

OTÁVIO ALBERTO CURIONI

**Polimorfismos genéticos no câncer de  
cabeça e pescoço:  
análise de risco e evolução clínica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Gilka Jorge Figaro Gattás

São Paulo

2008

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, minha referência.

À Dra Rossana Curioni, certeza de sempre poder contar.

Ao João Octávio que me faz cada dia mais feliz.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis e ao Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo que me proporcionaram a possibilidade deste trabalho.

À Profa Gilka Gattás pela orientação, ensinamentos e dedicação incondicional.

Aos Professores Marcos Brasilino de Carvalho, Jozias de Andrade Sobrinho e Abrão Rapoport pelo incentivo. Com eles aprendi o valor da pesquisa e do método científico, cujo alvo principal sempre deve ser o paciente.

## SUMÁRIO

Resumo

Summary

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Aspectos Clínicos do Câncer de Cabeça e Pescoço .....	3
1.2. Aspectos Moleculares do Câncer de Cabeça e Pescoço.....	5
1.3. Fatores de risco ao câncer de cabeça e pescoço.....	11
1.4. Polimorfismos genéticos no câncer de cabeça e pescoço.....	16
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3. MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1. Casuística .....	28
3.2 Questionário padronizado .....	29
3.3 A pesquisa dos polimorfismos .....	31
3.4 Análise estatística.....	35
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
4.1. População do estudo .....	36
4.2. Análise dos polimorfismos genéticos .....	39
4.3. Características clínicas pacientes com CECB .....	50
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>

<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>
----------------------------	-----------

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	.....	<b>34</b>
<b>Tabela 2</b>	.....	<b>38</b>
<b>Tabela 3</b>	.....	<b>40</b>
<b>Tabela 4</b>	.....	<b>42</b>
<b>Tabela 5</b>	.....	<b>44</b>
<b>Tabela 6</b>	.....	<b>45</b>
<b>Tabela 7</b>	.....	<b>46</b>
<b>Tabela 8</b>	.....	<b>49</b>
<b>Tabela 9</b>	.....	<b>52</b>
<b>Tabela 10</b>	.....	<b>54</b>
<b>Tabela 11</b>	.....	<b>56</b>
<b>Tabela 12</b>	.....	<b>58</b>
<b>Tabela 13</b>	.....	<b>59</b>

## RESUMO

Curioni OA. *Polimorfismos genéticos no câncer de cabeça e pescoço: análise de risco e evolução clínica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 109p.

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) é considerado um dos tumores mais freqüentes em países em desenvolvimento, detectado quase sempre em estádios mais avançados, com poucas opções eficazes de tratamento, o que diminui a taxa de sobrevida para cinco anos em 50%. Os principais fatores de risco associados são consumo de tabaco e de álcool, seguidos da dieta e infecções virais. Não parecem existir até o momento métodos de vigilância, biomarcadores moleculares ou quimioprevenção que tenham se mostrado eficientes. A identificação de polimorfismos em genes de metabolização do tabaco e do álcool tem sido sugerida na busca de marcadores de susceptibilidade individual ao CECP. Dentre as enzimas envolvidos na fase I de metabolização incluem-se as da família do citocromo P450 (CYPs) e da fase II de metabolização as enzimas glutationa S-transferases (GSTs). Incluem-se também os polimorfismos em genes de reparo que podem alterar o risco para desenvolvimento CECP, sobretudo nos indivíduos consumidores de álcool e tabaco. Polimorfismos em CYPs e GSTs podem alterar a dinâmica de metabolização e excreção de carcinógenos aumentando o risco de mutações como adutos de DNA e conseqüentemente o câncer. No presente estudo foram avaliados polimorfismos em genes da fase I (*CYP1A1 MspI*, *CYP2E1 PstI*) da fase II (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1 BsmA*) e no gene de reparo *XRCC1*, em 207 pacientes portadores de CECP, dos quais 92 (44%) com carcinoma epidermóide da cavidade bucal (CECB), e em 244 controles, selecionados no mesmo hospital. A identificação dos polimorfismos a partir do DNA de linfócitos periféricos dos pacientes e controles (PCR-RFLP) revelou maior

freqüência do genótipo *GSTM1* nulo em pacientes com CECB (53,2%) quando comparados aos controles (37,7%), aumentando em aproximadamente cinco vezes o risco da doença (OR = 4,75; IC 95%, 3,06-7,40). Resultados semelhantes para o genótipo *GSTM1* nulo foram encontrados nos casos de CECB (OR = 2,15; IC 95%, 1,28-3,6). Verificou-se também aumento no risco de CECB com o genótipo *XRCC1-194Trp* (OR = 2,33; IC 95%, 1,08-4,98) e proteção associada ao genótipo *XRCC1-399Gln* (OR, 0.35; IC 95%, 0.12-0.96) que foi mais prevalente nos controles do que nos pacientes com CECB. A presença simultânea de dois genes desfavoráveis (associação gene-gene) aumentou em torno de duas vezes o risco de CECB quando associados *GSTM1-CYP1A1* (OR=1,93; IC 95%, 1,1-3,3), *GSTM1-CYP2E1* (OR=2,2; IC 95%, 1,36-3,87), *GSTM1-XRCC1-194* (OR=2,44; IC 95%, 1,44-4,14) e *CYP2E1-XRCC1-194* (OR=2,0; IC 95%, 1,1 – 3,62). Quando considerada na análise a interação gene-ambiente verificamos que pacientes com CECB que consumiam acima de 39 maços/ano tinham risco aumentado de câncer associado aos genótipos *GSTP1 BmsA* (OR = 5,0; IC 95%, 1,9 -12,4) e acima de 20 maços/ano com o genótipo *CYP1A1MstI* (OR = 53,7; IC 95%, 1,0 -14,2). Por outro lado, o consumo acima de 30 g/l/d, associado ao genótipo *XRCC1-194* aumentou oito vezes o risco de CECB (OR = 8,8; IC 95%, 1,3-45,7) e o genótipo *XRCC1-399* parece ter sido um fator de proteção ao CECB mesmo com consumo de álcool acima de 5 a 30 g/l/d (OR = 0,1; IC 95%, 0,03 – 0,7). Os resultados obtidos parecem sugerir uma contribuição dos polimorfismos genéticos de metabolização do álcool e do tabaco no risco de CECB e da cavidade bucal. A identificação de marcadores genéticos de suscetibilidade individual ao câncer pode auxiliar o médico na indicação de medidas de prevenção e de controle no acompanhamento de pacientes ou da população de risco ao CECB, principalmente fumantes e alcoolistas crônicos.

Descritores: 1.Polimorfismo genético 2.Neoplasias de cabeça e pescoço  
3.Glutationa s-transferase 4. Neoplasias bucais 5.Prognóstico



## **SUMMARY**

Curioni OA. Genetic Polymorphisms in head and neck cancer: analysis of risk and clinical evolution [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Univerdidade de São Paulo; 2008. 109p.

The squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) is considered one of the most prevalent cancers in developing countries, detected nearly always in well-advanced phases with few effective treatment options, which reduce the survival rate to five years in 50% of the patients. The main risk factors associated with it are tobacco and alcohol intake, followed by diet and viral infections. For the moment, there seems not to be vigilance methods, molecular biomarkers or chemioprevention that have been shown to be efficient. The identification of polymorphisms in tobacco and alcohol metabolizing genes has been suggested in the search for markers of individual susceptibility to the HNSCC. Among the enzymes involved in the metabolizing phase I are those belonging to the P450 cytochrome family (CYPs) while in the metabolizing phase II are included the glutathione S-transferases (GSTs). The repair gene polymorphisms which may alter the risk of developing HNSCC, especially in alcohol and tobacco consumers are also included. Polymorphisms in CYPs and GSTs may alter the metabolizing dynamics and carcinogen excretion increasing the risk of mutations like DNA adducts and, as a consequence, the risk of cancer. In the present study,

polymorphisms in phase I genes (*CYP1A1 MspI*, *CYP2E1 PstI*) and in Phase II genes (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1 BsmA*) were evaluated, and the repair gene *XRCC1* as well, in 207 HNSCC carriers, 92 of them (44%) with oral squamous cell carcinoma (OSCC), and also in 244 controls selected in the same hospital. The identification of polymorphisms from the DNA of peripheral lymphocytes in patients and control subjects (PCR-RFLP) showed greater prevalence of the *GSTM1* null genotype which was higher in patients with HNSCC (53.2%) when compared to the controls (37.7%), increasing about five times as much the risk for the disease (OR = 4.75; 95% CI, 3.06-7.40). Similar results for the *GSTM1* null genotype were found in the OSCC (OR = 2.15; 95% CI, 1.28-3.6). It was also observed that there was a rise in the risk for OSCC with the *XRCC1-194Trp* (OR = 2.33; 95% CI, 1.08-4.98) genotype and some protection associated with the *XRCC1-399Gln* (OR, 0.35; 95% CI, 0.12-0.96) genotype, which was more prevalent in the control subjects than in the OSCC patients. The simultaneous presence of two unfavourable genes (gene-gene association) approximately doubled the risk for OSCC when *GSTM1-CYP1A1* (OR=1.93; 95% CI, 1.1-3.3), *GSTM1-CYP2E1* (OR=2.2; CI 95%, 1.36-3.87), *GSTM1-XRCC1-194* (OR=2.44; CI 95%, 1.44-4.14) and *CYP2E1-XRCC1-194* (OR=2.0; CI 95%, 1.1 – 3.62) were associated. When the interaction gene-environment was considered in the analysis, it was found that OSCC patients who were used to consuming above 39 cigarette packs a year had an increase in the risk of getting cancer associated with the *GSTP1 BmsA* (OR=5.0; CI 95%, 1.9-12.4) genotypes and above 20 packs a year associated with the *CYP1A1MstI* (OR = 53.7; CI

95%, 1.0 - 14.2) genotype. On the other hand, the above-30-g/l/d consumption associated with the *XRCC1-194* genotype raised eight times as much the risk for ECOC (OR=8,8; CI 95%, 1.3-45.7) and the *XRCC1-399* genotype seems to have been a protection factor against ECOC even with alcohol consumption above 5 to 30 g/l/d (OR=0.1; CI 95%, 0.03 – 0.7). The results obtained seem to suggest a contribution of the genetic polymorphisms of the alcohol-and-tobacco-related metabolizing enzymes to HNSCC and the OSCC. The identification of genetic markers of individual susceptibility to cancer may help the clinician with the indication of prevention and control measures for the medical follow-up of patients or the population at risk of contracting SCCHN, mainly chronic smokers and alcoholics.

Descriptors: 1.Genetic polimorphisms 2.Head and neck neoplmsms  
3.Glutathione s-transferase 4. Mouth neoplasms 5.Prognosis

## 1. INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) é definido como uma enfermidade neoplásica originária do epitélio de revestimento das vias aerodigestivas superiores, estando aí incluídos: cavidade nasal, seios paranasais, cavidade bucal, faringe e laringe. Em países em desenvolvimento é o sexto tipo de câncer mais comum, em homens, seguido pelo câncer de pulmão, próstata, colorretal, estômago e bexiga, enquanto que em mulheres, é o décimo sítio mais comum depois de câncer de mama, colorretal, pulmão, estômago, útero, câncer cervical, ovário, bexiga e fígado. Os principais fatores de risco associados são consumo de tabaco e de álcool. Cerca de dois terços dos pacientes apresentam-se com doença em estágio avançado ao diagnóstico, com envolvimento de linfonodos regionais. A metastástase a distância como apresentação inicial é incomum, surgindo em cerca de 10% dos pacientes.

As decisões terapêuticas são, muitas vezes, desafiadoras, envolvendo diversas especialidades, incluindo o cirurgião de cabeça e pescoço, oncologista clínico, radioterapeuta, radiologista, cirurgião plástico e dentista. A localização do tumor primário, estágio clínico, ressecabilidade e fatores intrínsecos ao paciente – incluindo-se deglutição, via aérea, desejo de preservação de órgão e co-morbidades – são utilizados para decisão terapêutica. A cirurgia e a radioterapia são os pilares da estratégia de tratamento. A taxa de sobrevida em 5 anos gira em torno de 50%. Já os indivíduos sobreviventes após tratamento estão sob risco de morte por

doenças cardíacas e respiratórias ou segundo tumor primário, situações comumente relacionadas ao tabagismo. A ocorrência de segundo tumor primário no trato aerodigestivo varia de 3-5%. Até o momento, não há métodos de vigilância, biomarcadores moleculares ou quimioprevenção que tenham se mostrado benéficos. Busca-se o conhecimento de eventos moleculares que possam explicar o desenvolvimento do CECP e assim orientar a prevenção, bem como desenvolver novas formas de tratamentos. Dentre os marcadores moleculares de susceptibilidade ao desenvolvimento do CECP incluem-se os polimorfismos em genes de metabolização de carcinógenos, principalmente aqueles presentes no fumo e no álcool.

No processo de metabolização de agentes exógenos, muitos deles carcinogênicos, ocorre a conversão dos mesmos em metabólitos eletrofilicos por meio de enzimas oxidativas da fase I, principalmente enzimas da superfamília do citocromo P450 (CYPs). Por outro lado, reações da fase II de metabolização por meio das enzimas glutathione S-transferases (GSTs) são responsáveis pela transformação dos mesmos em metabólitos inativos que são facilmente excretados na urina ou através da bile, nas fezes. Quando isso não ocorre os metabólitos ativos podem se ligar covalentemente a macromoléculas celulares como DNA, RNA e proteínas, formando adutos de DNA que, se não sofrerem reparo, podem acarretar mutações, transformações celulares ou mesmo câncer. Também, a falta de um sistema eficiente de reparo das lesões ocorridas no DNA pode alterar o risco para o aparecimento de tumores, da mesma forma que as alterações geneticamente determinadas, no sistema de metabolização de xenobióticos.

Por esta razão, o estudo de fatores ambientais associados ao genótipo de pacientes com CECP, ou com alto risco para o desenvolvimento da doença, pode sugerir medidas individuais de prevenção e acompanhamento clínico.

### **1.1. Aspectos Clínicos do Câncer de Cabeça e Pescoço**

Em nosso meio, de todos os tumores de cabeça e pescoço, predomina o carcinoma epidermóide da cavidade bucal (CECB). Estimativas mundiais de incidência e mortalidade têm mostrado aumento do número de casos tanto para homens como para mulheres, correspondendo a 6,6/100.000 e 3,1/100.000 habitantes no sexo masculino e 2,9/100.000 e 1,4/100.000, no sexo feminino, respectivamente (Landis et al., 1999). No Brasil o número de casos novos estimados para 2008 é de 14160, sendo 10380 em homens e 3780 em mulheres ocupando a oitava localização mais acometida de todos os tipos de câncer (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2007).

O diagnóstico, em regra, é tardio porque os sintomas que motivam o paciente a buscar a ajuda médica, como a dor, a disfagia, a odinofagia, a dispnéia ocorrem numa fase avançada da doença, determinando um maior número de casos com prognóstico reservado, elevando as taxas de

seqüelas e deformidades, conseqüentemente, reduzindo a qualidade de vida dos pacientes. Como a probabilidade de cura de um indivíduo com CECP está relacionada ao estágio da doença, a importância do diagnóstico precoce deve ser valorizada. Entretanto, com os meios atuais de detecção e diagnóstico, a incidência da doença avançada continua alta, sendo que em nosso meio, cerca de 75% dos casos são diagnosticados em estágio clínico III ou IV (Bergamasco et al., 2008). Assim, a identificação de indivíduos de risco para CECP, utilizando técnicas moleculares, além do tratamento com agentes que suprimam a progressão do crescimento maligno pode ser uma estratégia em potencial para a prevenção e talvez cura deste câncer.

A terapia convencional está apoiada, principalmente, na possibilidade de remoção cirúrgica e na eficácia das diversas modalidades de tratamentos adjuvantes, que variam de acordo com cada tipo de tumor. Tal decisão terapêutica para o CECP está baseada em parâmetros clínico-patológicos, incluindo idade, a extensão loco-regional e a distância (TNM) e de seu grau de diferenciação histológica. Ainda que considerados úteis, tais parâmetros muitas vezes falham em diferenciar lesões mais ou menos agressivas, dificultando a identificação de lesões com maior probabilidade de recorrência, ou aquelas que poderão levar o paciente à morte. Algumas outras características histológicas têm implicação prognóstica significativa, pelo menos em alguns sítios da cabeça e pescoço. Entre estes incluem-se, padrão de invasão tumoral dentro do estroma, espessura tumoral indicando maior probabilidade de metástase linfonodal e a invasão tumoral angiolinfática e/ou perineural indicando pior prognóstico.

Mesmo assim, não há até o momento, nenhum modelo prognóstico que categoricamente prediga o risco de recorrência em pacientes com CECP depois do tratamento primário. O padrão ouro nesta avaliação tem sido o estágio clínico do tumor após o diagnóstico. Tumor de maior tamanho, presença de linfonodo metastático, margens comprometidas após ressecção cirúrgica, infiltração perineural, têm sido os indicadores de resultados pobres após tratamento do CECP (Thomas et al., 2005). Porém, a presença de invasão extra capsular em linfonodo metastático permanece o mais significativo indicador de sobrevida, recorrência regional e metástase a distância no CECP (Puri et al., 2003; Woolgar et al., 2003).

## **1.2. Aspectos Moleculares do Câncer de Cabeça e Pescoço.**

Ainda que os parâmetros histológicos forneçam o melhor critério possível para decisão terapêutica, os mesmos são limitados para definir um futuro comportamento agressivo do CECP.

Embora considerada como entidade histológica única, o CECP comporta-se distintamente quanto ao prognóstico, em parte, face aos diferentes indivíduos. Neste contexto, a busca de alvos moleculares para controle deste tipo de câncer está plenamente justificada, inclusive com resultados animadores para tumores sólidos como pulmão e cabeça e pescoço (Von Pawel, 2004). A análise de *microarrays* de proteínas e de DNA



começa a fornecer um cenário promissor no conhecimento de alterações protéicas e genômicas que estão associadas à progressão do CECP, fato que possibilitaria a individualização na escolha do tratamento (Akervall, 2005; Roepman et al., 2006).

