28 (13.15)	47 (11.69)	1.04 (0.55-1.96)	0.904
<i>mEH</i> Tyr113His genotype				
TT	106 (49.76)	226 (56.22)	1.00 (ref)	
TC/CC	107 (50.24)	176 (43.78)	1.24 (0.81-1.89)	0.326
<i>mEH</i> His139Arg genotype				
AA	140 (65.73)	246 (61.19)	1.00 (ref)	
AG/GG	73 (34.27)	156 (38.81)	0.96 (0.62-1.50)	0.873

⁺ The polymorphism *CYP1A1**2A result in the alteration T3801C;

⁺⁺ The polymorphism *CYP1A1**2C result in the alteration A2455G;

⁺⁺⁺ The polymorphism *CYP2E1**5B result in the alteration C-1019T;

⁺⁺⁺⁺ The polymorphism *CYP2E1**6 result in the alteration A7766G.

Table III. Distribution of clinical histopathological parameters in head and neck squamous cell carcinoma patients (OR (CI 95%), p value) in multivariable analysis.

Genotypes	Primary anatomic site			Tumor Extension ¹	N* involvement ²
	Oral Cavity	Larynx	Pharynx	T3/T4	Yes
<i>CYP1A1*2A</i>⁺					
TT			1.00 (reference)		
TC/CC	0.90 (0.43-1.87) 0.769	0.96 (0.43-2.14) 0.912	1.06 (0.43-2.63) 0.894	0.68 (0.29-1.59) 0.377	2.45 (1.07-5.64) <0.05
<i>CYP1A1*2C</i>⁺⁺					
AA			1.00 (reference)		
AG/GG	0.53 (0.22-1.27) 0.156	2.48 (1.00-6.20) <0.05	0.60 (0.20-1.75) 0.348	2.27 (0.91-5.65) 0.079	0.73 (0.28-1.90) 0.518
<i>CYP2E1*5B</i>⁺⁺⁺					
C1C1			1.00 (reference)		
C1C2	0.66 (0.25-1.71) 0.391	1.41 (0.54-3.70) 0.485	1.93 (0.66-5.62) 0.228	1.45 (0.56-3.78) 0.447	1.14 (0.41-3.16) 0.802
<i>CYP2E1*6</i>⁺⁺⁺⁺					
DD			1.00 (reference)		
DC/CC	1.57 (0.78-3.17) 0.207	0.66 (0.31-1.44) 0.299	0.86 (0.34-2.18) 0.743	0.91 (0.42-1.99) 0.821	1.20 (0.55-2.63) 0.651
<i>GSTT1</i>					
(+)			1.00 (reference)		
(-)	0.63 (0.33-1.22) 0.169	3.35 (1.67-6.72) <0.05	0.29 (0.12-0.71) <0.05	0.67 (0.32-1.38) 0.278	0.98 (0.47-2.04) 0.951
<i>GSTM1</i>					
(+)			1.00 (reference)		
(-)	0.61 (0.33-1.13) 0.115	1.49 (0.77-2.87) 0.235	0.69 (0.33-1.47) 0.337	0.75 (0.39-1.45) 0.393	0.94 (0.47-1.85) 0.849
<i>GSTP1 A313G</i>					
AA			1.00 (reference)		
AG/GG	1.17 (0.66-2.09) 0.590	1.02 (0.54-1.91) 0.957	0.96 (0.47-1.96) 0.905	1.24 (0.66-2.34) 0.511	0.64 (0.33-1.24) 0.182
<i>GSTP1 C341T</i>					
CC			1.00 (reference)		
CT/TT	1.08 (0.46-2.57) 0.853	0.75 (0.28-2.04) 0.580	0.60 (0.19-1.89) 0.385	2.23 (0.89-5.56) 0.085	0.82 (0.30-2.22) 0.698
<i>mEH Tyr113His</i>					

TT				1.00 (reference)		
TC/CC	0.80 (0.44-1.45) 0.462	1.23 (0.65-2.32) 0.518	1.65 (0.79-3.96) 0.184	1.00 (0.53-1.92) 0.993	0.78 (0.40-1.52) 0.466	
<i>mEH His139Arg</i>						
AA				1.00 (reference)		
AG/GG	1.03 (0.55-1.94) 0.925	1.16 (0.59-2.28) 0.657	0.66 (0.29-1.49) 0.318	1.67 (0.85-3.30) 0.139	0.95 (0.47-1.94) 0.892	

* N = regional lymph node.

Tumor Extension¹ = T1/T2 was used to reference of statistical analyze.