Quais genes determinam um fenótipo clínico particular não sabemos, nem a natureza da interação entre alelos de baixo e alto risco. O entendimento deste fenômeno auxiliaria na identificação de indivíduos de alto risco para desenvolver a enfermidade, em eventuais programas de triagens, assim como na determinação de prognóstico individual.

A maioria dos estudos moleculares é realizada em amostras de pacientes com CECP sem distinção entre os sítios anatômicos. A descrição clínico-epidemiológica deste câncer é realizada de forma genérica agrupando os diferentes sítios anatômicos, o que não permite análise detalhada desta enfermidade em relação ao risco individual, estadiamento, diagnóstico, tratamento e prognóstico. Resultados têm considerado que as diferenças biológicas e clínicas presentes nos tumores de diferentes localizações anatômicas podem ser explicadas pelas diferentes alterações genéticas (Strange e Fryer, 1999). Alguns trabalhos, inclusive, sugerem que vários genes relacionados à suscetibilidade ao câncer influenciariam, sobretudo, na evolução do paciente (Matthias et al., 1999).

Alguns genes, que são freqüentemente perdidos ou mutados, têm sido identificados, incluindo aqueles cuja função é induzir proliferação celular sob circunstâncias específicas (por exemplo: proto-oncogenes *ras* e *myc*) e genes que são programados para interromper a proliferação de células

alteradas (genes supressores de tumor como P53, APC - *adenomatous polyposis coli*). Outras mutações também podem ocorrer em genes envolvidos no reparo do DNA, controle do ciclo celular, angiogênese, linfangiogênese, entre outros. Todos os eventos que envolvem a gênese, o desenvolvimento e crescimento dos tumores e a sua capacidade de invasão local e a distância ocorrem simultaneamente e são interligados por complexos mecanismos moleculares, muitos ainda por serem esclarecidos (Campo-Trapero, 2008). Para o desenvolvimento de terapias mais eficientes e eficazes, tanto para a doença localizada como para a doença metastática, faz-se necessário conhecimento dos mecanismos moleculares que regulam a biologia dos tumores. Entre estes mecanismos tem-se a angiogênese e a linfangiogênese que são eventos diretamente relacionados à formação de metástases regional e a distância.

### **1.2.1) Angiogênese**

O termo angiogênese ou neovascularização refere-se ao crescimento e desenvolvimento de novos vasos capilares. Trata-se de condição fundamental para o crescimento tanto do tumor primário como das metástases dele originadas. É um processo complexo que envolve crescimento de células endoteliais, migração e morfogênese capilar (Folkman, 1971). Esse processo é controlado por fatores angiogênicos

positivos e negativos, e pelos seus receptores, que regulam uma ou mais dessas etapas (Schimming et al., 2004). Há evidências de que a angiogênese ocorre graças a uma cascata de eventos e por isso, alguma intervenção em quaisquer destas etapas, poderia prevenir ou promover revascularização. Em 1974, Liotta et al. concluíram que o desprendimento, a embolização e a disseminação celulares são eventos subseqüentes à vascularização do tumor primário. Entretanto, existem ainda questões a serem respondidas como, por exemplo, os estágios na evolução dos neovasos que poderiam ser utilizados como alvos em terapias contra o câncer. O número de microvasos dentro de tumores sólidos pode refletir angiogênese e tem demonstrado relevância prognóstica (Weidner, 1995). Para o CECB, existem poucos e controversos estudos sobre o papel da densidade vascular, fatores angiogênicos e comportamento tumoral (Schimming et al., 2004; Kyzas et al., 2005). A maioria dos estudos conta o número de microvasos corados por imunohistoquímica para definir angiogênese (Vermeulen et al., 1996). No entanto, reações cruzadas com células plasmáticas, abundantes no CECB, podem originar falsos positivos. Além disso, os vasos tumorais são tortuosos e aberrantes, sem uma clara luz, com grandes espaços entre as células endoteliais, o que dificulta sua caracterização (Hannen e Riedger, 2004).

### 1.2.2) Linfangiogênese

Os vasos linfáticos representam uma das mais eficazes vias de metastatização (Oliver, 2004). A inibição da linfangiogênese poderia evitar a disseminação tumoral, o que poderá representar uma opção terapêutica importante (Karpanen e Alitalo, 2002; Jain e Padera, 2002). Questiona-se atualmente, se a disseminação linfática pode ser realizada apenas por meio de vasos pré-existentes, ou se é necessária a formação linfática *de novo* (linfangiogênese) ou o aumento do volume dos vasos (Reis Filho e Schmitt, 2003).

O sistema linfático comporta uma complexa rede capilar que transporta o fluido drenado das células teciduais somáticas, composto por metabólitos, proteínas plasmáticas e componentes intersticiais. É também, uma das vias principais de metastatização dos carcinomas que inicialmente acometem os nódulos linfáticos para depois se alojarem em órgãos distantes. Não é surpresa, portanto, que a literatura direcionada para as relações entre prognóstico de neoplasias e metástases, tenha elegido a linfangiogênese como uma linha de investigação crucial para o entendimento da disseminação neoplásica (Reis Filho e Schmitt, 2003). Há evidências que mostram que os vasos linfáticos intra-tumorais são praticamente inoperantes, enquanto que os peri-tumorais possuem uma atividade metastática (Padera et al., 2004). A diferenciação entre endotélio sanguíneo e linfático pode ser bastante limitada por falta de marcadores histológicos,

ultra-estruturais e imunohistoquímicos específicos (Reis Filho e Schmitt, 2003).

Nos últimos anos alguns fatores linfangiogênicos têm sido descritos como os membros da família de fatores de crescimento endotelial (*VEGF - vascular endothelial growth factor*) que regulam a vasculogênese, hematopoiese, angiogênese, linfangiogênese e a permeabilidade vascular. Alguns *VEGF*, aumentados em neoplasias malignas, correlacionam-se com aumento de metástases (Longatto Filho et al., 2005). Essa família é composta por VEGF-A, -B, -C, -D e E, além de 3 receptores, VEGFR-1, -2 e -3. O VEGFR-1 liga-se aos VEGF-A e -B; o VEGFR-2 liga-se aos VEGF-A, -C, -D e -E, e o VEGFR-3 liga-se aos VEGF-C e -D. O VEGFR-3 é restrito aos vasos linfáticos e a algumas vênulas na fase adulta, o que dá a esse marcador uma alta especificidade para vasos linfáticos, embora ele também possa ser encontrado em vasos sanguíneos (Reis Filho e Schmitt, 2003). Outros marcadores importantes são o LYVE-1 (*Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1*), cuja expressão foi demonstrada em linfangiogênese de neoplasias malignas humanas (Jackson, 2004) e o Prox-1 (*Prospero-Related Homeobox-1*), que parece ser um dos mais promissores, por sua alta especificidade, em vários tecidos normais e em diferentes condições patológicas (Wilting et al., 2002). Contudo, o mais eficaz desses marcadores parece ser o D2-40, que além da alta especificidade em neoplasias apresenta grande capacidade de discriminar vasos linfáticos em tecidos normais e reativos (Kaiserling, 2004). O potencial desse anticorpo foi recentemente ratificado em melanomas, uma neoplasia

ricamente vascularizada (Giorgadze et al., 2004). Em CECP, Franchi e colaboradores (2004) em estudo morfométrico com D2-40 demonstraram sua utilidade como indicador de risco de metástases linfonodal nestes pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Resultados preliminares de um estudo com pacientes da nossa casuística de CECB mostraram associação significativa entre o marcador D2-40 e a presença de metástase linfonodal (Longatto Filho et al., 2007).

### **1.3 Fatores de risco ao câncer de cabeça e pescoço**

#### **1.3.1) Tabaco**

É certo que o risco para o CECB está relacionado tanto com a intensidade como com a duração do consumo do tabaco e do álcool. Dados da literatura sustentam a asserção de que pelo menos 80% dos casos de CECB são atribuíveis à exposição ao fumo e álcool (Raggin et al., 2007). Além do mais, há forte relação dose-resposta entre uso do tabaco e do álcool sendo que o uso combinado aumenta significativamente o risco (Hashibe et al., 2007).

A diversidade e toxicidade dos compostos presentes no tabaco são decorrentes de três grupos principais de carcinógenos: os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), as nitrosaminas tabaco-específicas e as aminas aromáticas. Até hoje, estudos tentam responder se polimorfismos genéticos em enzimas que metabolizam o tabaco modificam o risco para o câncer da boca em fumantes.

Polimorfismos genéticos de interesse incluem aqueles que alteram a expressão ou função de enzimas que convertem carcinógenos em substâncias reativas intermediárias, capazes de formar adutos com o DNA, e aquelas que seqüencialmente eliminam tais substâncias. Exemplos dos primeiros incluem enzimas do citocromo p450 (CYP450) como a subfamília A - genótipos *CYP1A1* e *CYP1A2* e exemplos dos últimos incluem glutathione S-transferases (GSTs). Quando as lesões do DNA ocorrem em oncogenes ou genes supressores de tumor e não são corrigidas por enzimas de reparo do DNA, uma ampla cascata de eventos pode levar a iniciação do câncer pela conversão de uma lesão em uma mutação. Polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas na ativação e detoxificação do tabaco, bem como em genes de reparo do DNA, podem alterar o resultado final da exposição e, portanto, tornarem-se um importante fator do hospedeiro para o câncer. Se por um lado tal risco é inquestionável, por outro, o impacto desses polimorfismos na evolução desses pacientes, após o tratamento, é assunto ainda não totalmente elucidado. O polimorfismo em genes de metabolização poderia explicar, em parte, porque somente uma minoria dos expostos desenvolve a doença.

### **1.3.2) Álcool**

Uma ligação casual tem sido estabelecida entre consumo de álcool e câncer da cavidade bucal, faringe e laringe, entre outros. A importância do consumo do álcool como um carcinógeno humano está muitas vezes subestimado. Acredita-se que o consumo esteja aumentando em muitos

países como resultado tanto do número de consumidores como da ingestão do álcool, especialmente por mulheres, e em regiões de crescimento econômico acentuado. O álcool é, provavelmente, o principal fator responsável pelo aumento do risco para câncer de cabeça e pescoço relatado em vários países, particularmente o leste e centro europeus (Boffetta e Hashibe, 2006). O acetaldeído, primeiro produto do metabolismo do álcool, tem sido indicado como um promotor tumoral (Harty et al., 1997). Sinergismo entre consumo de álcool e tabaco foi relatado nos anos 70 e desde então se tornou um paradigma da interação dos dois fatores ambientais na carcinogênese humana. O efeito carcinogênico do álcool, independentemente do tabaco (risco aumentado para não fumantes), foi primeiramente relatado na década de 1960 e tem sido reproduzido desde então (Ng et al., 1993; Bosetti et al., 2002). Estes estudos mostram relação consistente entre dose-resposta, consumo de álcool e risco de câncer no trato aerodigestivo superior. Outros autores verificaram que o risco por sítio anatômico com equivalentes níveis de consumo de álcool, mas nenhum sítio foi consistentemente de maior risco (Castellsague et al., 2004). Ainda é incerto se o genótipo modifica o risco ao câncer bucal associado à exposição ao álcool. A heterogeneidade dos achados nas diferentes regiões geográficas pode ser devido ao efeito combinado de polimorfismos das diferentes enzimas metabolizadoras do álcool como as do CYP450, álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH) que diferem significativamente por diferentes grupos étnicos (Brennan et al., 2004).



### **1.3.3) Vírus**

O papiloma vírus humano (HPV) é outro fator de risco, que está intimamente associado a lesões benignas e malignas da mucosa da via aerodigestiva superior. É detectado em condilomas, hiperplasia epitelial focal, papiloma de células escamosas e lesões mucosas malignas. Positividade para HPV é maior em tumores da cavidade bucal (59%), faringe (43%) e laringe (33%). Entre aqueles, apenas uma pequena parcela de lesões infectadas por HPV progredirão para transformação maligna (Scully, 2002; Brennan et al., 2004). Entretanto, esses estudos indicam que a conversão tumorigênica requer a presença de outros fatores de risco. Ainda que alguns estudos tenham observado prevalência do HPV em até 23,5% dos casos de CECB, outros revelaram prevalência do vírus em cerca de 4% dos casos (Herrero et al., 2003).

### **1.3.4) Dieta**

A importância da nutrição e dieta no câncer de cabeça e pescoço é evidenciada em alguns trabalhos epidemiológicos e a relação entre dieta e risco de câncer da boca está entre a mais forte para todas as malignidades (McLaughlin et al., 1988; De Stefani et al., 1999). Frutas e vegetais (ricos em vitaminas C e A) são descritos como protetores na neoplasia bucal, enquanto que carnes e pimentas vermelhas são consideradas fatores de

risco (Marshall e Boyle, 1996). Ainda que os micronutrientes individuais não tenham sido formalmente identificados, vegetais e frutas que protegem contra lesões pré cancerosas e câncer bucal, parecem ter esse efeito associado à presença de beta-carotenos, vitaminas C e E, com propriedades anti-oxidantes. Deficiências em ferro, resultando em atrofia do epitélio da via aerodigestiva alta e a Síndrome de Plummer-Vinson, estão associadas com o câncer do trato aerodigestivo alto. Dieta com ferro teria efeito protetor mantendo a espessura do epitélio (Negri et al., 2000). Desnutrição crônica deve contribuir, também, ao risco de câncer de boca. Estudos evidenciaram a associação entre o risco aumentado do CECB e o declínio do índice de massa corpórea tanto ao diagnóstico (Nieto et al., 2003), como dois anos prévios ao diagnóstico (Rajkumar et al., 2003).

### **1.3.5) Fatores hereditários no câncer de cabeça e pescoço**

Poucas doenças hereditárias conhecidas têm sido associadas ao risco aumentado de câncer de boca. Anemia de Fanconi (AF) é uma síndrome rara autossômica recessiva causada por defeitos em pelo menos 11 genes envolvidos no reconhecimento de quebras e rearranjos cromossômicos e reparo do DNA (Thompson, 2005). Indivíduos com AF são de alto risco para aplasia da medula óssea, leucemia e tumores sólidos e estima-se um aumento no risco de 500 a 700 vezes para desenvolvimento de câncer da cabeça e pescoço (Kuttler et al., 2005). Como uma parcela menor de indivíduos expostos (em geral ao tabaco e álcool) desenvolve

câncer, o risco pode depender da suscetibilidade individual intrínseca ao câncer. Na maioria dos estudos, o risco para o CECP, é 2-4 vezes maior entre indivíduos com história familiar positiva, depois de ajustados para idade, gênero, exposição ao tabaco e álcool, em relação ao caso índice (Brown et al., 2001).

#### **1.4. Polimorfismos genéticos no câncer de cabeça e pescoço**

Polimorfismo genético é definido como a ocorrência, em uma população, de duas ou mais formas descontínuas de um determinado fenótipo em tal proporção que o mais raro deles não é mantido por mutação recorrente. Genes são considerados polimórficos funcionalmente quando as variantes alélicas existentes de forma estável na população alteram a atividade da proteína codificada em relação à proteína selvagem. São mutações pontuais (*SNP-single nucleotide polymorphisms*), em um ou ambos os alelos, ou deleções de genes inteiros, que ocorrem em mais de 1% da população (Hartl e Jones, 1998). Em muitos casos, o polimorfismo genético está associado com atividade enzimática reduzida, mas há exemplos de variantes com atividade aumentada (Stamatoyannopoulos, 2004). Estima-se que um milhão de SNP's (um para cada mil nucleotídeos) possa existir no genoma humano, dos quais 60 mil estão em regiões que codificam proteínas (Collins et al., 2003).

Vários carcinógenos do ambiente podem ser ativados metabolicamente e/ou detoxificados por enzimas metabolizadoras de drogas antes de se ligarem ao DNA, RNA e às proteínas. Assim sendo, as variações

nos processos de ativação e de detoxificação de compostos químicos e drogas têm um papel crucial na tumorigênese ambiental.

Esses xenobióticos podem ser ativados a carcinógenos por enzimas da fase I e, subseqüentemente, serem detoxificados pelas reações de conjugação catalisadas por enzimas da fase II. Muitos compostos são convertidos a metabólitos eletrofilicos pelas enzimas oxidativas da fase I, que catalisam alterações primárias na molécula e consistem na hidrólise ou na adição de grupos polares como -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -SH, que são principalmente enzimas da superfamília do citocromo P450 (CYP450). Por outro lado, as reações de fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno (glutaciona, sulfato, glicose, acetato) através das glutaciona S-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos resultantes da fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e, portanto, passíveis de excreção (Hayes et al., 2005). As enzimas mais importantes na ativação de pró-carcinógenos são: *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP2E1*, *CYP3A1*, *CYP2D6* e polimorfismos nos genes da fase II (*GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*) também podem contribuir com o risco de câncer (Ingelman-Sundberg, 2001). Uma representação esquemática da contribuição de fatores genéticos e ambientais na gênese do câncer encontra-se descrita na Figura 1.

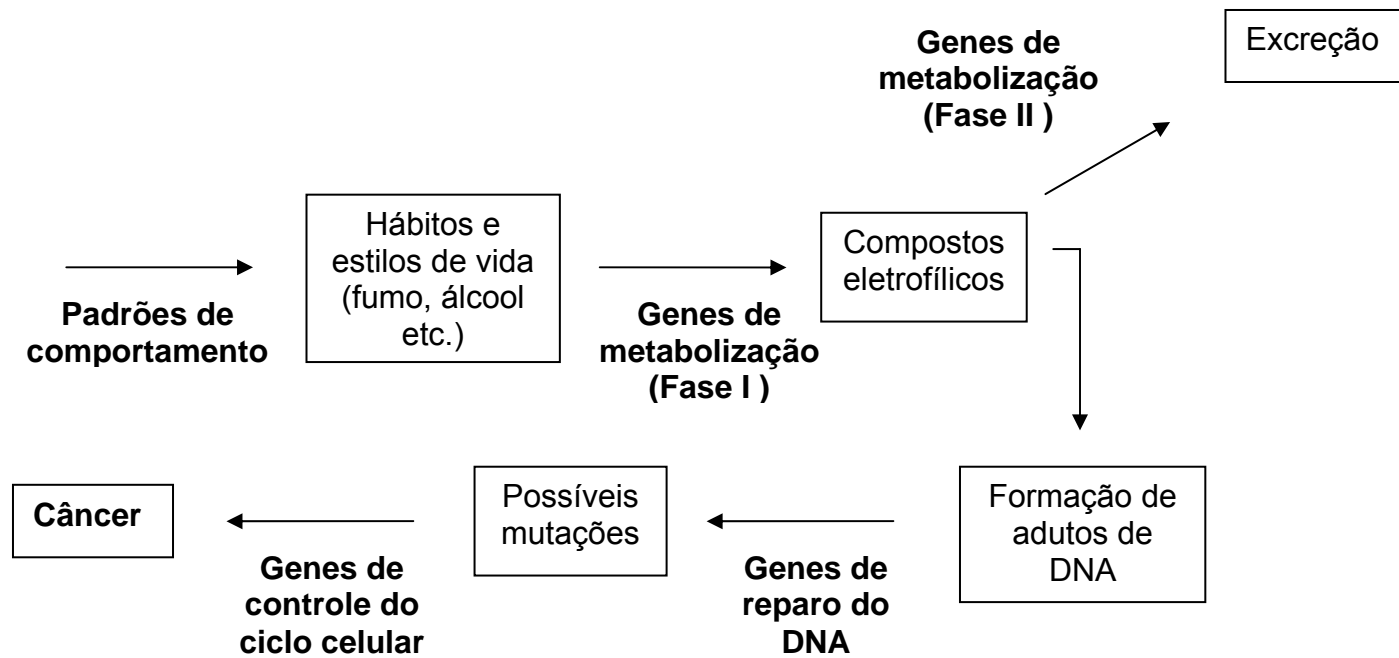


Figura 1. Representação esquemática da contribuição de genes de metabolização e de reparo, bem como de fatores do meio ambiente no câncer.

Os genótipos polimórficos dessas enzimas podem servir como biomarcadores genéticos para indicar a suscetibilidade a certos tipos de câncer e, portanto, podem ser utilizados na estimativa do risco individual de câncer.

A CYP2E1, uma enzima microsomal expressa em altos níveis no tecido hepático e extra-hepático, é induzida pelo álcool, sendo a maior responsável por sua oxidação, depois da enzima álcool desidrogenase. O aumento da expressão de *CYP2E1* foi observado em fígados de alcoólicos (Kato et al., 2003) e a maior atividade da enzima, induzida pelo álcool, parece potencializar os efeitos genotóxicos de várias nitrosaminas (Gonzalez, 2005). As variações na atividade da CYP2E1 estariam relacionadas com o polimorfismo genético. Os indivíduos com o alelo do tipo selvagem possuem menor nível de expressão quando comparados aos portadores do alelo mutante. A frequência do mutante bem como de heterozigotos é rara, compreendendo cerca de 4% dos indivíduos brancos e 20% dos japoneses (Gattás e Soares-Vieira, 2000; Garte et al., 2001). Foram verificadas associações entre as variantes polimórficas do *CYP2E1* e câncer de boca e de nasofaringe em chineses (Hung et al., 1997). O alelo mutado teria maior atividade enzimática quando comparado com o alelo selvagem, sugerindo sua participação no desenvolvimento de câncer relacionado com exposição ao álcool.

Resultados contraditórios também foram descritos tanto em orientais como em outras populações onde foram investigados portadores de CYP2E1 incluindo cavidade buical, faringe e laringe (Neuhaus et al., 2004). Outros

estudos mostraram ocorrência extremamente rara do genótipo heterozigoto entre indivíduos portadores de CECP e nenhum caso de genótipo homozigoto, sugerindo não haver papel importante desse polimorfismo e o desenvolvimento da doença (Hayashi et al., 1991; Rydzanicza et al., 2005).

O produto do *CYP1A1* (aril hidrocarbono hidroxilase) é responsável pelo primeiro passo na metabolização de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, em compostos eletrofílicos (Kawajiri et al., 1986). São conhecidos quatro polimorfismos para o gene *CYP1A1* sendo que o identificado pela enzima de restrição *MspI* (*CYP1A1m1*), na região 3' não codificante do gene, resulta na transição de uma timina para citosina (T-C), com conseqüente aumento, três vezes maior, da sua atividade (Kawajiri et al., 1986).

As mutações no gene *CYP1A1* parecem estar relacionadas somente ao câncer de faringe e não ao câncer de laringe, principalmente em japoneses (Morita et al., 1999). Entretanto, essa diferença parece não ocorrer quando populações caucasóides são avaliadas (Gattás et al., 2006). O estudo de Park et al. (1997) sugere risco maior para o câncer de cavidade bucal em indivíduos polimórficos para *CYP1A1*. Entretanto, outros estudos mostram distribuição semelhante entre indivíduos com câncer de boca e controles sem câncer (Hahn et al., 2002). Em outras populações a atividade enzimática diminuída aumentaria o risco para o câncer de boca, bem como o aparecimento numa idade mais precoce (Kao et al., 2002). O risco de desenvolver câncer de boca parece ser maior quando ocorre associação entre polimorfismos CYP450 e deleções em *GSTM1* (Bartsch et al., 2000;

Gattás et al., 2006). A variante genotípica é considerada prejudicial possivelmente por aumentar a ativação de carcinógenos e gerar moléculas reativas de oxigênio capazes de formar adutos de DNA (Hashibe et al. 2003).

As enzimas de fase II são compostas pela glutathione S-transferases (GSTs) e as N-acetiltransferases (NATs). Estas enzimas são responsáveis por reações de conjugação, nas quais são adicionados ao substrato grupamentos altamente polares como radicais glucoronídeos, acetil, metil, sulfatos ou aminoácidos. As GSTs atuam na detoxificação de vários carcinógenos encontrados na fumaça do cigarro, como os radicais heterocíclicos aromáticos e epóxidos. A conjugação facilita a excreção e, assim, participa de uma etapa de detoxificação. Em adição, a sua atuação na fase II de detoxificação, as GSTs modulam a indução de outras enzimas e proteínas importantes para a manutenção das funções celulares, bem como o reparo ao dano no DNA (Canevari e Rogatto, 2004). O polimorfismo destas enzimas, com conseqüente deficiência funcional, pode ser um fator de risco para o câncer por proporcionar sensibilidade aumentada a vários carcinógenos.

No homem, quatro grandes famílias de genes GSTs foram identificadas, conhecidas como *alfa*, *mu*, *teta* e *pi*, sendo que variantes alélicas foram descritas em todas as famílias de genes da GST. O primeiro polimorfismo descrito foi o genótipo nulo para *GSTM1*, no qual indivíduos homocigotos apresentam deleção total do gene e ausência de síntese protéica (Seidegard et al., 1988). A enzima *GSTM1* cataliza a conjugação



dos produtos de metabolização de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, com os derivados epóxidos, principais carcinógenos encontrados na fumaça do tabaco. Posteriormente também foram descritas deleções do gene *GSTT1* da família *teta* (Seidegard et al., 1988).

Estudos populacionais revelaram que o gene *GSTM1* está ausente em aproximadamente 50% da população caucasóide, variando de 30 a 90% em outros grupos étnicos (Arruda et al., 1998; Gattás et al., 2004). Diferenças étnicas na freqüência de *GSTM1* nulo podem contribuir também para a maior incidência de câncer de boca, em americanos de origem africana, do que em caucasóides (Park et al., 2000).

A freqüência do genótipo *GSTT1* nulo varia de 15% a 38% em voluntários saudáveis, sendo mais freqüente entre os negros (Jourenkova-Mirova et al., 1999). As conseqüências biológicas do *GSTT1* nulo não são previsíveis, pois a enzima apresenta tanto atividade de detoxificação quanto de ativação de xenobióticos (Pavanello e Clonfero, 2000).

A presença do genótipo *GSTT1* nulo também foi mais freqüente em indivíduos com câncer de boca e de orofaringe (Amador et al., 2002), sendo que o risco de câncer foi maior para fumantes crônicos há mais de 30 anos. Parece existir também associação entre *GSTT1* nulo e características clínicas e anatomopatológicas do tumor de boca como extensão, diferenciação, recidiva, idade de início do câncer e presença de linfonodo metastático (Jourenkova-Mironova et al. 1999; Chung-Ji et al., 2005). Entretanto, outros autores não mostraram a contribuição do genótipo *GSTT1* nulo no câncer de boca (Oude Ophius et al., 1998; Olshan et al., 2000).

Indivíduos com deleção homozigótica para o gene *GSTM1* e *GSTT1* têm atividade enzimática diminuída, fato que poderia aumentar a suscetibilidade ao câncer, devido a menor capacidade em eliminar carcinógenos.

O gene *GSTP1* é conhecido por metabolizar muitos compostos carcinogênicos, entre eles o benzo(a) pireno dialepóxide (BPDE), que é um metabólito carcinogênico derivado do tabaco. Há elevados níveis de expressão de *GSTP1* em tumores de estômago, cólon, testículo, próstata, mama, pele e pulmão quando comparados com tecidos normais (Henderson et al., 1998). Leichsenring et al. (2006) não verificaram associação significativa entre polimorfismo *GSTP1* e câncer de cavidade bucal. Por outro lado, outros autores mostraram elevado risco para este câncer associado ao polimorfismo *GSTP1*, principalmente nos indivíduos homozigotos (Kato et al., 1999; Park et al., 1999).

Além dos polimorfismos, a atividade metabólica das enzimas GSTs pode diferir segundo diferentes sítios anatômicos. Uma maior concentração de *GSTP1* tem sido observada em tecidos da boca e faringe e maiores concentrações de *GSTM1* em tecidos laríngeos em relação a outros sítios (Geisler e Olshan, 2001). O significado clínico destas diferenças não tem, até o momento, sido elucidado. Além do papel no metabolismo de fase II, as GSTs também modulam a indução de outras enzimas e proteínas para o ciclo celular, tais como genes de reparo ao DNA. Esta classe de enzimas é importante para a manutenção da integridade genômica celular e, sendo assim, pode ser que participe da susceptibilidade e evolução do câncer.

### **1.4.1. Polimorfismos de genes de reparo no câncer de cabeça e pescoço**

A maioria das células sofre, regularmente, agressão no seu DNA determinada por mutágenos endógenos e exógenos. O dano não reparado pode resultar em apoptose ou levar a um crescimento celular não regulado e conseqüentemente ao câncer. Se o dano ao DNA for reconhecido pela maquinaria celular, várias respostas podem ocorrer para prevenir a replicação frente ao erro genético. Nas células, pontos de checagem podem ser ativados e promover uma parada no ciclo celular, a transcrição pode atrasar o ciclo para compensar o dano ou a célula pode entrar num processo de morte programada. Alternativamente, o dano pode ser reparado diretamente no DNA e assim ocorrer a manutenção da replicação como planejado. Vias complexas estão envolvidas neste processo para realização de tal reparo. Dada a importância da manutenção da integridade genômica para funções gerais e especializadas das células, bem como a prevenção da carcinogênese, genes que codificam moléculas para reparo do DNA têm sido propostos como candidatos na indicação da susceptibilidade ao câncer. O reparo ao dano do DNA pode ser o mais importante fator protetor contra carcinogênese ambiental (Goode et al., 2005).

São descritos vários polimorfismos em pelo menos cinco genes de reparo do DNA (*XPD*, *XPF*, *ERCC1*, *XRCC3* e *XRCC1*), representando três diferentes caminhos de reparo (Shen et al., 1998).

O gene *XRCC1*, mapeado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2), codifica uma proteína conhecida pelo mesmo nome, que interage

com a DNA ligase III e DNA  $\beta$ -polimerase, reparando e ligando as bases que foram removidas. Indivíduos com o gene *XRCC1* polimórfico apresentam maior sensibilidade para agentes alcalinizantes e radiações ionizantes apresentando freqüências elevadas de trocas entre cromátides irmãs. Tal alteração funcional pode estar associada com o aumento do risco de câncer (Sturgis et al., 1999).

A redução da capacidade de reparo de DNA por polimorfismos nos respectivos genes encontra-se como fator de risco para alguns tipos de câncer, incluindo o CECP (Sturgis et al., 1999; Abdel-Rahman et al., 2000; Hung et al. 2005). Sturgis et al. (1999) demonstraram um aumento no risco de câncer bucal e de laringe associado com dois polimorfismos do gene *XRCC1* (*XRCC1* - códon194 - éxon 6 e *XRCC1* - códon 399 - éxon 10), particularmente em grupos que tinham como fator de risco o uso de álcool e tabaco. Quando esses dois polimorfismos gênicos foram considerados em conjunto houve um efeito aditivo no risco de câncer de cabeça e pescoço. Resultados contraditórios, principalmente em não fumantes, também foram relatados (Demokan et al., 2005). Também parece não haver dados que indiquem a contribuição do polimorfismo em genes de reparo na evolução dos pacientes com câncer da cabeça e pescoço.

Assim sendo, a busca de marcadores genéticos de suscetibilidade poderia auxiliar a prevenção do CECP por permitir a detecção precoce de indivíduos de alto risco e orientar a entrada em programas de vigilância. Além disso, estratégias por técnicas moleculares poderiam auxiliar na identificação de indivíduos em maior risco para o desenvolvimento do

câncer, principalmente associado ao consumo de álcool e tabaco. Esta estratégia poderia auxiliar o médico a encorajar indivíduos a alterarem seu estilo de vida e, por meio da identificação do risco individual, poderia permitir o diagnóstico e tratamento precoce, além de melhor aconselhamento terapêutico.

## 2. OBJETIVOS

1. avaliar a frequência de polimorfismos de genes de metabolização (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*, *CYP2E1*) e de genes de reparo do DNA (*XRCC1*) no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e compará-los a uma população controle.
2. avaliar a associação gene-gene no carcinoma epidermóide da cavidade bucal.
3. avaliar a interação gene-ambiente no carcinoma epidermóide da cavidade bucal.
4. correlacionar os polimorfismos genéticos estudados com parâmetros evolutivos no carcinoma epidermóide da cavidade bucal.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. Casuística

Um total de 451 indivíduos, de ambos os sexos, foi recrutado para o estudo. A seleção dos participantes iniciou-se em dezembro de 2000 e foi concluída em dezembro de 2004. Destes, 207 indivíduos tinham diagnóstico de CECP e 244 indivíduos sem câncer (controles). Todos os participantes pertenciam a diferentes clínicas do Hospital Heliópolis, São Paulo. Os exames clínicos e anatomopatológicos foram realizados no Hospital Heliópolis e as análises de polimorfismos genéticos no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

##### 3.1.1. Casos

Foram considerados casos elegíveis os pacientes maiores de 18 anos de idade, moradores na região metropolitana da cidade de São Paulo e com diagnóstico histopatológico confirmado de carcinoma epidermóide da cavidade bucal, faringe (orofaringe e hipofaringe) ou laringe admitidos no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis, São Paulo. Dos 207 casos, 184 eram do sexo masculino (89%) e 23 do sexo feminino (11%), com idades variando entre 24 e 81 anos (média =  $54,3 \pm 7,8$  anos). O grupo com câncer de cavidade bucal e faringe compreendeu 157 pacientes (76%), sendo 48 (23%) com tumores de orofaringe, 17 (8%) de hipofaringe e 92 (45%) com câncer da cavidade bucal. A idade média dos casos de CECP também variou de 24 a 81 anos

(média =  $53 \pm 8,1$  anos). O grupo com câncer da laringe somou 50 (24%) pacientes, 23 casos glóticos e 27 supraglóticos.

### 3.1.2. Controles

O grupo controle foi composto de 244 indivíduos sem história de câncer (225 homens e 19 mulheres) com idade mínima de 20 anos e máxima de 82 anos (média =  $53,6 \pm 9,3$  anos), admitidos no mesmo hospital e no mesmo período no qual os casos com câncer foram avaliados. As causas de hospitalização entre os controles foram agrupadas entre as grandes categorias diagnósticas (segundo a versão 10 da Classificação Internacional de Doenças – CID 10): doenças do sistema digestivo (44%) e doenças cardiovasculares (33%) representaram as causas mais comuns.

### 3.2. Questionário padronizado

Todos os pacientes com câncer e todos os controles foram entrevistados por um indivíduo treinado e familiarizado com o objetivo do estudo utilizando um questionário padronizado considerando hábitos de tabagismo, história de alcoolismo, hábitos nutricionais e ocupacionais. O consumo de tabaco foi expresso em maços/ano – uma variável que inclui ambas: intensidade e duração do tabagismo. Um maço/ano corresponde a fumar um maço de 20 cigarros por dia por um ano (isto é calculado multiplicando-se o número de maços de cigarros fumado por dia pelo



número de anos que a pessoa fumou). Informações sobre frequência e quantidade de álcool consumido foram estimadas para todas as bebidas alcoólicas, incluindo cervejas (5% etanol), vinhos (20% etanol) e bebidas com alto teor alcoólico ou cachaça (41% etanol).