N* involvement² = No was used to reference statistical analyze.

⁺ The polymorphism *CYP1A1**2A result in the alteration T3801C;

⁺⁺ The polymorphism *CYP1A1**2C result in the alteration A2455G;

⁺⁺⁺ The polymorphism *CYP2E1**5B result in the alteration C-1019T;

⁺⁺⁺⁺ The polymorphism *CYP2E1**6 result in the alteration A7766G.

3 CONCLUSÕES

3. CONCLUSÕES

1. Os polimorfismos *CYP2E1*6* (*CYP2E1-DraI*) e *GSTP1* A313G podem estar associados com esta doença.
2. Os fatores de risco idade avançada, hábitos tabagista e etilista são preditores para o desenvolvimento de neoplasias de cabeça e pescoço. A menor frequência dos polimorfismos *CYP1A1*2C* em indivíduos do gênero feminino e hábito não etilista, do *mEH* His139Arg naqueles com hábito etilista, do *CYP2E1*5B* (*CYP2E1-PstI*) em indivíduos tabagistas, etilistas, com idade ≥ 49 e do *GSTP1* A313G em indivíduos tabagistas, etilistas, com idade ≥ 48 anos e gênero masculino; pode conferir uma menor suscetibilidade para o carcinoma de cabeça e pescoço; enquanto a presença do polimorfismo *CYP1A1*2A* e hábito não tabagista e não etilista e do polimorfismo *CYP2E1*5B* e hábito não tabagista aumenta o risco para esta doença, o que demonstra que a interação entre esses polimorfismos e os fatores demográficos e de risco podem modular o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço.
3. Os polimorfismos *CYP1A1*2C* e *GSTT1* apresentam frequências diferentes em sítios primários específicos, o que é evidenciado pela alta frequência dos polimorfismos *CYP1A1*2C* e *GSTT1* no grupo de pacientes com tumores primários de laringe e pela menor frequência do polimorfismo *GSTT1* naqueles que tem a faringe como sítio primário. O polimorfismo *CYP1A1*2A* está

associado ao desenvolvimento de linfonodos e risco aumentado para o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ragin CCR, Modugno F and Gollin S M. The Epidemiology and Risk Factors of Head and Neck Cancer: a Focus on Human Papillomavirus. *J Dent Res* 2007; (86): 104.
2. Olivieri EHR, da Silva SD, Mendonça FF, Urata YN, Vidal DO, Faria MAM, Nishimoto IN, Rainho CA, Kowalski LP, Rogatto SR. CYP1A2*1C, CYP2E1*5B, and GSTM1 polymorphisms are predictors of risk and poor outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 2009; 45(9): 73-9.
3. Marcu, LG & Yeoh, E. A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; (135): 1303-1314.
4. INCA – Instituto Nacional de Câncer: www.inca.gov.br, 2011.
5. Nagaraj NS. Evolving 'omics' technologies for diagnostics of head and neck cancer. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2009; 8(1): 49-59.
6. Freedman ND, Abnet CC, Leitzmann MF, Hollenbeck AR, Schatzkin A. Prospective investigation of the cigarette smoking-head and neck cancer association by sex. *Cancer* 2007; 110: 1593-1601.
7. Dedivitis RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2004; 70: 35-40.
8. Lung T, Tascau OC, Almasan HA, Muresan O. Head and neck cancer, epidemiology and histological aspects- Part 1: A decade's result 1993-2002. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2007; 35: 120-5.

9. Iamarron A, Pattanaporn K, Pongsiriwet S, Wanachantararak SW, Prapayasatok S, Jittidecharaks S, et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 84-8.
10. Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2008; 83: 489-501.
11. Goldstein DP, Irish JC. Head and neck squamous cell carcinoma in the young patient. *Curr Opin Otolaryngol & Head Neck Surg* 2005; 13:207-11.
12. Evans M, Powell NG. The changing aetiology of head and neck cancer: the role of human papillomavirus. *Clin Oncol* 2010; 22(7): 538-46.
13. Rosenquist K. Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Swed Dent J Suppl* 2005; 179: 1-66
14. Hershkovich O, Shafat I, Nagler RM. Age-related changes in salivary antioxidant profile: possible implications for oral cancer. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007; 62:361-6.
15. Abbas A, Delvinquiére K, Lechevrel M, Lebailly P, Gauduchon P, Launoy G, Sichel F. *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *CYP1A1* genetic polymorphisms and susceptibility esophageal cancer in French population: Different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol* 2004; 23: 3389-93.
16. Ruiz MT, Pavarino-Bertelli E, Maniglia JV, Ruback MJC, Goloni-Bertollo E. Head and neck cancer epidemiology and biomarkers. *Arq Ciênc Saúd* 2006; 13: 34-38.

17. Agulnik M. Malignancies of head and neck: the role for molecular targeted agents. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11(2): 207-17. Review
18. Rusin P., Markiewicz Ł., Majsterek I. Genetic predeterminations of head and neck cancer. *Postepy Hig Med Dosw* 2008; 62: 490-501.
19. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; (371):1695-1709.
20. Muscat JE, Chen G, Knipe A, Stellman SD, Lazarus P, Richie JP Jr. Effects of menthol on tobacco smoke exposure, nicotine dependence, and NNAL glucuronidation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(1): 35-41.
21. Colombo J, Rahal P. Alterações genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2009; 55(2): 165-174.
22. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(1): 9-22.
23. Pereira F P, Tang D, Tu Y H, Cruz L A, Borjas M, Bernert T, et al. Biomarkers in maternal and Newborn blood indicate heightened fetal cancerizing to procarcinogenic DNA damage. *Environ Healt perspect* 2004; 112: 1133-6.
24. Pytynia KB, Grant JR, Etzel CJ, *et al.* Matched-pair analysis of survival of never smokers and ever smokers with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3981-88.
25. Boffetta P, Hasbhibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 2006; 7: 149-56.
26. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 16; 99(10): 777-

89. Erratum in: *J Natl Cancer Inst.* 2008 Feb 6;100(3):225. Fernandez, Leticia [added].
27. Warnakulasuriya S, Parkkila S, Nagao T, Preedy VR, Pasanen M, Koivisto H et al. Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia (pre-cancer) and cancer. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 157-65.
28. Lee YC, Boffetta P, Sturgis EM, Wei Q, Zhang ZF, Muscat J, et al. Involuntary amoking and head and neck cancer risk: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17:1974-81.
29. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang M-J, Sidransky JJD. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 3155-3159.
30. Sharp AJ, Cheng Z, Eichler EE. Structural variation of the human genome. *Annu Rev Genomics Human Genet.* 2006; 7: 407-42.
31. Abecasis G, Tam PK-H, Bustamante CD, Ostranger EA, Shredler SW. Human genome variation 2006: emerging views on structural variation and large SNP analysis. *Nat Genet* 2007; 39: 153-155.
32. Estivill X, Armengol L. Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. *Plos Genet* 2007; 3: 1787-1799.
33. Rogin, CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Den Res* 2007; 86: 104-114.
34. Parmigiani RB, Camargo AA. O genoma Humano e o Câncer. In: Ferreira, CG; Rocha, JC (Org.). *Oncologia Molecular*. São Paulo: Editora Atheneu 2004; 3-11.

35. Lacko M, Ophuis MBO, Peters WHM, Manni JJ. Genetic polymorphisms of smoking-related carcinogen detoxifying enzymes and head and neck cancer susceptibility. *Anticancer Research* 2009; 29: 753-62.
36. Ginsberg G, Smolenski S, Hattis D, Guyton KZ, Johns DO, Sonawane B. Genetic Polymorphism in Glutathione Transferases (GST): Population distribution of GSTM1, T1, and P1 conjugating activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009; 12(5-6): 389-439.
37. Omiecinski CJ, Vanden Heuvel JP, Perdew GH, Peters JM. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol Sci.* 2011 Mar;120 Suppl 1: S49-75.
38. Juliano, R. L., and Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 1976; 455(1): 152-162.
39. Pal D, Kwatra D, Minocha M, Paturi DK, Budda B, Mitra AK. Efflux transporters- and cytochrome P-450-mediated interactions between drugs of abuse and antiretrovirals. *Life Sci.* 2010 Oct 31. [Epub ahead of print]
40. Geisler SA, Olshan AF. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2001; 154: 95–105.
41. Leichsenring A., Losi-Guembarovski R, Maciel ME, Losi-Guembarovski A, Oliveira BW, Ramos G, et al. CYP1A1 and GSTP1 polymorphisms in an oral cancer case-control study. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 1569-1574.
42. Singh M, Shah PP, Singh AP, Ruwali M, Mathur N, Pant MC, Parmar D. Association of genetic polymorphisms in glutathione S-transferases and susceptibility to head and neck cancer. *Mutat Res*, 2008; 638(1-2): 184-94.