Os casos foram seguidos prospectivamente, seguindo as diretrizes do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis. Os indivíduos eram orientados a retornos mensais nos primeiros dezoito meses pós-tratamento, trimestralmente até o quinto ano e semestralmente após. Nestas revisões todos os casos foram submetidos ao exame clínico otorrinolaringológico e a exames radiológicos e/ou endoscópicos conforme demanda. As informações de seguimento foram registradas em prontuários específicos e planilha do pesquisador. As informações sobre estado clínico geral, sítio da doença, estadiamento da doença (sistema TNM/AJCC/UICC 2002), grau de diferenciação histológica do tumor, recorrência da doença, presença de segundo tumor primário, metástase a distância e características do tratamento foram coletadas do prontuário médico. Os relatórios de anatomia patológica e as declarações de óbito foram atualizados a cada seis meses. Recorrência locorregional foi definida como a primeira recorrência do câncer no sítio primário e/ou cadeias linfonodais cervicais. Foi considerado segundo tumor primário quando a doença foi diagnosticada fora do sítio primário, separado por pelo menos dois centímetros de mucosa normal (Warren e Gates, 1932). As modalidades terapêuticas compreenderam a cirurgia, a radioterapia (com ou sem quimioterapia associada) com intenção curativa, isoladas ou

associadas. O tempo de seguimento variou de 30 dias a 82 meses, tempo mediano de 41 meses.

Todo o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa dos respectivos centros envolvidos bem como o termo de Consentimento Informado assinado pelos indivíduos participantes.

### 3.3. A pesquisa dos polimorfismos

Amostras de sangue periférico (5 ml) de 207 pacientes com CECP e de 244 controles sem câncer foram coletadas em EDTA. Após a lise dos glóbulos vermelhos com bicarbonato de amônia, o DNA foi extraído com solução salina saturada (Miller et al., 1988) e as amostras foram conservadas em freezer -20<sup>o</sup> C.

Foram analisados os polimorfismos de genes de metabolização da fase I como *CYP2E1*, *CYP1A1*, genes da fase II como *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* e genes de reparo (*XRCC1*). Detalhes dos genes, dos SNPs, das enzimas de restrição, dos *primers* utilizados, das condições da reação de PCR, bem como os tamanhos esperados dos produtos de PCR, com ou sem digestão enzimática, estão resumidos na Tabela 1.

Para o *CYP2E1* foi realizada a amplificação da região de regulação de transcrição do gene *CYP2E1*, que possui um sítio de restrição para a enzima *PstI* (Hayashi et al., 1991). Após 30 ciclos de amplificação os produtos de PCR foram digeridos com 10 unidades da enzima de restrição *PstI* (Gibco-BRL) e avaliados em gel de agarose a 2%.

Para o *CYP1A1* foi amplificado o éxon 7 para avaliação da presença da mutação reconhecida pela enzima *MspI* (Carstensen et al. 1993). Após 35 ciclos de amplificação o produto de PCR foi digerido com 5 unidades da enzima de restrição *MspI*, 37°C por no mínimo 3 horas. O produto de PCR foi avaliado em gel de agarose a 2%. Para a avaliação da presença ou ausência de genes *GSTM1* e *GSTT1* foi utilizada uma reação única de PCR (*multiplex – PCR*), conforme descrito por Abdel-Rahman et al. (1996). Como controle interno da reação, foram também incluídos *primers* específicos para amplificação do éxon 7 do gene *CYP1A1* (*CYP1A1-1* – 5' GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT -3' e *CYP1A1- 2* – 5'- CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC -3'). O produto de PCR foi identificado em gel de agarose a 2% e a presença do *GSTT1* foi identificada por um fragmento de 480 pb e do *GSTM1* por 215 pb. Um fragmento de 312 pb, presente em todas as reações, correspondeu ao gene *CYP1A1*, que serviu de controle interno da reação mostrando garantia de positividade no processo de amplificação.

Para a análise de polimorfismos do gene *GSTP1* foi feita a amplificação do éxon 5, na região de polimorfismo que inclui a mutação a ser reconhecida pela enzima *BsmA* (Lewis et al., 2002). A identificação dos fragmentos polimórficos foi efetuada em gel de poliacrilamida não desnaturante a 6%.

A amplificação da região de regulação de transcrição do gene *XRCC1* foi efetuada utilizando-se os *primers* correspondentes ao códon 194 e 399 que foram usados para gerar produtos de 313 pb e 615 pb, conforme descrito por Abdel-Rahman et al. (2000). Após 30 ciclos de amplificação o

produto de PCR foi digerido com a enzima de restrição *MspI* por 12 horas a 37°C. Os fragmentos gerados foram avaliados em gel de poliacrilamida não desnaturante a 6%.

Tabela 1. Relação dos polimorfismos genéticos estudados incluindo a mutação, a enzima selecionada na identificação do polimorfismo, os tamanhos de fragmentos gerados, os *primers* utilizados para amplificação e as condições de PCR utilizadas.

Gene	SNP	Transição	Enzima	Primer Forward	Primer Reverse	Selvagem	polimorfismos	Condições de PCR	Bibliografia
<i>XRCC1</i>	R194W	C → T	<i>MspI</i> 5U/37°C	5'- GCC CCG TCC AGG TA -3'	5'-AGCCCCAAGACCCTTTCATC-3'	313pb	292 e 21pb	<sup>a</sup> 94°/5' → 30X <sup>b</sup> 94°/30"; 62°/1 72°/45" <sup>c</sup> 72°/5'	ABDEL- RAHMAN et al., 2000
<i>XRCC1</i>	R399Q	G → A	<i>MspI</i> 5U/37°C	5'- TTG TGC TTT CTC TGT GTC CA-3'	5'-TCC TCC AGC CTT TTC TGA TA-3'	615pb	374 e 221 e 20pb	<sup>a</sup> 94°/5'→30X: <sup>b</sup> 94°/30";62°C/1';72°/45" <sup>c</sup> 72°/5'	ABDEL- RAHMAN et al., 2000
<i>CYP1A1</i>	I462V	A → G	<i>MspI</i> 5U/37°C	5'-TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT-3'	5'-CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT-3'	340pb	200 e 140pb	<sup>a</sup> 94°/5' → 35X: <sup>b</sup> 94°/30"; 63°/30"; 72°/30" <sup>c</sup> 72°/5'	CARSTENSEN et al., 1993
<i>CYP2E1</i>	G351S	G → T	<i>PstI</i> 10U/37°C	5'-CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA-3'	5'TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG - 3'	410pb	290 e 120pb	<sup>a</sup> 95°/1' → 30X: <sup>b</sup> 95°/1'; 55°/1'; 72°/5' <sup>c</sup> 72°/4'	Kato et al.,1992
<i>GSTP1</i>	I105V	A → G	<i>BsmA</i> 4U/37°C	5'-ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA-3'	5'- TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT -3'	176pb	91 e 85pb	<sup>a</sup> 94°/5' → 35X: <sup>b</sup> 94°/2'; 59°/1'; 72°/1' <sup>c</sup> 72°/10'	ABDEL- RAHMAN et al., 1996
<i>GSTM1</i>	-----	-----	-----	5'- GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3'	5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3'	215pb	-----	<sup>a</sup> 94°/5' → 30X: <sup>b</sup> 94°/2'; 59°/1';72°/1' <sup>c</sup> 72°/10'	ABDEL- RAHMAN et al., 1996
<i>GSTT1</i>	-----	-----	-----	5'- TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3'	5'- TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'	480pb	-----	<sup>a</sup> 94°/5' → 30X: <sup>b</sup> 49°/2'; 59°/1'; 72°/1' <sup>c</sup> 72°/10'	ABDEL- RAHMAN et al., 1996

R = arginina; W = triptofano; Q = glutamina; I = isoleucina; V = valina; G = glicina; S = serina; <sup>a</sup> temperatura inicial em °C por minutos (') e o número de ciclos usados na reação de PCR; <sup>b</sup> temperatura de denaturação em °C por minutos (') ou segundos ("); temperatura de anelamento em °C por minutos (') ou segundos ("); e extensão da cadeia em °C por minutos (') ou segundos ("); <sup>b</sup> extensão final da cadeia em °C por minutos (').

### 3.4. Análise Estatística

Os *odds ratios* e os respectivos intervalos de confiança de 95% foram estimados por regressão logística não condicional para controlar simultaneamente possíveis variáveis de confusão. Para avaliar a relação entre a variável dependente (câncer) e as variáveis independentes (enzimas de metabolização, tabaco e álcool), a técnica estatística utilizada foi a análise de regressão logística (Breslow e Day, 1980), que permite avaliar o risco de câncer associado a uma determinada variável considerando-se todos as demais variáveis independentes no modelo. Outras correlações estatísticas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. O tempo médio de sobrevida específica por câncer foi definido como o intervalo entre a data do diagnóstico e a última informação objetiva de seguimento ou a morte causada pela doença. Diferenças no tempo médio de sobrevida foram testadas usando *log-rank test* (Miller, 1981).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. População do estudo

As principais características das populações estudadas são apresentadas na Tabela 2. Os dois grupos estudados foram similares quanto ao número de homens e mulheres e cor da pele. Nesta investigação, a maioria dos pacientes com CECP tinha 60 anos ou menos e foram considerados brancos de acordo com aparência da cor da pele e dados pesquisados acerca da cor da pele da família (72%).

A Tabela 2 mostra também a distribuição dos indivíduos segundo consumo de tabaco e álcool entre os casos e os controles. Quando considerados todos os casos, 97% eram fumantes enquanto que 77% do grupo controle tinha história de consumo de tabaco (Tabela 2). De modo semelhante, cerca de 93% dos casos de CECP relataram ser consumidores diários de bebidas alcoólicas ao passo que entre os controles essa taxa caiu para 78% (Tabela 2). O consumo médio diário de álcool entre os casos CECP foi de 157 g/L/dia, enquanto que entre os controles foi de 58 g/L/dia. Os casos foram mais prováveis de consumirem mais de 30 g/L/dia (etilistas pesados) que os controles (73% versus 35%). Este consumo crônico e intenso de álcool (> 30 g/L/dia) foi associado com um aumento no risco para o CECP de 6,4 vezes comparado com não etilistas (OR = 6,4; IC 95%, 3,3–12,6). O consumo médio de cigarros entre os casos foi de 38 maços/ano comparado com 25 maços/ano entre os controles. Por outro lado, a taxa de grandes consumidores de tabaco (> 39 maços/ano) entre os casos CECP foi

de 39% contra 22% nos controles, elevando para praticamente 12 vezes o risco de câncer de cabeça e pescoço (OR = 11,8; IC 95%, 4,7 – 30,6). Quando analisamos pacientes com CECB isoladamente, observamos distribuição diferente da observada no grupo de CECP (Tabela 2), tanto em relação ao consumo de tabaco como de álcool.

Embora o número de pacientes com CECB seja menor, verificou-se um efeito maior do consumo de álcool no risco de câncer que variou de 3 a 4 vezes e do cigarro que variou de 8 a 18 vezes (Tabela 2). O consumo de 20-39 maços /ano de cigarro aumentou em aproximadamente 5 vezes o risco de CECP (OR = 4,6; IC 95%, 1,7 – 12,7) e 16 vezes o risco de CECB (OR = 16,1; IC 95%, 3,7-69,1).



Tabela 2: Distribuição de fatores demográficos entre CECP (n=207), CECB (n=92) e controles (n=244).

Fator	Controles(%) n=244	CECP (%) n=207	OR (95% IC)	CECB(%) n=92	OR (95% CI)
<b>Gênero</b>					
Masculino	225 (92)	184 (89)	ns	81 (88)	ns
Feminino	19 (08)	23 (11)		11 (12)	
<b>Cor da pele</b>					
branca	146 (60)	149 (72)	ns	62 (67)	ns
não branca	98 (40)	58 (28)		30 (33)	
<b>Idade (anos)</b>					
Média ± dp	53,6 (± 9,3)	54,3 (± 7,8)	ns	53,0 (± 8,1)	ns
18-40	24 (10)	10 ( 5)		8 ( 9)	
41-50	68 (28)	74 (36)		37 (40)	
51-60	89 (36)	70 (34)		24 (26)	
61-70	54 (22)	42 (20)		18 (20)	
71+	09 ( 4)	11 ( 5)		5 ( 5)	
<b>g/l/d – consume álcool</b>					
0	55 (22)	15 ( 7)	1	9 (10)	1
< 5	14 ( 6)	21 (10)	5,5 (2,1-14,7)*	7 (08)	3,1 (0,8-11,6)
5 -30	89 (37)	21 (10)	0,9 (0,9-1,9 )	13 (14)	0,9 (0,4-2,2)
> 30	86 (35)	150 (73)	6,4 (3,3-12,6)*	63 (68)	4,4 (2,1-9,7)*
Média g/l/d	58	157		129	
Duração – anos	23	31		29	
<b>Tabaco - maços/ano</b>					
0	57 (23)	7 ( 3)	1	2 ( 2)	1
1 – 19	69 (29)	32 (16)	3,8 (1,5-10,2)*	19 (21)	7,9 (1,8-35,3)*
20 – 39	62 (26)	87 (42)	4,6 (1,7-12,7)*	35 (38)	16,1 (3,7-69,1)*
40 +	56 (22)	81 (39)	11,8 (4,7-30,6)*	36 (39)	18,3 (4,2-79,8)*
Média m/a	25	38		37	
Duração anos	24	35		34	

\* valores de p são estatisticamente significativos ; ns = p > 0,05

## 4.2. Análise dos polimorfismos genéticos

A tabela 3 mostra a distribuição das freqüências genotípicas para os diferentes genes de metabolização (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*, *CYP2E1*) e genes de reparo do DNA (*XRCC1*) nos pacientes com CECP e nos respectivos controles. O genótipo *GSTM1* nulo esteve presente em maior freqüência (53,2%) nos casos de CECP quando comparados aos controles (37,7%), o que resultou em aumento de risco para a doença em aproximadamente 5 vezes (OR = 4,75; IC 95%, 3,06-7,40).

Quando avaliados isoladamente os casos de CECB, observamos aumento no risco para os casos com genótipo nulo *GSTM1* (OR=2,15, IC 95%, 1,28 - 3,6), bem como nos casos com genótipo *XRCC1-194Trp* (OR=2,33, IC 95%, 1,08 - 4,98). Por outro lado, o genótipo *XRCC1-399Gln* em heterozigose (52%) ou homozigose (12,3%) foi mais prevalente nos controles quando comparado com os casos (39,1% e 6,5%, respectivamente), resultando em um fator de proteção para o CECB (OR=0,35, IC 95%, 0,12 - 0,96).

As correlações entre os diferentes genótipos e os sítios anatômicos orofaringe, hipofaringe e laringe não apresentaram significância estatística.

Tabela 3. Distribuição das freqüências dos diferentes genótipos entre casos, controles e por sítios anatômicos separadamente.

Genótipo	Controles	CECP	CECB	Orofaringe	Laringe	Hipofaringe
	(n=244)	(n=207)	(n=92)	(n=48)	(n=50)	(n=17)
<i>GSTM1</i>						
não nulo #	152 (62,35)	97 (46,8)	40 (43,5)	23 (47,9)	25 (50)	9 (52,9)
nulo	92 (37,7)	110 (53,2)	52 (56,5)	25 (52,1)	25 (50)	8 (47,1)
OR (IC 95%)		<b>4,75(3,06-7,40)*</b>	<b>2,15(1,28-3,6)*</b>	1,80(0,92-3,50)	1,65(0,86-3,18)	1,47(0,50-4,33)
<i>GSTT1</i>						
não nulo #	197 (80,7)	163 (78,7)	69 (75)	40 (83,3)	42 (84)	12 (70,6)
nulo	47 (19,3)	44 (21,3)	23 (25)	8 (16,7)	8 (16)	5 (29,4)
OR (IC 95%)		1,13(0,7-1,84)	1,4(0,76-2,56)	0,84(0,34-2,02)	0,80(0,32-1,92)	1,75(0,51-5,70)
<i>GSTP1 BmsA</i>						
wt/wt	96 (39,4)	80 (38,6)	40 (43,5)	19 (39,6)	17 (34)	4 (23,5)
wt/m	115 (47,1)	101 (48,8)	47 (51,1)	22 (45,8)	24 (48)	8 (47,1)
m/m	33 (13,5)	26 (12,6)	5 (5,4)	7 (14,6)	9 (18)	5 (29,4)
OR (IC 95%)		0,97(0,50-1,78)	0,36(0,12-1,07)	1,07(0,37-3,02)	1,54(0,57-4,11)	3,6(0,78-17,40)
<i>CYP2E1 PstI**</i>						
wt/wt	222 (91,)	182 (87,9)	78 (84,8)	42 (87,5)	47 (94)	15 (88,2)
wt/m	22 (9)	25 (12,1)	14 (15,2)	6 (12,5)	3 (6)	2 (11,8)
OR (IC 95%)		1,39(0,73-2,65)	1,81(0,83-3,92)	1,4(0,49-4,05)	0,64(0,15-2,40)	1,35(0,0-6,79)
<i>CYP1A1 MstI</i>						
wt/wt	164 (67,2)	134 (64,7)	59 (64,1)	30 (62,5)	31 (62)	14 (82,3)
wt/m	72 (29,5)	67 (32,4)	29 (31,5)	17 (35,4)	18 (36)	3 (16,7)
m/m	8 (3,3)	6 (2,9)	4 (4,4)	1 (2,1)	1 (2)	***
OR (IC95%)		0,92 (0,27-3,0)	1,39 (0,34-5,34)	0,68(0,03-5,74)	0,66(0,03-5,54)	0,49(0,11-1,89)
<i>XRCC1-194Trp</i>						
wt/wt	221 (90,6)	176(85)	76 (82,6)	40 (83,4)	46 (92)	14 (82,3)
wt/m	20 (8,2)	29 (14)	16(17,4)	6 (12,5)	4 (8)	3 (16,7)
m/m	3 (1,2)	2 (1)	***	2 (4,1)	***	***
OR (IC 95%)		0,84 (0,1-6,22)	<b>2,33 (1,08-4,98)*</b>	3,7(0,42-28,27)	0,96(0,26-3,17)	2,37(0,49-9,91)
<i>XRCC1-399Gln</i>						
wt/wt	87 (35,7)	100 (48,3)	50 ( 54,4)	20 (41,7)	24 (48)	6 (35,3)
wt/m	127 (52,0)	89 (43)	36 (39,1)	21 (43,8)	23 (46)	9 (52,9)
m/m	30 (12,3)	18 (8,7)	6 (6,5)	7 (14,6)	3(6)	2 (11,8)
OR (IC 95%)		0,52(0,26-1,05)	<b>0,35(0,12-0,96)*</b>	1,01(0,35-2,87)	0,36(0,08-1,14)	0,97(0,13-5,75)

IC, intervalo de confiança; wt/wt, homocigoto selvagem; wt/m, heterocigoto; m/m, homocigoto mutado; # pelo menos uma cópia do gene presente; \* valores de p estatisticamente significativos (< 0,05); \*\* não foram encontrados indivíduos homocigotos para a mutação em *CYP2E1*; \*\*\* nas categorias onde o gene mutado não foi encontrado em homocigose considerou-se os indivíduos heterocigotos para o cálculo de OR

Considerando-se que polimorfismos nos genes de metabolização das fases I e II podem estar presentes no mesmo indivíduo, esta coincidência poderia, em tese, aumentar o risco associado à doença. Como o estudo de associação de genes requer a análise de um número maior de indivíduos, a comparação entre polimorfismos nos genes de fase I (GSTs) *versus* os genes da fase II (CYPs) e genes de reparo (*XRCC1*) foi realizada somente nos pacientes com CECP e CECB. As tabelas de 4 a 7 revelam os resultados obtidos na análise de associação entre polimorfismos GSTs e CYP450 (Tabela 4), polimorfismos GSTs e genes de reparo (Tabela 5) e CYP450 e genes de reparo (Tabela 6).

Nas análises das possíveis associações considerou-se como referência a presença do gene selvagem em ambos os genes estudados para comparação. O genótipo *GSTM1* nulo combinado com *CYP2E1* mutado em heterozigose foi a mais freqüente nos casos com CECP (58,9%) e nos casos de CECB (64,1%) que nos controles (43,9%), sendo que esta diferença aumentou o risco do câncer em aproximadamente duas vezes no CECP (OR = 1,84; IC 95%, 1,24 – 2,72) e no CECB (OR = 2,29; IC 95%, 1,36 - 3,87). Resultados semelhantes foram observados para a associação do gene *GSTM1* nulo e *CYP1A1* mutado em homozigose ou heterozigose, como visto na tabela 4. É interessante ressaltar que nesse caso o risco para o CECB foi ainda maior (OR = 1,93; IC 95%, 1,10 – 3,37),

Tabela 4: Distribuição das associações gene-gene na comparação entre GSTs e CYPs nos casos com CECP, CECB e controles.

Genótipo	Controles	CECP	CECB
	n=244(%)	n=207(%)	n=92(%)
<i>GSTM1# / CYP2E1</i>			
não nulo e wt/wt	137 (56,1)	85 (41,1)	33 (35,9)
nulo e wt/m	107 (43,9)	122 (58,9)	59 (64,1)
OR (IC 95%)		<b><u>1,84(1,24-2,72)*</u></b>	<b><u>2,29(1,36-3,87)*</u></b>
<i>GSTT1# / CYP2E1</i>			
não nulo e wt/wt	184 (75,4)	145 (70,0)	59 (64,1)
nulo e wt/m	60 (24,6)	62 (30,0)	33 (35,9)
OR (IC 95%)		1,31(0,85-2,03)	1,72(0,99-2,97)
<i>GSTP1 / CYP2E1</i>			
wt/wt - wt/wt	88 (36,1)	72 (34,8)	34 (37)
wt/m ou m/m e m/m	156 (63,9)	135 (65,2)	58 (63)
OR (IC95%)		1,06(0,7-1,59)	0,96(0,57-1,63)
<i>GSTM1# / CYP1A1</i>			
não nulo e wt/wt	102 (41,8)	66 (31,9)	25 (27,2)
nulo e wt/m ou m/m	142 (58,2)	141 (68,1)	67 (72,8)
OR (IC 95%)		<b><u>1,53(1,02-2,30)*</u></b>	<b><u>1,93(1,10-3,37)*</u></b>
<i>GSTT1# / CYP1A1</i>			
não nulo e wt/wt	130 (53,3)	100 (48,3)	42 (45,7)
nulo e wt/m ou m/m	114 (46,7)	107 (51,7)	50 (54,3)
OR (IC 95%)		1,22(0,83-1,80)	1,36(0,82-2,26)
<i>GSTP1 / CYP1A1</i>			
wt/wt – wt/wt	65 (26,6)	54 (26,1)	29 (31,5)
wt/mm ou m/m	179 (73,4)	153 (73,9)	63 (68,5)
OR (IC95%)		1,03(0,66-1,60)	0,79(0,45-1,38)

IC, intervalo de confiança; wt/wt, homocigoto selvagem; wt/m, heterocigoto; m/m, homocigoto mutado

# pelo menos uma cópia do gene presente

\* valores de p estatisticamente significativos (< 0,05)

A tabela 5 mostra a análise das associações entre GSTs e genes de reparo, onde o genótipo *GSTM1* nulo combinado ao genótipo *XRCC1-194* polimórfico aumentou o risco para indivíduos com CECB em mais de 2 vezes (OR=2,44; IC 95%, 1,44-4,14). Resultados semelhantes foram observados para os pacientes com CECP (OR=1,91; IC95%, 1,29-2,83). As demais associações entre GSTs e enzimas de reparo não foram estatisticamente diferentes quando consideradas entre os grupos (tabela 5).

Tabela 5: Distribuição das associações gene-gene na comparação entre GSTs e genes de reparo nos casos com CECP, CECB e controles.

Genótipo	Controles	CECP	CECB
	n=244 (%)	n=207 (%)	n=92 (%)
<i>GSTM1# / XRCC1-194</i>			
não nulo e wt/wt	138 (56,6)	84 (40,6)	32 (34,8)
nulo e wt/m ou m/m	106 (43,4)	123 (59,4)	60 (65,2)
OR (IC 95%)		<b><u>1,91 (1,29-2,83)*</u></b>	<b><u>2,44(1,44-4,14)*</u></b>
<i>GSTM1# / XRCC1-399</i>			
não nulo e wt/wt	57 (23,4)	49 (23,7)	23 (25)
nulo e wt/m ou m/m	187 (76,6)	158 (76,3)	69 (75)
OR (IC 95%)		0,98 (0,62-1,56)	0,91 (0,51-1,66)
<i>GSTT1# / XRCC1-194</i>			
não nulo e wt/wt	175 (71,7)	138 (66,7)	56 (60,9)
nulo e wt/m ou m/m	69 (28,3)	69 (33,3)	36 (39,1)
OR (IC 95%)		1,27 (0,83-1,93)	1,63 (0,96-2,78)
<i>GSTT1# / XRCC1-399</i>			
não nulo e wt/wt	71 (29,1)	76 (36,7)	33 (35,9)
nulo e wt/m ou m/m	173 (70,9)	131 (63,3)	59 (64,1)
OR (IC 95%)		0,71 (0,47-1,07)	0,73 (0,43-1,26)
<i>GSTP1 / XRCC1-194</i>			
wt/wt e wt/wt	85 (34,8)	67 (32,4)	32 (34,8)
wt/m ou m/m e wt/m ou m/m	159 (65,2)	140 (67,6)	60 (65,2)
OR (IC 95%)		1,12 (0,74-1,69)	1,0 (0,59-1,71)
<i>GSTP1 / XRCC1-399</i>			
wt/wt e wt/wt	37 (15,2)	39 (18,9)	22 (23,9)
wt/m ou m/m e wt/m ou m/m	207 (84,8)	168 (81,1)	70 (76,1)
OR (IC95%)		0,77 (0,46-1,30)	0,75 (0,30-1,07)

IC, intervalo de confiança; wt/wt, homocigoto selvagem; wt/m, heterocigoto; m/m, homocigoto mutado

# pelo menos uma cópia do gene presente

\* valores de p estatisticamente significantes (< 0,05)

Na associação entre as enzimas de fase I (CYPs) e as enzimas de reparo (Tabela 6), obtivemos risco aumentado somente para os casos de CECB na presença genótipos polimórficos *CYP2E1* e *XRCC1-194* (OR = 2,0; IC 95%, 1,1 – 3,62). Em contra partida, a combinação *CYP1A1* e *XRCC1-399* variantes parecem estar associada com proteção ao CECB (OR = 0,51; IC 95%, 0,29 – 0,89) e CCEP (OR = 0,64; IC 95%, 0,41 – 0,99).

Tabela 6. Distribuição das associações gene-gene na comparação entre CYPs e genes de reparo nos casos com CCEP, CECB e controles.

Genótipo	Controles	CECP	CECB
	n=244 (%)	n=207 (%)	n=92 (%)
<i>CYP1A1 / XRCC1-194</i>			
wt/wt e wt/wt	150 (61,5)	115 (55,6)	48 (52,2)
wt/m ou m/m e wt/m ou m/m	94 (38,5)	92 (44,4)	44 (47,8)
OR (IC95%)		1,28 (0,86-1,89)	1,46 (0,88-2,44)
<i>CYP1A1 / XRCC1-399</i>			
wt/wt e wt/wt	54 (22,1)	64 (30,9)	33 (35,9)
wt/m ou m/m e wt/m ou m/m	190 (77,9)	143 (69,1)	59 (64,1)
OR (IC95%)		<b>0,64 (0,41-0,99)*</b>	<b>0,51(0,29-0,89)*</b>
<i>CYP2E1 / XRCC1-194</i>			
wt/wt e wt/wt	202 (82,8)	156 (75,4)	65 (70,7)
wt/m ou m/m e wt/m ou m/m	42 (17,2)	51 (24,6)	27 (29,3)
OR (IC95%)		1,57 (0,97-1,03)	<b>2,0 (1,10-3,62)*</b>
<i>CYP2E1 / XRCC1-399</i>			
wt/wt e wt/wt	79 (32,4)	85 (41,1)	41 (44,6)
wt/m ou m/m e wt/m ou m/m	165 (67,6)	122 (58,9)	51 (55,4)
OR (IC95%)		0,69 (0,46-1,03)	0,60 (0,35-1,0)

IC, intervalo de confiança; wt/wt, homocigoto selvagem; wt/m, heterocigoto; m/m, homocigoto mutado  
\* valores de p estatisticamente significantes (< 0,05)



Quando consideradas as associações de polimorfismos nos mesmos grupos de genes da fase I, fase II e genes de reparo, parece não haver contribuição no risco de CECP e de CECB conforme apresentado na tabela 7. A única exceção foi a associação dos polimorfismos *XRCC1-194* e *XRCC1-399* que parece ser um fator de proteção somente para o CECP (OR=0,33; IC95%, 0,22 – 0,49 – Tabela 7).

Tabela 7. Associação gene-gene considerando os polimorfismos GSTs versus GSTs, CYPs versus CYPs e genes de reparo versus genes de reparo, entre casos de CECP, CECB e controles.

Genótipo	Controles	CECP	CECB
	n=244 (%)	n=207 (%)	n=92 (%)
<i>GSTM1 / GSTT1</i>			
não nulo	124 (50,8)	88 (42,6)	36 (39,2)
nulo e #	120 (49,1)	119 (57,4)	56 (60,8)
OR (IC 95%)		1,40 (0,95 – 2,06)	1,61 (0,96 – 2,70)
<i>GSTM1 / GSTP1</i>			
não nulo e wt/wt	54 (22,1)	38 (18,4)	19 (20,7)
nulo e wt/m ou m/m	190 (78,9)	169 (81,6)	73 (79,3)
OR (IC95%)		1,26(0,78-2,06)	1,09(0,58-2,05)
<i>GSTT1 / GSTP1</i>			
não nulo e wt/wt	79 (32,4)	64 (30,9)	32 (34,8)
nulo e wt/m ou m/m	165 (67,6)	143 (69,1)	60 (65,2)
OR (IC95%)		1,07(0,70-1,63)	0,90(0,53-1,54)
<i>CYP2E1 / CYP1A1</i>			
wt/wt e wt/wt	148 (60,7)	122 (58,9)	52 (56,5)
wt/m e wt/m ou m/m	96 (39,3)	85 (41,1)	40 (43,5)
OR (IC 5%)		1,07(0,72-1,60)	1,19(0,71-1,98)
<i>XRCC1-194 / XRCC1- 399</i>			
wt/wt e wt/wt	79 (32,4)	84 (40,6)	40 (43,5)
wt/m ou m/m	165 (67,6)	123 (59,4)	52 (56,5)
OR (95%IC)		0,33 (0,22-0,49)	0,62 (0,37-1,05)

IC, intervalo de confiança; wt/wt, homozigoto selvagem; wt/m, heterozigoto; m/m, homozigoto mutado  
# pelo menos uma cópia do gene presente

No CECB as importantes contribuições de fatores do meio ambiente como o tabaco e o álcool parecem comprovadas e aceitas. Considerando-se que na presente investigação foram estudados genes envolvidos na metabolização de compostos carcinogênicos, presentes na combustão do tabaco e etanol, foram analisadas as possíveis associações entre os polimorfismos genéticos e o uso de bebidas alcoólicas e cigarros. Foram estratificados os casos de CECB e os controles, em função da intensidade e tempo de uso do tabaco e a quantidade diária de ingestão de álcool (Tabela 8).

O consumo de cigarros foi avaliado entre pacientes fumantes (90/92 = 98%) e entre controles fumantes (187/244 = 77%), estratificados em 1 a 19 maços/ano, 20 a 39 maços/ano e mais de 39 maços/ano. Ao analisarmos o polimorfismo *GSTP1 BmsA* em homozigose ou heterozigose evidenciamos maior frequência nos casos que consumiam mais de 39 maços/ano (72%) quando comparados aos controles de igual consumo (54%), sendo que esta diferença foi estatisticamente significativa (OR = 5,0; IC 95%, 1,9 -12,4).

Também encontramos associação positiva, ou seja, relacionada ao aumento de risco para o CECB, em indivíduos com o polimorfismo *CYP1A1MstI* e o consumo de 20 ou mais maços/ano de cigarro, quando comparados aos controles com mesma taxa de consumo de cigarros. Pacientes com CECB que consumiam de 20-39 maços/ano de cigarros aumentaram em 3,7 vezes o risco de câncer (OR=3,7; IC 95%, 1,0 – 14,2) e o consumo de mais de 39 maços/ano aumentou em mais de 4 vezes o risco de CECB (OR = 4,4, IC 95%, 1,2 – 14,2 – Tabela 8).

Para o consumo de álcool, também estratificamos os pacientes com CECB e os controles segundo consumo diário em gramas/litro/dia. Os indivíduos foram divididos segundo o consumo de 1-5 g/l/d, 5-30 g/l/d e consumo maior que 30 g/l/d. Associações significativas foram verificadas em relação às enzimas de reparo do DNA. Nos pacientes etilistas (83/92 = 90%) encontramos maior frequência de polimorfismos para *XRCC1-194* entre aqueles que consumiam mais de 30 g/l/d, determinando um risco oito vezes maior para o CECB (OR = 8,8; IC 95%, 1,3-45,7 – Tabela 7), quando comparados aos controles. Já o polimorfismo *XRCC1-399* mostrou proteção ao câncer de boca quando comparados casos e controles que consumiam de 5 – 30 g/l/d de bebidas alcoólicas (OR = 0,1; IC 95%, 0,03 – 0,7 – Tabela 7).

Tabela 8. Freqüências dos genótipos mutados *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1 BsmA*, *CYP1A1 MspI*, *CYP2E1 PstI*, *XRCC1-194Trp*, *XRCC1-399Gln* dos casos com CECB e controles, estratificados por uso de tabaco (90 pacientes e 187 controles) e consumo de álcool (83 pacientes e 189 controles).