43. Sumathi B, Ramalingam S, Navaneethan U, Jayanthi V. Risk factors for gastric cancer in South India. *Singapore Med J.*, 2009; 50(2): 147-51.
44. Lynch T, Price A. The effects of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Phys* 2007; 76: 391-6.
45. Cha I-H, Park JY, Chung W-Y, Choi M-A, Kim, H-J, Park K-k. Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 genes and susceptibility to oral cancer. *Yonsci Med J* 2007; 48: 233-9.
46. Smits KM, Schouten LJ, van Dijk BAC, van Houwelingen K, van de Kaa CAK, Kiemeney LALM, Goldbohm RA, Oosterwijk E, van den Brandt PA. Polymorphisms in genes related to activation or detoxification of carcinogens might interact with smoking to increase renal cancer risk: results from The Netherlands Cohort Study on diet and cancer. *World J Urol.* 2008 Feb; 26(1): 103-10. Epub 2007 Nov 3.
47. Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K. Genetic Polymorphism of CYP genes, alone or in combination, risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000; 9: 3–28.
48. Losi-Guembarovski R, Cólus IM, De Menezes RP, Poliseli F, Chaves VN, Kuasne H, Leichsenring A, et al. Lack of association among polymorphic xenobiotic-metabolizing enzyme genotypes and the occurrence and progression of oral carcinoma in a Brazilian population. *Anticancer Res.* 2008; 28: 1023-8.
49. Gattas GJF, De Carvalho MB, Siraque MS, Curioni OA, Kohler P, Eluf-Neto J, et al. Genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. *Head Neck* 2006; 28: 819-826.

50. Liu R, Yin LH, Pu YP. Association of combined CYP2E1 gene polymorphism with the risk for esophageal squamous cell carcinoma in Huai'an population, China. *Chin Med J* 2007; 120: 1797-802.
51. Whalen, R., and Boyer, T. Human glutathione S-transferase. *Semin. Liver Dis.* 1998; 18:345–358.
52. Seigard J, Ekstrom G. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect* 1999; 20: 743-8.
53. Roth MJ, Dowsey Sm, Wang G, Tangea JA, Zhou B, Rathnasinghe D. association between GSTM1*0 and squamous dysplasia of the esophagus in the region of Linscian. *Cancer Lett* 2000; 156: 73-81.
54. Zheng T, Holford TR, Zhahm SH, Owens PH, Boyle P, Zhang Y, Wise JP, Stephenson LP, Ali-Osman F. Cigarette smoking glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Causes Control* 2002; 13: 637-45.
55. Ye Z, Song H, Higgins JP, Pharoah P, Donesh J. Five Glutathione transferase gene variant in 23, 452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. *Plos Med* 2006; 7: 91.
56. Amador AG, Righi PD, Radpour S, Everett ET, Weisberger E, Langer M, et al. Polymorphisms of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93(4): 440-5.
57. Gronau S, Koenig-Greger D, Jerg M, Riechelmann H. Gene polymorphism in detoxification enzymes as susceptibility factor for head and neck cancer? *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 128: 674-80.

58. To-Figueras J, Gené M, Gómez-Catalán J, Piqué E, Borrego N, Caballero M, et al. Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphism in relation to laryngeal carcinoma risk. *Cancer Lett* 2002; 187: 95-101.
59. Chang HW, Ling GS, Wei WI, Yuen AP. Smoking and drinking can induce p15 methylation in the upper aerodigestive tract of healthy individuals and patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2004; 101: 125-32.
60. Biselli JM, Leal RCAC, Ruiz MT, Maniglia JV, Rossit ARB, et al. Polimorfismos GSTT1 e GSTM1 em indivíduos tabagistas com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. *Rev Bras Otorinolaringol* 2006; 72: 654-8.
61. Goloni-Bertollo EM, Biselli JM, Correa LCL, Maniglia JV, Rossit ARB, Ruiz MT. et al. Avaliação da influência da nulidade dos genótipos GSTT1 e GSTM1 na carcinogênese em cabeça e pescoço. *Rev Assoc Med Bras* 2006; 52: 365-8.
62. Sreelekla TT, Ramadas K, Pandey M, Thomas G, Nalinakumari KR, Pillai MR. Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol* 2001; 37: 593-8.
63. Buch SC, Notani PN, Bhisey RA. Polymorphism at GSTM1, GSTM3 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer in an Indian population. *Carcinogenesis* 2002; 23(5): 803-807.
64. Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. GSTM1, GSTT1, GSTP1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2000; 9: 185-91.
65. Lazarus P, Park JY. Metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 2000; 36: 421-31.