GENÓTIPOS	TABACO								
	1-19 m/a			20-39 m/a			> 39 m/a		
	Casos N=19 (%)	Controles N=69 (%)	OR (IC 95%)	Casos N=35 (%)	Controles N=62 (%)	OR (IC 95%)	Casos N=36 (%)	Controles N=56 (%)	OR (IC 95%)
<i>GSTM1</i> (-)	12 (63)	23 (33)	1.00	20 (57)	25 (40)	1.53 (0.5-4.2)	20 (55)	22 (39)	1.74 (0.7-4.8)
<i>GSTT1</i> (-)	6 (31)	12 (17)	1.00	5 (14)	12 (19)	0.83 (0.2-3.48)	10 (28)	11 (19)	1.8 (0.5-6.7)
<i>GSTP1</i> (wt/m+m/m)	8 (42)	46 (67)	1.00	16 (46)	33(53)	2.80 (1.1-7.3)	26 (72)	30 (54)	<b>5.0 (1.9-12.4)*</b>
<i>CYP1A1</i> (wt/m+m/m)	5 (26)	28 (41)	1.00	14 (40)	21 (34)	<b>3.7 (1.0-14.2)*</b>	14 (39)	18 (32)	<b>4.4 (1.2-14.2)*</b>
<i>CYP2E1</i> (wt/m)	3 (16)	6 (8)	1.00	5 (14)	4 (6)	2.5 (0.3-16.8)	6 (17)	8 (14)	1.5 (0.2-8.5)
<i>XRCC1-194</i> (wt/m+m/m)	2 (10)	6 (8)	1.00	9 (26)	7 (11)	3.8 (0.6-25.3)	5 (14)	6 (11)	2.5 (0.2-18.3)
<i>XRCC1-399</i> (wt/m+m/m)	8 (42)	41(59)	1.00	15 (43)	42 (68)	1.8 (0.7-5.3)	19 (53)	36 (64)	2.7 (0.9-7.7)
GENÓTIPOS	ÁLCOOL								
	1-5 g//d			5-30 g//d			>30 g//d		
	Casos N=7 (%)	Controles N=14 (%)	OR (IC 95%)	Casos N=13 (%)	Controles N=89 (%)	OR (C 95%)	Casos N=63 (%)	Controles N=86 (%)	OR (IC 95%)
<i>GSTM1</i> (-)	4 (57)	9 (64)	1.00	9 (69)	27 (30)	0.75 (0.1-3.8)	37 (59)	33 (37)	2.5 (0.6-8.96)
<i>GSTT1</i> (-)	1 (14)	2 (14)	1.00	4 (31)	14 (16)	0.57 (0.04-8.4)	16 (25)	21 (24)	1.5 (0.1-18.3)
<i>GSTP1</i> (wt/m+m/m)	4 (57)	11 (78)	1.00	10 (77)	56 (63)	0.50 (0.1-2.3)	35 (56)	45 (52)	2.1 (0.6-8.8)
<i>CYP1A1</i> (wt/m+m/m)	3 (43)	5 (36)	1.00	7 (54)	28 (31)	0.4 (0.1-2.9)	20 (32)	29 (34)	1.2 (0.2-7.0)
<i>CYP2E1</i> (wt/m)	-	-	-	2 (15)	8 (9)	1.00	10 (16)	7 (8)	5.7 (0.9-35.4)
<i>XRCC1-194</i> (wt/m+m/m)	-	-	-	3 (8)	12 (19)	1.00	11 (30)	5 (9)	<b>8.8 (1.3-45.7)*</b>
<i>XRCC1-399</i> (wt/m+m/m)	5 (26)	7 (10)	1.00	6 (17)	62 (70)	<b>0.1 (0.03-0.7)*</b>	27 (43)	58 (67)	0.6 (0.2-2.6)

OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; wt/wt, homocigoto selvagem; wt/m, heterocigoto mutado; m/m, homocigoto mutado; \*valores de p estatisticamente significantes (p<0,05); m/a, maços/ano

### 4.3. Características clínicas pacientes com CECB

Comumente, descrevemos o CECB agrupando de forma generalizada os tumores dos diferentes sítios anatômicos. Evidentemente, o estudo destes tumores como um só grupo não nos permite uma análise detalhada em relação ao perfil epidemiológico, bem como em relação ao estágio clínico ao diagnóstico, tratamento e prognóstico. Por estes motivos, associado ao fato de que nossa casuística apresenta um grupo homogêneo, com seguimento clínico e estudo molecular definido, avançamos nossa análise com o grupo de casos com CECB.

Como era esperado, confirmamos a tendência de diagnóstico do CECB na maioria dos casos numa fase avançada. Na Tabela 9, verificou-se que predominaram os estágios clínicos III e IV, onde tumores tinham mais de 4 centímetros no seu maior eixo, ou seja, 60% (55/92) dos casos foram classificados como T3 ou T4 e mais da metade destes casos já com doença metastática regional (50/92 = 54%).

Destes 92 casos, 80 (87%) foram submetidos a tratamento curativo. Quarenta e três casos (47%) submetidos à cirurgia exclusivamente, 23 (25%) pacientes tiveram a radioterapia adjuvante ao tratamento cirúrgico e 14 (16%) pacientes submeteram-se ao tratamento radioterápico (com ou sem quimioterapia associada). Os demais 12 (13%) pacientes foram tratados sem intenção curativa, ou seja, tratamento de suporte e/ou paliativo (Tabela 9).

No tocante ao controle clínico da doença (considerados os tratados curativamente), 28/80 (35%) pacientes apresentaram recorrência após

tratamento. Houve 16 (20%) recidivas locais, seis (7,5%) regionais e seis (7,5%) recidivas locorregionais.

Houve 7/92 (8%) casos de segundo tumor primário e 9/92 (10%) casos de metástase a distância (Tabela 9). Durante o período de acompanhamento, ocorreram 50 mortes ( $50/92 = 54\%$ ). Destas, 43 (86%) em decorrência do câncer e apenas 7 (14%) por causas não relacionadas ao câncer (Tabela 9).

Tabela 9. Características clínicas, tratamento e evolução dos pacientes com CECB.

Fatores	CECB (n=92)	%
Estádio T		
T1	5	5
T2	32	35
T3	23	25
T4	32	35
Estadio N		
N0	42	46
N1	18	19
N2	26	28
N3	6	7
Estadio Clinico		
I	3	3
II	21	23
III	22	24
IV	46	50
Tratamento		
Cirurgia	43	47
Cirurgia + Rdt	23	25
Rdt (Qct)	14	16
Nenhum	12	13
Recorrência		
Sim	28	35
Não	52	65
Não avaliada	12	13
2º tumor primario.		
Sim	7	8
Não	85	92
MD		
Sim	9	10
Não	83	90
Status*		
MOAS	7	14
MOCA	43	86
VSD	38	38
VCD	4	4

Rdt = radioterapia; QcT = quimioterapia; MD = metástase a distância

\*MOAS = morto sem câncer; MOCA=morto pelo câncer; VSD=vivo sem câncer; VCD=vivo com câncer

Como já visto, das análises globais obtivemos correlações significativas quanto à interferência de alguns polimorfismos genéticos no risco ou proteção ao CECB. Por isso avançamos nossa análise para caracterização destes pacientes quanto aos genótipos, tendo em vista a evolução clínica.

Em virtude da extensão local e presença de linfonodo cervical metastático serem considerados os mais significativos fatores determinantes da progressão e sobrevivência no CECB, avaliamos a associação entre os genótipos que mostraram aumentar o risco para o câncer da boca e alguns parâmetros clínicos.

O genótipo polimórfico *XRCC1-399* foi mais frequente nos casos sem metástase linfonodal (60%) que naqueles com metástase ao diagnóstico (34%), determinando correlação estatisticamente significativa (OR = 0,3; IC 95%, 0,1 – 0,8), parecendo ser um fator de proteção à metástase (Tabela 10).



Tabela 10. Correlação entre genótipos e o estágio clínico e *status* linfonodal

Genótipo	Estádio Clínico		OR (IC 95%)	LNM		OR (IC 95%)
	I/II (%)	III/IV		Não (%)	Sim	
<i>GSTM1</i> não nulo nulo	10 (42) 14 (58)	30 (44) 38 (56)	0,9 (0,3 – 2,5)	19 (45) 23 (55)	21 (42) 29 (58)	1,1 (0,4 – 2,8)
<i>XRCCI-194Trp</i> wt/wt wt/m e m/m	19 (79) 5 (21)	57 (84) 11 (16)	0,7 (0,2 – 2,8)	35 (83) 7 (17)	41 (82) 9 (18)	1,1 (0,3 – 3,7)
<i>XRCC1-399Gln</i> wt/wt wt/m e m/m	10 (42) 14 (58)	40 (59) 28 (41)	0,5 (0,1 – 1,4)	17 (40) 25 (60)	33 (66) 17 (34)	<b>0,3 (0,1 – 0,80)*</b>
<i>GSTM1#CYP2E1 PstI</i> não nulo e wt/wt nulo e wt/m ou m/m	10 (42) 14 (58)	23 (34) 45 (66)	1,9(0,6-5,9)	16 (38) 26 (62)	17 (34) 33 (66)	1,1 (0,4 - 3,0)
<i>GSTM1#CYP1A1MspI</i> não nulo e wt/wt nulo - wt/m, m/m	9 (37) 15 (63)	16 (23) 52 (77)	1,9 (0,6 – 5,9)	13 (31) 29 (69)	12 (24) 38 (76)	1,4 (0,5 – 3,9)
<i>GSTM1#XRCC1-194</i> não nulo e wt/wt nulo e wt/m ou m/m	8 (33) 16 (67)	24 (35) 44 (65)	0,9 (0,3 – 2,7)	16 (38) 26 (62)	16 (68) 34 (32)	1,3 (0,5 – 3,3)
<i>CYP2E1Pst /XRCC1-194</i> wt/wt e wt/wt wt/m ou m/m	19 (79) 5 (21)	46 (68) 22 (32)	1,8 (0,5 - 6,4)	31 (74) 11 (26)	34 (68) 16 (32)	1,3 (0,4 - 3,3)
TOTAL	24	68		42	50	

OR, odds ratio ; LNM, linfonodo metastático; IC, intervalo de confiança; wt/wt, homocigoto selvagem; wt/m, mutado heterocigoto; m/m, mutado homocigoto  
# pelo menos uma cópia do gene presente

No tocante aos parâmetros clínicos recorrência locorregional, segundo tumor primário e metástase a distância os polimorfismos nos genes estudados parecem estar associados somente com a recorrência locorregional. O genótipo *GSTM1* nulo foi mais freqüente nos pacientes com CECB que tiveram recorrência (79%) do que nos que não tiveram (40%) o que aumentou em mais de cinco vezes a taxa de recorrência (OR = 5,4; IC 95%, 1,7 – 18,1 – Tabela 11). Resultados semelhantes foram observados quando o genótipo *GSTM1* nulo esteve associado ao polimorfismo do gene *CYP2E1* mutado (OR = 6,5; IC 95%, 1,8 – 25,7) ou polimorfismos *XRCC1-194* (OR = 4,3; IC 95%, 1,3 – 15,2) conforme apresentado na Tabela 11.

Tabela 11. Correlação entre genótipos polimórficos recorrência, segundo tumor primário e metástase a distância no CECB.

Característica	N	Recorrência*		Segundo tumor primário		Metástase a distância	
		Sim (28)	Não (52)	Sim (7)	Não (85)	Sim(10)	Nao(82)
<i>GSTM1</i>							
não nulo	40 (43)	6 (21)	31 (60)	4 (57)	36 (42)	4 (40)	36 (44)
nulo	52 (57)	22 (79)	21 (40)	3 (43)	49 (58)	6 (60)	46 (56)
OR (IC 95%)*		<b>5,4(1,7-18,1)*</b>		0,5(0,1-3,2)		1,2(0,3-5,4)	
<i>XRCC1-194Trp</i>							
wt/wt	76 (83)	22 (79)	45 (87)	4 (57)	72 (85)	9 (90)	67 (82)
wt/m e m/m	16 (17)	6 (21)	7 (13)	3 (43)	13 (15)	1 (10)	15 (18)
OR (IC 95%)		1,7(0,45-6,78)		4,2(0,6-26,1)		0,5(0,1-4,4)	
<i>XRCC1-399</i>							
wt/wt	50 (54)	18 (64)	26 (50)	4 (57)	47 (55)	5 (50)	45 (55)
wt/m e m/m	42 (47)	10 (36)	26 (50)	3 (43)	38 (45)	5 (50)	37 (45)
OR (IC 95%)		0,6(0,2-1,6)		1,6(0,9-10,0)		1,2(0,3-5,4)	
<i>GSTM1/CYP2E1PstI</i>							
não nulo - wt/wt	33 (36)	4 (14)	27 (52)	4 (57)	30 (35)	3 (30)	30 (37)
nulo - wt/m	59 (64)	24 (86)	25 (48)	3 (43)	55 (65)	7 (70)	52 (63)
OR (IC 95%)		<b>6,5(1,8-25,7)*</b>		0,7(0,1-4,4)		1,4(0,3-7,2)	
<i>GSTM1 / CYP1A1 MspI</i>							
não nulo e wt/wt	25 (27)	4 (14)	19 (36)	4 (57)	22 (26)	3 (30)	22 (27)
nulo - wt/m	67 (73)	24 (86)	33 (64)	3 (43)	63 (74)	7 (70)	60 (73)
OR (IC 95%)		3,5(0,9-13,8)		0,5(0,1-2,9)		0,8(0,2-4,6)	
<i>GSTM1/XRCC1-194</i>							
não nulo e wt/wt	32 (35)	5 (18)	25 (48)	2 (29)	30 (35)	4 (40)	28 (34)
nulo - wt/m	60 (65)	23 (82)	27 (52)	5 (71)	55 (65)	6 (60)	54 (66)
OR (IC 95%)		<b>4,3(1,3-15,2)*</b>		1,4(0,2-10,9)		0,8(0,2-3,6)	
<i>CYP2E1PstI/XRCC1-194</i>							
wt/wt e wt/wt	65 (71)	18 (64)	42 (81)	4 (57)	61 (72)	8 (80)	57 (70)
wt/m, m/m - wt/m e m/m	27 (29)	10 (36)	10 (19)	3 (43)	24 (28)	2 (20)	25 (30)
OR (IC95%)		2,3(0,8-7,5)		1,9(0,3-11,2)		0,6(0,1-3,2)	

OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança; wt/wt, homocigoto selvagem; wt/m, heterocigoto mutado; m/m, homocigoto mutado

\* valores de p estatisticamente significantes (< 0,05)

Outro parâmetro clínico avaliado nos pacientes com CECB foi o tempo médio de sobrevida após o diagnóstico da doença, calculado em meses. As comparações entre os diferentes polimorfismos estudados e o tempo médio de sobrevida (meses) dos pacientes com CECB encontram-se nas Tabelas 12 e 13. Somente pacientes com genótipo *GSTM1* nulo tiveram uma sobrevida menor do que aqueles que apresentaram o gene *GSTM1* ( $p = 0,01$ ) conforme apresentado na Tabela 12. Menor sobrevida também foi observada na associação do genótipo *GSTM1* nulo e o polimorfismo dos genes *CYP2E1* ( $p = 0,01$ ), *CYP1A1* ( $p = 0,01$ ) e *XRCC1-194* ( $p = 0,02$ ), conforme apresentado na Tabela 13.

Tabela 12. Associação entre polimorfismos de fase I, fase II, genes de reparo e tempo médio de sobrevida dos pacientes com CECB.

Fator	N	Sobrevida média (meses)	Valor de p
GLOBAL	92	26,7 (1 – 82)	
<i>GSTM1</i>			
não nulo	40	32,4 (1 – 72)	
nulo	52	22,3 (2 – 82)	<b>0,01*</b>
<i>GSTT1</i>			
não nulo	69	27,6 (2 – 73)	
nulo	23	22,7 (1 – 82)	> 0,05
<i>GSTP1 BmsA</i>			
wt/wt	40	28,3 (1 – 73)	
wt/m	47	26,7 (1 – 82)	
m/m	5	13,4 (2 – 31)	> 0,05
<i>CYP1A1 MstI</i>			
wt/wt	59	27,9 (1 - 82)	
wt/m	29	24,2 (1 – 73)	
m/m	4	26,3 (2 – 64)	> 0,05
<i>CYP2E1 PstI</i>			
wt/wt	78	26,7 (1 - 73)	
wt/m ou mm	14	26,6 (2 – 82)	> 0,05
<i>XRCC1-194Trp</i>			
wt/wt	76	26,4 (1 – 73)	
wt/m	16	28,1 (2 – 82)	>0.05
m/m	0	-	
<i>XRCC1-399Gln</i>			
wt/wt	50	29,1 (1 -82)	
wt/m	36	25,1 (2 – 70)	
m/m	6	15,5 (2 – 48)	>0.05

wt/wt, homocigoto selvagem; wt/m, heterocigoto mutado; m/m, homocigoto mutado

\* valores de p estatisticamente significativos (&lt; 0,05)

Tabela 13. Associação gene-gene considerando-se os polimorfismos de fase I, fase II e genes de reparo na comparação com o tempo médio de sobrevida dos pacientes com CECB.

Fator	N	Sobrevida média (meses)	Valor de p
GLOBAL	92	26,7 (1 – 82)	
<i>GSTM1 / CYP2E1 PstI</i>			
não nulo - wt/wt	33	32,2 (1 – 70)	
nulo - wt/m	59	23,6 (2 – 73)	<b>0,01*</b>
<i>GSTM1 / CYP1A1 MspI</i>			
não nulo - wt/wt	25	31,8 (1 – 72)	
nulo - wt/m ou m/m	67	24,8 (2 – 82)	<b>0,01*</b>
<i>GSTM1 / XRCC1-194</i>			
não nulo - wt/wt	32	32,6 (1 – 72)	
nulo - wt/m ou m/m	60	23,5 (2 – 82)	<b>0,02*</b>
<i>CYP2E1 PstI / XRCC1-194</i>			
wt/wt – wt/wt	65	27,1 (1 – 72)	
wt/m ou m/m	27	25,6 (2 -82)	>0.05

wt/wt, homocigoto selvagem; wt/m, heterocigoto mutado; m/m, homocigoto mutado; \* valores de p estatisticamente significativos (< 0,05)

## 5. DISCUSSÃO

Na presente avaliação foram estudados 207 pacientes com CECP, comparados com um grupo controle, de base hospitalar, composto por 244 pacientes de outras clínicas, quanto à presença dos polimorfismos nos genes de metabolização de xenobióticos (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*, *CYP2E1*) e um gene de reparo do DNA (*XRCC1*) associados com fatores individuais relacionados ao hábito de fumar e consumir bebidas alcoólicas. Alguns parâmetros, como evolução clínica dos pacientes, foram avaliados somente nos 92 casos com CECP.

Estudos epidemiológicos clássicos reconhecem o tabaco e o álcool como os principais fatores de risco para o CECP. O papel independente de cada um deles parece claro, entretanto dada à frequência dessa associação na sociedade moderna e a tendência ao aumento nas taxas de câncer a ela relacionada, é um tema em constante debate. O entendimento exato da associação álcool, cigarro e risco para o CECP teria importante implicação para elucidação dos mecanismos carcinogênicos da região da cabeça e pescoço e na orientação de programas para modificação de hábitos em relação a esses fatores de risco. Diferentes autores enfatizam o efeito sinérgico e multiplicativo do consumo associado álcool / fumo na iniciação do CECP (Blot et al., 1988; Hashibe et al., 2007)

Na nossa série, poucos indivíduos relataram nunca terem fumado ou consumido bebidas alcoólicas, sendo que 98% dos casos de CECP e 67% dos controles eram tabagistas e etilistas. O consumo de mais 20 maços/ano determinou um risco para o CECP 11 vezes maior quando comparados aos

controles, além disso, esta diferença foi ainda mais marcante para os pacientes com tumor da cavidade bucal, onde o risco foi 18 vezes maior. Quanto ao álcool, o consumo de 30 g/l/d ou mais também determinou aumento de risco maior que seis vezes ao grupo com câncer, resultados concordantes com achados de outros pesquisadores (Geisler e Olshan, 2001; Zavras et al., 2002).

É difícil estabelecer precisamente uma relação direta causa-efeito em ambas as exposições. Em relação ao fumo parece haver diferença na composição do tabaco consumido que pode modificar o risco de CECP em indivíduos que nunca beberam (Hashibe et al., 2007). Esses dados parecem indicar que cigarros de diferentes países e regiões podem, de acordo com as concentrações dos diferentes carcinógenos do tabaco, bem como com os padrões de uso, modificar o risco para a doença. A mesma situação pode ocorrer com as bebidas alcoólicas. Não só o teor do álcool varia entre as bebidas como também a inclusão de conservantes e derivados impuros da destilação. Principalmente bebidas artesanais como a cachaça pode resultar em produtos com alto teor de álcool e impurezas e, portanto mais nocivos ao organismo.

Outra possível explicação para os diferentes efeitos do fumo e do álcool diz respeito às questões sociais que determinam práticas distintas tanto na aceitação quanto na maneira de consumir tais substâncias, num mesmo país ou na comparação de diferentes países.

Não obstante a exposição combinada ao tabaco e álcool seja fundamentalmente responsável pela gênese do CECP, a variabilidade



genética individual pode ter papel central tanto na carcinogênese mediada pelo fumo e álcool como na promoção ao câncer (Strange e Fryer, 1999).

Os carcinógenos presentes no tabaco e álcool requerem primeiramente ativação metabólica pelas enzimas da fase I (CYPs) que geram intermediários reativos que se constituem no substrato para ação das enzimas da fase II de metabolização, como por exemplo as GSTs.

Polimorfismos em genes responsáveis pela metabolização do tabaco e do álcool poderiam influenciar a suscetibilidade individual ao câncer, uma vez que podem alterar a expressão ou a função enzimática, acarretando um aumento ou uma diminuição na ativação e eliminação de carcinógenos. Os reativos intermediários formados se não forem eliminados acabam formando reações covalentes com DNA, RNA ou proteínas (adutos), propiciando danos no material genético e aumentando assim o risco de câncer.

De fato, o acúmulo de mutações no DNA aumenta também as chances de modificações desfavoráveis em proto-oncogenes e genes supressores de tumor, razão pela qual os agentes mutagênicos muitas vezes são também carcinogênicos.

Dentre os polimorfismos em genes de metabolização de xenobióticos aqueles que vêm sendo associados ao CECP incluem-se os genes *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* (Lazarus et al., 1998).

No presente estudo nós avaliamos a associação entre polimorfismos de genes de metabolização tais como *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1BsmA*, *CYP1A1MspI*, *CYP2E1PstI* e genes de reparo (*XRCC1-194* e *XRCC1-399*) e o risco de CECP, em especial o CECB, bem como o efeito das

associações desses polimorfismos desfavoráveis (associação gene-gene) e a contribuição do álcool e do fumo (associação gene-ambiente). Também avaliamos as possíveis associações destes polimorfismos na evolução clínica dos pacientes com CECB.

Somente o polimorfismo no gene *GSTM1*, que na realidade é a total deleção do gene, aumentou em quase cinco vezes o risco de CECP e duas vezes o risco de CECB. Polimorfismos no gene de reparo *XRCC1* parecem ter modificado o risco para o CECB, tanto aumentando as chances de aparecimento do tumor (*XRCC1-194*) como sendo um fator de proteção para a doença (*XRCC1-399*).

A associação entre polimorfismos genéticos específicos e o risco para CECP foi avaliada em diferentes populações em distintas regiões do mundo (Amador et al., 2002; Gronau et al., 2003; Peters et al., 2006; Cascorbi et al., 2006). Têm sido descritas associações entre polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, principalmente em câncer de bexiga, pulmão, além de cabeça e pescoço (Geisler e Olshan, 2001; Stücker et al., 2002; McGrath et al., 2006).

Apesar de estudos mostrarem maior frequência do genótipo polimórfico *GSTM1* nulo entre pacientes com CECP, quando comparados com controles, os resultados não são definitivos e ainda persistem dúvidas quanto à associação desta enfermidade com as variantes GSTs (Geisler e Olshan, 2001; Peters et al., 2006; Hashibe et al., 2003; Cascorbi, 2006).

Os resultados obtidos na presente investigação quanto à associação do *GSTM1* nulo e CECP e, especificamente, ao CECB estão em

concordância com recentes publicações (Olshan et al., 2000; Drummond et al., 2004; Buch et al., 2002; Gattás et al., 2006, Singh et al., 2008), embora existam resultados discordantes, inclusive em estudos de pacientes com CECB do Rio de Janeiro (Sugimura et al., 2006; Goloni-Bertolo et al., 2006; Hatagima et al., 2008).

Supõe-se que a falta da atividade enzimática de *GSTM1* aumente o risco ao câncer como resultado da menor capacidade de eliminação de intermediários reativos oriundos do metabolismo do tabaco, incluindo HPAs, bem como na regulação de enzimas de reparo do DNA (Hayes e Strange, 2000). De fato, o nível plasmático da enzima *GSTM1* no sangue periférico é em média nove vezes menor em indivíduos com o genótipo *GSTM1* nulo, indicando que a deleção em homozigose deste gene, associado ao hábito do tabagismo e etilismo, pode aumentar o risco ao CECB (Konig-Greger et al., 2004).

A ação enzimática da *GSTT1* é considerada mais global porque o gene está expresso não só no fígado, mas também nos eritrócitos, produzindo um efeito sistêmico (Landi, 2000).

Em nosso estudo, mesmo tendo sido mais freqüente entre os casos (25%) que entre os controles (19,3%), o genótipo nulo *GSTT1* não esteve associado significativamente ao risco de CECB.

De 27 estudos examinados para avaliar o risco de CECB associado ao genótipo nulo *GSTT1*, em 21 deles foram relatadas OR de 1,17 (Hashibe et al., 2003). Em publicações posteriores, com pacientes com câncer em outros sítios anatómicos da cabeça e pescoço, que não a boca, alguns

autores demonstraram associação positiva entre o câncer ou lesões pré malignas (Drummond et al., 2005; Barroso-Duarte et al., 2006), enquanto outros verificaram resultados semelhantes aos nossos, não encontrando qualquer associação entre o câncer de boca e a nulidade do genótipo *GSTT1* (Gaudet et al., 2004; Sikdar et al., 2004; Xie et al., 2004; Gattás et al., 2006; Goloni-Bertollo et al., 2006, Hatagima et al., 2008). Apenas dois estudos demonstraram efeito protetor de *GSTT1* nulo e o desenvolvimento de CECB (Evans et al., 2004; Anantharaman et al., 2007).

Gajecka et al. (2005) também não encontraram associação entre *GSTT1* nulo quando estudaram pacientes portadores exclusivamente de tumores da laringe. Entretanto, Deakin et al. (1996) apesar de não encontrarem associação com tumores de boca, pulmão e estômago, associaram o genótipo *GSTT1* nulo ao desenvolvimento de câncer colorretal, ressaltando que o produto protéico codificado por esta variante pode ser importante na detoxificação de xenobióticos em porções específicas do intestino.

Possíveis explicações para resultados heterogêneos seriam o tamanho das amostras, exposições a diferentes carcinógenos, diferenças demográficas, além de técnicas utilizadas na identificação dos genótipos. Estudos mostram que a frequência do genótipo *GSTM1* nulo varia entre 42-60% em populações européias, 42-54% entre asiáticos e 16-36% entre africanos; e para o genótipo *GSTT1* nulo as frequências variariam entre 13-26% e 35-52% nos caucasianos e asiáticos, respectivamente (Garte et al., 2001).

No cálculo das freqüências dos polimorfismos genéticos, dados associados à cor da pele, deveriam ser levados em consideração nos estudos epidemiológicos, embora os métodos de classificação dos diferentes grupos populacionais, somente pela cor da pele, sejam quase inviáveis.

Na presente investigação os genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulo foram encontrados em 38% e 19% da população controle, respectivamente, composta basicamente de indivíduos brancos e pardos. No nosso meio são poucos os estudos avaliando a freqüência do gene *GSTM1* (Gattás e Soares-Vieira, 2000; Rossini et al., 2002). Gattás et al., 2004 estudaram a distribuição das freqüências dos genótipos nulos *GSTM1* e *GSTT1* em indivíduos moradores da cidade de São Paulo e de Salvador, estratificados pela cor da pele. O genótipo nulo *GSTM1* foi significativamente mais freqüente entre brancos (55,4%) que mulatos (41,4%) e negros (32,8%) de São Paulo ou trabalhadores rurais da Bahia (35,7%). Quanto ao genótipo nulo *GSTT1*, foi mais freqüente nos negros (26,3%) seguido pela população rural da Bahia (23,8%), brancos (22,3%) e mulatos (17,2%), diferenças estas sem poder estatístico.

É preciso ter em mente que um dos principais fatores associados às discrepâncias encontradas em análises de estudos caso-controle pode ser a variabilidade inter individual nos níveis de expressão enzimática. A atividade das enzimas GSTs varia entre indivíduos tanto em tecidos normais quanto no tecido canceroso, e entre os diferentes sítios na cabeça e pescoço (Geisler e Olshan, 2001). Há evidências que o nível de metilação na região promotora do gene *GSTP1* está aumentado em diferentes tipos de câncer

modificando a expressão do mesmo (Esteller et al., 1998, Kellen et al., 2007). Assim sendo, alterações epigenéticas e outros fatores endógenos ou exógenos podem alterar a expressão de enzimas metabolizadoras de carcinógenos em diferentes indivíduos e em diferentes órgãos.

Polimorfismos em genes da fase I de metabolização como *CYP1A1* e *CYP2E1*, que metabolizam, respectivamente, carcinógenos do tabaco e do álcool, podem também estar associados ao maior risco de CECP e CECB. Em nosso estudo polimorfismos nesses dois genes aumentaram em torno de duas vezes o risco para o CECP e CECB somente quando associados ao *GSTM1* nulo. O *CYP2E1* mutado associado ao polimorfismo *XRCC1-194* também aumentou em duas vezes somente o risco de CECB.

O *CYP1A1* é considerado um gene chave no metabolismo de carcinógenos, constituindo-se num biomarcador de suscetibilidade ao câncer, particularmente naqueles tumores ligados ao hábito tabagista. Este gene é altamente polimórfico, mas um grande número de trabalhos foca em duas variantes alélicas principais (Cascorbi, 2006).

Na presente investigação estudamos a variante que origina a transição T-C (3801T>C) detectada por meio da enzima *MspI* (Walker, 1996). Esta variante resulta num aumento da atividade catalítica da enzima o que implica em uma maior ativação de carcinógenos na fase I da biotransformação aumentando assim o risco de câncer (Goto et al., 1996; Fontana et al., 1998). A frequência deste alelo mostra extensa variação em diferentes populações, tendo sido observados os valores de 31% e 12%

entre japoneses e populações caucasóides, respectivamente (Nebert et al., 1996).

Por outro lado, a CYP2E1 está envolvida no metabolismo do etanol e catalisa oxidação e formação de aduto de DNA de vários compostos encontrados no tabaco. Variações genéticas no gene *CYP2E1*, identificadas pela enzima de restrição *PstI*, são correlacionadas com maior atividade enzimática quando comparadas com o genótipo selvagem. Além disso, indivíduos com *CYP2E1* mutado mostraram níveis de expressão gênica maiores que aqueles com o genótipo selvagem (Hayashi et al., 1991). Isto determinaria uma maior exposição do DNA a carcinógenos do álcool em grandes consumidores.

Resultados positivos (Olshan et al., 2000; Gronau et al., 2003; Gattás et al., 2006; Peters et al., 2006) e negativos (Kato et al., 1999) de associação do *CYP2E1* mutado e CECB têm sido descritos na literatura.

Quanto ao polimorfismo *CYP1A1MspI*, apesar deste genótipo ter sido mais freqüente no grupo de CECB em relação aos controles, não observamos associação com o desenvolvimento do câncer, fato semelhante observado por Mathias et al. (1998) e Marques et al. (2006). Por outro lado, Sato et al. (1999) encontraram associação entre este polimorfismo e o desenvolvimento do CECB, com risco 2 vezes maior para o câncer. Alguns pesquisadores (Hashibe et al., 2003; Sugimura et al., 2006; Leichsenring et al., 2006) analisando outro polimorfismo presente em diferente posição deste mesmo gene (2455A>G), também não encontraram associação com o câncer bucal.

Não só diferenças individuais nos processos de ativação e eliminação de substâncias metabólicas, mas também mecanismos de reparo do DNA podem alterar a condição herdada e influenciar o risco para o desenvolvimento de câncer. O reparo ao DNA é essencial por causa da sua alta suscetibilidade ao dano espontâneo, ocorrido através da geração espontânea de radicais oxidados na célula normal, modificações químicas espontâneas e erros na replicação. Além disso, o DNA nuclear é altamente suscetível a carcinógenos, entre eles aqueles presentes no tabaco e álcool. Ou seja, pode haver diferente suscetibilidade ao câncer relacionada a genes que codificam enzimas envolvidas no reparo do DNA. Modificações nos genes de reparo podem propiciar a geração de células com fenótipo mutado e a propagação de células transformadas que escapam dos processos homeostáticos normais, tornando-se capazes de proliferação sem controle.

Mecanismos de reparo ao DNA, por exemplo, realizados pelas enzimas XRCC1, são importantes na proteção contra mutação gênica e iniciação do câncer (Tae et al., 2004).

Ainda que o exato efeito funcional de polimorfismos em *XRCC1* não seja totalmente entendido, espera-se que isto mude a função da proteína final. Conseqüentemente, tais diferenças funcionais podem ter efeito no risco para iniciação / desenvolvimento do câncer.

Evidências experimentais sustentam a hipótese que polimorfismos *XRCC1* alteram tanto a capacidade de reparo do DNA e sensibilidade a mutagenos como podem alterar a suscetibilidade individual a carcinogênese (Duell et al., 2000; Hu et al., 2001).



Entretanto, resultados de uma recente meta análise que avaliou a contribuição de polimorfismos do gene *XRCC1* (Hu et al., 2005) e o risco para todos os tipos de câncer indicou que a variante genética 194Trp foi associada com moderada proteção ao câncer (OR=0,89 – IC95%, 0,81-0,98) e que a variante 399Gln não esteve associada com risco geral de câncer (OR=1,01 – IC95%, 0,90-1,14).

Em nosso estudo observamos uma significativa diferença entre o polimorfismo *XRCC1-194* que foi mais freqüente nos casos de CECB, aumentando mais que duas vezes o risco para a doença. Estudos têm sugerido menor risco de câncer, incluindo câncer de mama (Duell et al., 2001), câncer de pulmão (Butkiewicz et al., 2001), câncer de estômago (Shen et al., 2000), esôfago (Lee et al., 2001) associado com polimorfismo 194Trp. Para CECP, Sturgis et al. (1999) encontraram menor risco especialmente para casos de câncer de cavidade bucal e faringe e Demokan et al. (2005) não encontraram relação entre os polimorfismos *XRCC1* e CECP.

Em relação ao genótipo polimórfico *XRCC1-399Gln*, tanto em homozigose quanto em heterozigose, foram menos freqüentes nos casos de CECB, determinando proteção ao câncer quando confrontados aos controles, corroborando resultados encontrados por Huang et al. (2005). Estas diferenças no risco ao câncer associado ao polimorfismo do gene *XRCC1* podem resultar de diferentes etiologias e vias moleculares responsáveis por diferentes tipos de câncer nos vários sítios anatômicos, bem como o tamanho das amostras estudadas.

Diferentes genes do metabolismo exibem sobreposição a substratos específicos e a combinação de vários genótipos desfavoráveis pode, teoricamente, conferir maior risco ao câncer. Neste estudo nós examinamos a contribuição para o desenvolvimento do câncer de boca de sete polimorfismos combinados. Nosso foco foi entender o papel de relevantes efeitos conjuntos de polimorfismos combinados para o câncer de boca. Recentemente tem aumentado as evidências relacionadas ao risco de câncer e o efeito de polimorfismos genéticos, sustentadas por modelos poligênicos em câncer de pulmão, mama, próstata, colorretal e cabeça e pescoço (Yen et al., 2008).

Coerente com estudos prévios (Hashibe et al., 2003; Gattás et al., 2006) nossos dados demonstraram risco significativamente elevado ao CECB em pacientes com alguns genótipos combinados. Em nossos pacientes, o genótipo nulo *GSTM1* associado aos genótipos mutados de *CYP1A1*, *CYP2E1* ou *XRCC1-194*, bem como *CYP2E1* e *XRCC1-194Trp* aumentaram de 2 a 2,5 vezes o risco para o câncer.

De fato, a presença simultânea dos genes polimórficos *CYP1A1* e *CYP2E1*, que aumentam a expressão do gene, e a falta da enzima *GTM1* que torna a eliminação dos produtos do metabolismo mais difícil, poderia provocar acúmulo de metabólitos intermediários expondo as células a maior quantidade de carcinógenos e assim resultando em formação de adutos, principalmente nos tabagistas e etilistas (Cha et al., 2007). Recente metanálise (Varela-Lema et al., 2008) mostrou que o efeito conjunto de polimorfismos em *CYP1A1* e *GSTM1* interfere no risco de câncer, sugerindo

que o uso de tabaco e fatores genéticos tem significativo papel no câncer de boca e faringe.