66. Tripathy CB, Nilanjan R, Meta-Analysis of Glutathione S-transferase M1 genotype and risk toward head and neck cancer. *Wiley Inter Science* 2005; 10: 217-23.
67. Jain M, Kumar S, Rastogi N, Lal P, Ghoshal UC, Tiwari A et al. GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genetic polymorphisms and interaction with tobacco, alcohol and occupational exposure in esophageal cancer patients from North India, *Cancer Lett* 2006; 242: 60-67.
68. Hatagima A, Costa ECB, Marques CFS, Koifman RJ, Boffetta P, Koifman S. Glutathione S-transferase polymorphisms and oral cancer: A case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncology* 2008; 44: 200-7.
69. Yang C-X, Matsuo K, Wang Z-M, Tajima K. Phase I/II enzyme gene polymorphisms and esophageal cancer risk: A meta-analysis of the literature. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2531-2538.
70. Li D, Dandara C, Parker MI. The 341C/T polymorphism in the GSTP1 gene is associated with increased risk of oesophageal cancer. *BMC Genet* 2010; 11: 47.
71. Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk (Review). *Int J Oncol* 2008; 32: 945-73.
72. Jourenkova-Mironova N, Mitrunen K, Bouchardy C, Dayer P, Benhamou S, Hirvonen A. High-activity microsomal epoxide hydrolase genotypes and the risk of oral, pharynx, and larynx cancers. *Cancer Res* 2000; 60 (3): 534-6.
73. Park JY, Schantz SP and Lazarus P: Epoxide hydrolase genotype and orolaryngeal cancer risk: interaction with GSTM1 genotype. *Oral Oncol* 2003; 39: 483-90.
74. Lacko M, Roelofs HM, Te Morsche RH, Voogd AC, Oude Ophuis MB, Peters WH, et al., Microsomal epoxide hydrolase genotypes and the risk for head and neck cancer. *Head Neck* 2008; 30(7): 836-44.

75. Evans 4AJ, Henner WD, Eilers KM, Montalto MA, Wersinger EM, Andersen PE, Cohen JI, Everte EC, MC Willians JE, Beer TM. Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck* 2004; 26: 63-70.
76. Liu CJ, Chang CS, Lui MT, Dang CW, ShihYH, Chang KW. Association of GST genotypes whith age of onset and lymph node metatasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol* 2005; 54: 475-81.
77. Ho T, Wei Q, Sturgis EM. Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2007; 29(7): 682-99.
78. Jancovaa P, Anzenbacherb P, Anzenbacherovaa E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2010; 154(2): 103–116.
79. Fiaschi AI, Cozzolino A, Ruggiero G, Giorgi G. Glutathione, ascorbic acid and antioxidant enzymes in the tumor tissue and blood of patients with oral squamous cell carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9: 361-7.
80. Gleiser SA, Olshan AF, Cai J, Weissler M, Smith J, Bell D. Gluatione S- Tranferase polymorfismis and survival from head and neck cancer. *Head Neck* 2005; 27: 232-42.
81. Malgorzata R, Malgorzata W, Marzena G, Witold S, Krzysztof S. The impact of genetic factors on the incidence of multiple primary tumors (MPT) of head and neck. *Cancer letters* 2005; 2: 263-78.
82. Tiwawech D, Srivatanakull P, Karalak A, Ishida T. Glutatione S- transferase M1 gene polimorfism in thai nasopharinge carcinoma. *Asian Pac J Cancer* 2005; 6: 270-5.



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei nº 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal nº 74.179 de 14/06/74)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto tomou ciência e aprovou a ampliação da metodologia datada de 11 de novembro de 2005, referente ao protocolo n.º 5566/2005 sob a responsabilidade de Maurício José Cabral Ruback, com o título "Câncer de cabeça e pescoço: um levantamento epidemiológico do Hospital de Base/FAMERP de São José do Rio Preto".

São José do Rio Preto, 19 de dezembro de 2005.

Prof. Dr. José Paulo Cipullo
Vice- Coordenador do CEP/FAMERP



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto tomou ciência e autorizou a **dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido conforme solicitação datado de 03/07/2008**, referente ao protocolo n.º **5566/2005** sob a responsabilidade de **Maurício José Cabral Ruback**, com o título "Câncer de cabeça e pescoço: um levantamento epidemiológico do Hospital de Base/FAMERP de São José do Rio Preto".

São José do Rio Preto, 08 de julho de 2008.

Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP/FAMERP

**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

Parecer n.º 186/2007

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 3342/2007 sob a responsabilidade de Luiz Sérgio Raposo com o título "Aspectos clínicos e análise molecular de genes da família glutationa S-transferases (GSTs) e citocromo P450 (CYPs) em pacientes com câncer de cabeça e pescoço" está de acordo com a resolução cns 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 11 de junho de 2007.


Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP/FAMERP

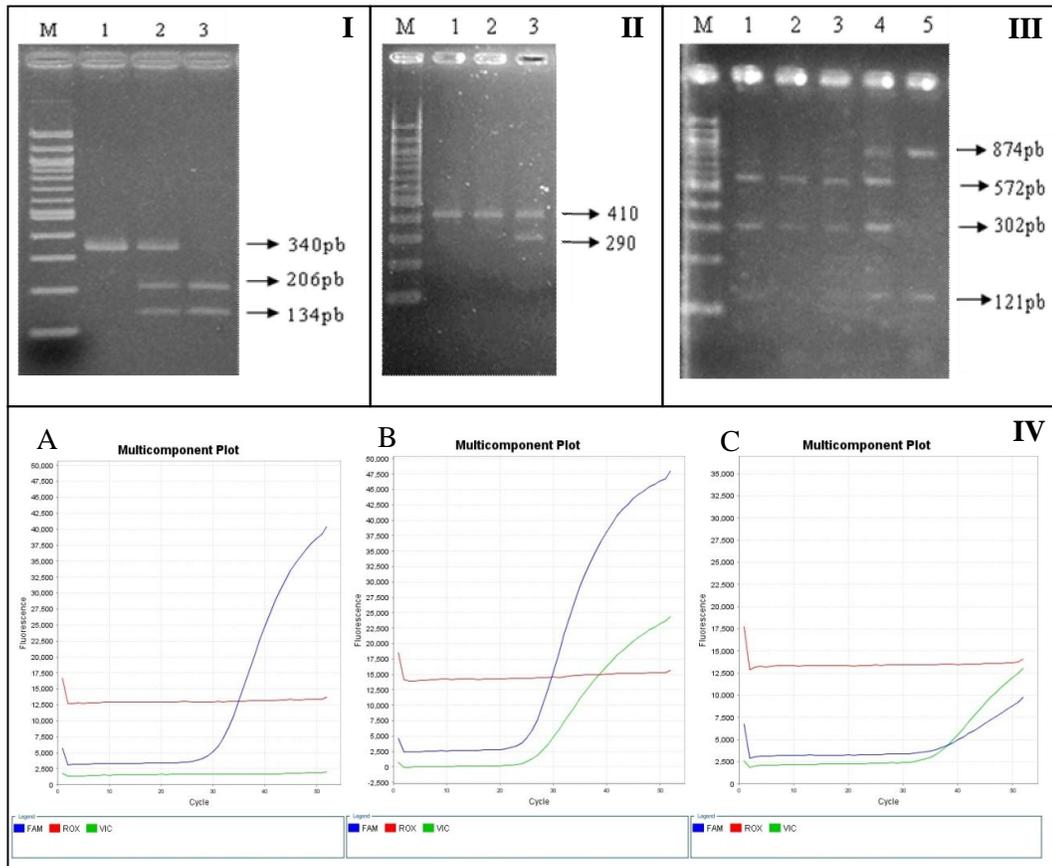


Figura 1. Análise molecular dos polimorfismos *CYPIA1*2A* (I), *CYP2E1*5B* (II), *CYP2E1*6* (III), *CYPIA1*2C -A2455G* (IV). Imagens I, II, III correspondem aos géis de agarose 2,0% dos polimorfismos analisados pela técnica PCR-RFLP. Coluna M: marcador de peso molecular 100 pb. **I.** Coluna 1: genótipo homocigoto selvagem TT. Coluna 2: genótipo heterocigoto TC. Coluna 3: genótipo homocigoto polimórfico CC. **II.** Colunas 1 e 2: genótipos homocigotos selvagens C1C1. Coluna 3: genótipo heterocigoto C1C2. **III.** Colunas 1, 2 e 3: genótipos homocigotos selvagens DD. Coluna 4: genótipo heterocigoto DC. Coluna 5: genótipo homocigoto polimórfico CC. **IV.** Curvas da discriminação alélica produzidas pela análise no software Step One pela técnica PCR em tempo real. O eixo X representa o número de ciclos de amplificação e o eixo y, o valor da fluorescência. (A) Exemplo de um homocigotoselvagem (TT); (B) Exemplo de um heterocigoto (TC); (C) Exemplo de um homocigoto polimórfico (CC). O fluoróforo FAM (azul) representa o alelo T e o fluoróforo VIC (verde) representa o alelo C.

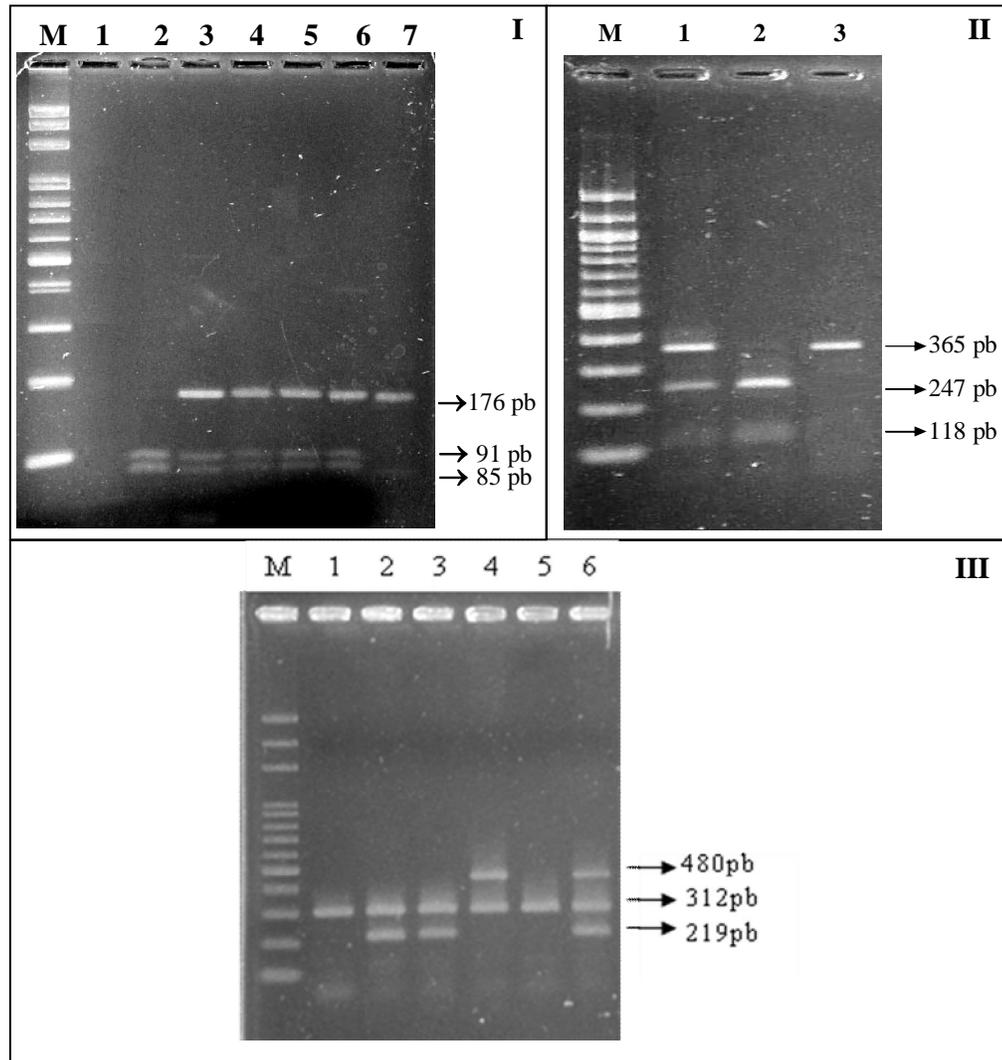


Figura 2. Análise molecular dos polimorfismos *GSTP1*-A313G / Ile105Val (**I**), *GSTP1*-C341T / Ala114Val (**II**), *GSTT1* e *GSTM1*(**III**). As imagens I e II apresentam os géis de agarose 2,5% dos polimorfismos analisados pela técnica PCR-RFLP. A imagem III apresenta gel de agarose 1,5% dos polimorfismos analisados pela técnica da PCR. Coluna M: marcador de peso molecular 100 pb. **I.** Coluna 2: genótipo homocigoto polimórfico. Colunas 3,4,5 e 6: genótipo heterocigoto. Coluna 7: genótipo homocigoto selvagem. **II.** Coluna 1: genótipo heterocigoto CT. Colunas 2 e 3: genótipos homocigotos selvagens CC. **III.** Colunas 1 e 5: genótipos nulos *GSTT1*[-] e *GSTM1*[-]. Coluna 2 e 3: genótipos *GSTT1*[-] e *GSTM1* [+]. Coluna 4: genótipos *GSTT1*[+] e *GSTM1* [-]. Coluna 6: genótipos *GSTT1*[+] e *GSTM1* [+].

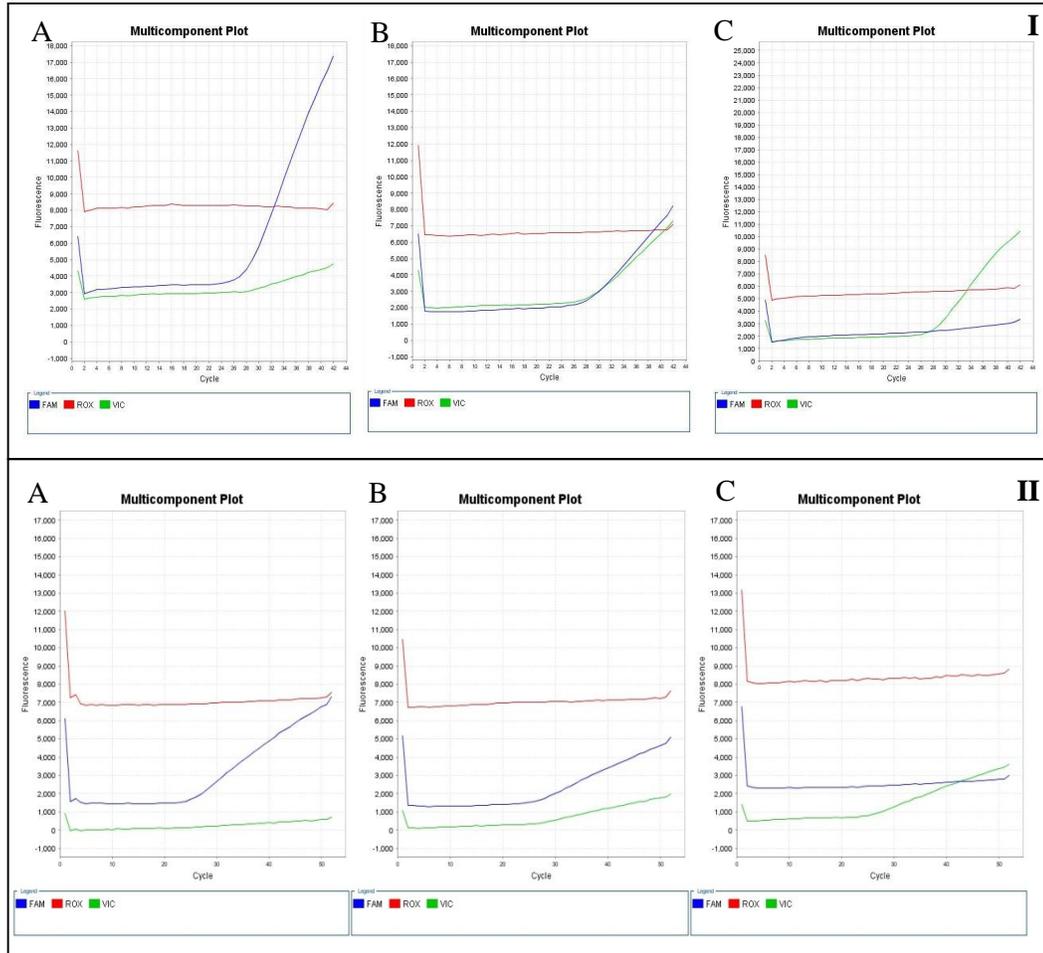


Figura 3. Análise molecular dos polimorfismos Tyr113His e His139Arg do gene *EPHX1*. Curvas da discriminação alélica produzidas pela análise no software *Step One* pela técnica PCR em tempo real. O eixo X representa o número de ciclos de amplificação e o eixo y, o valor da fluorescência. **I.** (A) Exemplo de um homozigoto selvagem (TT ou Tyr/Tyr); (B) Exemplo de um heterozigoto (TC ou Tyr/His); (C) Exemplo de um homozigoto polimórfico (CC ou His/His). O fluoróforo FAM (azul) representa o alelo T e o fluoróforo VIC (verde) representa o alelo C. **II.** (A) Exemplo de um homozigoto selvagem (AA ou His/His); (B) Exemplo de um heterozigoto (AG ou His/Arg); (C) Exemplo de um homozigoto polimórfico (GG ou Arg/Arg). O fluoróforo FAM (azul) representa o alelo G e o fluoróforo VIC (verde) representa o alelo A.