Além de marcadores biológicos de suscetibilidade como polimorfismos de GSTs, P450 e genes de reparo, neste estudo também avaliamos a relação dos mesmos com o consumo de tabaco e álcool. Ainda que vários estudos tenham investigado a possível associação entre risco de CECB entre tabagistas, etilistas e polimorfismos genéticos envolvidos no metabolismo de agentes ambientais e genes de reparo do DNA. Aparentemente nenhum deles avaliou tantos genes com uma mesma amostra, especialmente em câncer de boca. Para os sete polimorfismos genéticos estudados, nós encontramos algumas interações entre grandes consumidores de tabaco e álcool.

A frequência de *CYP1A1* polimórfico foi maior para casos de CECB (39%) que consumiam mais de 20 maços/anos de cigarro quando comparados aos controles, o que determinou aumento de risco para a doença em quase 4 vezes. Sabe-se que *CYP1A1* é induzido por HPAs gerados durante a combustão do tabaco e é responsável também pela primeira etapa de oxidação daquele carcinógeno que ocorre nas células da cavidade bucal (Marchand et al., 2004). O polimorfismo *CYP1A1 PstI* conferindo aumento, de pelo menos três vezes, na atividade catalítica provavelmente aumenta o estresse oxidativo gerado pela alta atividade de *CYP1A1* decorrente da intensidade do uso do tabaco (Anantharaman et al. 2007).

Em nossos pacientes o polimorfismo *GSTP1 BsmA* foi associado com maior risco de câncer quando do consumo de 39 maços/ano ou mais de cigarros. Embora quando avaliamos casos e controles independentemente da intensidade do tabagismo não observamos relação com risco de câncer. Verificamos que a frequência do polimorfismo *GSTP1* foi praticamente igual (cerca de 60%) para os indivíduos com CECP, CECB e para os controles, diferenças estas estatisticamente não significantes.

A enzima *GSTP1* está envolvida na inativação de carcinógenos do tabaco e a variação na seqüência do gene parece alterar a suscetibilidade para diversos tipos de câncer (Hengstler et al., 1998). O polimorfismo *GSTP1 BmsI* gera uma enzima com menor atividade e afinidade específica para substratos eletrofílicos da enzima, quantitativamente seria a enzima mais abundante na região da cabeça e pescoço (Mulder et al., 1995). Níveis teciduais elevados da enzima *GSTP1* têm sido encontrados em tumores de estômago, colorretal, bexiga, boca, faringe, laringe, pulmão, pele e mama quando comparados com tecidos normais controles (Tsuchida e Sato, 1992). Em relação ao CECP há relatos recentes demonstrando risco maior para o câncer em pacientes com polimorfismo de *GSTP1* (Matthias et al., 1998; Hashibe et al., 2003). Entretanto, outros autores não encontraram a mesma associação (Olshan et al., 2000; Oude-Ophius et al., 2003; Cho et al., 2006; Gattás et al., 2006; Hatagima et al., 2008). Aparentemente, em um único trabalho com pacientes com câncer de boca na Índia, os autores verificaram um efeito protetor do polimorfismo *GSTP1*, quando estudado isoladamente, comparado com um grupo controle sem câncer (Singh et al., 2008).

Nós observamos que o genótipo mutado *GSTP1* esteve associado com aumento de risco de CECB dependente da quantidade de tabaco consumido, isto é, risco cinco vezes maior para aqueles indivíduos que consumiram mais de 39 maços/ano de cigarro. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Cho et al., 2006 que também encontraram risco maior de CECB para os indivíduos com alto consumo de cigarros.

Isto é provável porque o *GSTP1* está envolvido no metabolismo de intermediários específicos do tabaco, então fumantes com o alelo variante, que está associado à atividade enzimática reduzida, sentem os efeitos deletérios da detoxificação de carcinógenos reduzida. Portanto poderia haver maior impacto para o risco de CECB em fumantes, baseado na quantidade e tempo de consumo do tabaco.

Quando a associação entre genes de reparo do DNA e fatores de risco para CECB como tabaco e álcool foi investigada, nossos resultados mostraram que consumo de 30g/l/dia ou mais de álcool e o genótipo *XRCC1-194Trp* aumentou o risco de câncer, mas a associação com *XRCC1-399Gln* para ter sido um fator de proteção para a doença. As diferenças nos resultados poderiam ser explicadas pelo fato de que para cada tipo de tumor a via biológica responsável pela indução a apoptose e a inativação destes mecanismos podem influenciar a capacidade tanto para detecção como direcionamento da associação *XRCC1* – doença. Além disso, tal variabilidade seria explicada, não somente pela exposição, mas também pela doença, e pela região geográfica a qual pertencem os indivíduos estudados.

Nossos resultados sugerem possíveis diferenças entre o dano ao DNA induzido pelo consumo de tabaco e álcool e o sistema de reparo. Não existem muitos estudos na literatura sobre a interação gene-ambiente e estes resultados preliminares devem ser vistos com cautela. Evidências indicam a instabilidade genética como causa mais que uma consequência à transformação maligna, colocando o conteúdo aberrante de DNA num papel chave dentro da carcinogênese.

Quanto ao curso clínico da doença, os fatores que determinam a evolução no CECB permanecem incertos. Estudos têm sugerido que os genótipos GSTs e CYPs estão ligados, não somente à suscetibilidade, mas também à evolução do câncer (Matthias et al., 2002; DeMichele et al., 2005).

Há evidências que a suscetibilidade individual e evolução do câncer sejam mediadas por variantes alélicas (Strange e Fryer, 1999). Entretanto, enquanto está clara a importância dos polimorfismos na patogênese da doença, permanecem desconhecidos muitos aspectos de como as mesmas alteram o risco.

Então, os resultados obtidos de estudos populacionais podem refletir diferenças nos estádios clínicos mais que simples diferenças entre indivíduos com câncer e sem câncer. Neste sentido nós avaliamos se os polimorfismos GST, CYP e genes de reparo estariam associados com a evolução do CECB.

A história natural do câncer envolve a transformação maligna numa célula alvo, crescimento não controlado desta célula, invasão local e metástase. Assim, a diferenciação celular descreve o quanto

morfologicamente e funcionalmente a célula tumoral lembra a célula normal. A metástase é um marcador de agressividade, ainda que tipos diferentes de câncer sejam heterogêneos com relação ao potencial metastático.

Alguns dos parâmetros evolutivos também dependem, em graus variados, da adesão do paciente e das modalidades de tratamento, embora a diferenciação histológica não seja influenciada pelo comportamento do paciente. O envolvimento linfonodal é mais freqüente em pacientes que se apresentam com doença mais avançada, mas quando encontrada em lesões iniciais reflete a agressividade da doença. A extensão local do tumor pode ser influenciada pelo comportamento do paciente, pois a maioria dos tumores será T4 se o diagnóstico for retardado. Enquanto tumores grandes com invasão metastática são considerados de pior evolução que tumores restritos localmente, resultados diferentes podem ocorrer entre casos com tumores de mesmo sítio anatômico, estágio clínico e grau histológico.

Um parâmetro adicional de evolução, o desenvolvimento de segundo tumor primário é menos influenciado pela adesão do paciente, ainda que a continuidade do tabagismo e etilismo aumentem o risco futuro. Estes pacientes são alvos de interesse, pois uma ligação entre variantes alélicas de suscetibilidade / evolução seriam mais evidentes num subgrupo de alto risco, por exemplo com alto consumo de tabaco e/ou álcool. Assim, vários subgrupos clinicamente distintos podem existir dentro de uma mesma população.

Nós identificamos genes individuais associados a parâmetros evolutivos no CECB. O *XRCC1-399Gln* foi associado significativamente aos

casos sem metástase linfonodal quando diagnosticados, ou seja, proteção ao desenvolvimento de metástase regional. Por outro lado, o polimorfismo *GSTM1* nulo esteve significativamente associado ao risco de recorrência locorregional e tempo médio de sobrevida menor.

Esses parâmetros deverão ser comparados com os resultados já obtidos da análise do anticorpo D2-40 realizada a partir dos tumores destes mesmos pacientes (Longatto Filho et al., 2007).

Quando analisamos genes combinados e parâmetros evolutivos, a associação *GSTM1* nulo e *CYP2E1* polimórfico ou *XRCC1-194Trp* aumentou o risco para recorrência locorregional significativamente. As associações de polimorfismos desfavoráveis como *GSTM1* nulo com *CYP1A1*, *CYP2E1* ou mesmo *XRCC1-194Trp*, também parecem contribuir para menor sobrevida dos pacientes com CECB.

Ainda que os mecanismos exatos para explicar a redução no risco de doença metastática sejam incertos, uma possível explicação seria que o genótipo selvagem levaria a um reparo menos eficiente ao dano, determinado pelos carcinógenos do tabaco/álcool, impedindo as células de progredirem para vias de apoptose, aumentando a probabilidade de instabilidade genômica e determinando um fenótipo mais agressivo (Geisler et al., 2005).

A deficiência enzimática de GST secundária ao genótipo nulo pode resultar em maiores níveis celulares de glutathiona pelo reduzido consumo nas reações catalizadas por GSTs. Além do seu papel na metabolização/eliminação de carcinógenos, a glutathiona intracelular tem sido



implicada no controle da proliferação celular e apoptose (Macho et al. 1997). Os tumores avançados estão num estágio de crescimento descontrolado e deve existir conseqüentemente um microambiente com hipoxia, acidose e produção de radicais livres (Xie e Huang, 2003). Este microambiente pode acentuar a ativação de moléculas aberrantes relacionadas à metástase e determinar vantagens de crescimento para variantes celulares metastáticas. Acredita-se que as GSTs possam facilitar a remoção de radicais livres gerados por este estresse oxidativo. Tal fato está alinhado com nossos achados onde o polimorfismo de *GSTM1* determinou menor tempo de sobrevida.

Nossos achados sugerem que uma abordagem epidemiológica molecular pode, eventualmente, auxiliar na melhora da prevenção e prognóstico do CECP por permitir detecção precoce de indivíduos de alto risco e seu ingresso em programas de vigilância. Investigação por técnicas moleculares poderia determinar se um indivíduo com parâmetros clínicos predisponentes significativos teria um maior risco, geneticamente condicionado, para subseqüente desenvolvimento do câncer e possível recorrência.

Ainda que o risco de CECP em indivíduos com polimorfismos nas enzimas GSTs seja modesto, o CECP, e sobretudo o CECB, é de tal magnitude no nosso meio que mesmo um pequeno aumento no risco pode ser considerável na incidência desta enfermidade. Identificação de indivíduos com deficiência na atividade enzimática GST pode auxiliar as estratégias de prevenção do CECP através da identificação de indivíduos de

alto risco, bem como em tratamentos mais efetivos. A deficiência enzimática de GST deve ser tratada como uma questão de saúde pública.

Considerando que o CECP é uma enfermidade desfigurante, potencialmente fatal cuja incidência continua aumentando nos dias atuais, tanto em indivíduos velhos como em faixa etária mais jovem, o controle de suas conseqüências devastadoras requer intervenção precoce em pessoas de alto risco antes mesmo de a doença tornar-se invasiva, localmente avançada ou metastática. Para isso, polimorfismos de enzimas de metabolização e genes de reparo são genótipos constitucionais que podem ser informativos para os médicos nas condutas preventivas de pacientes de risco, sobretudo aqueles com abuso no consumo de tabaco e álcool.

## 6. CONCLUSÕES

1. De todos os polimorfismos estudados somente o *GSTM1* nulo aumentou em quatro vezes o risco de CECP e em duas vezes o risco de CECB. A presença deste polimorfismo esteve associada também com risco de recorrência locorregional e menor sobrevida nos pacientes com CECB.

2. Associações de genes desfavoráveis em um mesmo indivíduo, como *GSTM1*nulo-*CYP2E1*PstI e *GSTM1*nulo-*CYP1A1*MspI, aumentaram em duas vezes o risco de CECP e CECB.

2. Polimorfismo no gene de reparo *XRCC1-194*Trp aumentou em duas vezes o risco de CECB, isoladamente ou quando em associação com outros genes polimórficos (*GSTM1*nulo-*XRCC1-194*Trp e *CYP1A1*MspI-*XRCC1-194*Trp).

3. O polimorfismo no gene de reparo *XRCC1-399*Gln pareceu proteger os indivíduos ao CECB quando analisado isoladamente ou em associação com outros genes polimórficos (*XRCC1-399*Gln-*CYP1A1*MspI).

4. O consumo de mais de 30 maços/ano de cigarro associado ao polimorfismo dos genes *CYP1A1*MspI e *GSTP1*BsmA aumentou em aproximadamente cinco vezes o risco de CECB.

5. O consumo de mais de 30 g/L/d de bebidas alcoólicas associado ao polimorfismo do gene de reparo *XRCC1-194Trp* aumentou em aproximadamente nove vezes o risco de CECB.

6. A pesquisa de polimorfismos de genes envolvidos na metabolização do tabaco e do álcool, em especial *GSTM1*, pode ser uma importante opção para o clínico não só na avaliação de risco para o câncer da cavidade bucal, como também no acompanhamento e prognóstico da doença.

## 7. REFERÊNCIAS

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;107:229-33.

Abdel-Rahman SZ, Soliman AS, Bondy ML, Omar S, El-badawy SA, Khaled HM, Seifeldin IA, Levin B. Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increase risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Lett.* 2000;159:79-86.

Akervall J. Gene profiling in squamous cell carcinoma of head and neck. *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24:87-94.

Amador AG, Righi PD, Radpour S, Everett ET, Weisberg E, Langer M, Eckert GJ, Christen AG, Campbell S Jr, Summerlin DJ, Reynolds N, Hartsfield JK Jr. Polymorphisms of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93:440–5.

Anantharaman D, Chaubal PM, Kannan S, Bhisey RA, Mahimkar MR. Susceptibility to oral cancer by genetic polymorphisms at CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 loci among Indians: tobacco exposure as a risk modulator. *Carcinogenesis.* 2007;28:1455-62.

Arruda VR, Grignolli CE, Goncalves MS, Soares MC, Menezes R, Saad ST, Costa FF. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clin Genet.* 1998;54:210-4.

Barroso-Duarte EC, Da Silva MS, GomeZ MV, Gomez RS. GSTT1 polymorphism and oral leukoplakia. *Anticancer Res.* 2006;26:427–30.

Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:3-28.

Bergamasco VD, Marta GN, Kowalski LP, Carvalho AL. Perfil epidemiológico do câncer de cabeça e pescoço no Estado de São Paulo. *Revr. Bras. Cir. Cabeça e Pescoço.* 2008;37:15-9.

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988;48:3282-7.

Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* 2006;7:149-56.

Bosetti C, Gallus S, Francheschi S, Levi F, Bertuzzi M, Negri E, Talamini R, La Vecchia C. Cancer of larynx in non-smoking alcohol drinkers and in non-drinking tobacco smokers. *Br J Cancer*. 2002;87:516-8.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria da Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Brennan P, Lewis S, Hashibe M, Bell DA, Boffetta P, Bouchardy C, et al. Pooled Analysis of Alcohol Dehydrogenase Genotypes and Head and Neck Cancer: A HuGE Review. *Am J Epidemiol*. 2004;159:1–16.

Breslow NE , Day NE. Statistical methods in cancer research. Volume I - The analysis of case-control studies. IARC Sci Publ. 1980;32: 5-338.

Brown LM, Gridley G, Diehl SR, Winn DM, Harty LC, Otero EB, Fraumeni Jr JF, Hayes RB. Family Cancer History and Susceptibility to Oral Carcinoma in Puerto Rico. *Cancer*. 2001;92:2102-08.

Buch CS, Notani PN, Bhisey RA. Polymorphism at GSTM1, GSTM3 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer in an Indian population. *Carcinogenesis*. 2002;23:803-7.

Butkiewicz D, Rusin M, Enewold L, Shields PG, Chorazy M, Harris CC. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis*. 2001;22:593-7.

Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, Palacios-Sánchez B, Sánchez-Gutierrez JJ, González-Moles MA, Bascones-Martínez A. Update on molecular pathology in oral cancer and precancer. *Anticancer Res*. 2008;28:1197-205.

Canevari RA & Rogatto SR. Câncer de cabeça e pescoço. In: *Oncologia Molecular*. Carlos Gil Ferreira, José Cláudio Rocha. – São Paulo: Ed. Atheneu, 2004, pg 189-201.

Carstensen U, Alexandrie AK, Hogste DTB, Rannug A, Bratt I, Hagmar L. B- and T-lymphocyte micronuclei in chimney with respect to genetic polymorphism for *CYP1A1* and *GSTT1* (class Mu). *Mutat Res*. 1993;289:178-95.

Cascorbi, I. Genetic basis of toxic reactions to drugs and chemicals. *Toxicol Lett*. 2006;162:16-28.

Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, Monner A, Carrera M, Agudo A, Quer M, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, Bosch FX. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2004;108:741–9.



Cha IH, Park JY, Chung WY, Choi MA, Kim HJ, Park KK. Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 genes and susceptibility to oral cancer. *Yonsei Med J.* 2007;48:233-9.

Cho CG, Lee SK, Nam SY, Lee MS, Lee SW, Choi EK, Park HJ, Kim SY. Association of the GSTP1 and NQO1 Polymorphisms and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Risk. *J Korean Med Sci.* 2006;21:1075-9.

Chung-Ji Liu, Che-Shoa Chang, Man-Tin Lui, Ching-Wen Dang, Yin-Hua Shih, Kuo-Wei Chang. Association of GST genotypes with age of onset and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2005;34:473-7.

Collins SF, Morgan M, Patrinos A. The human genome project: lessons from large-scale biology. *Science.* 2003;300:286-90.

Deakin M, Elder J, Hendrickse C, Peckham D, Baldwin D, Pantin C, Wild N, Leopard P, Bell DA, Jones P, Duncan H, Brannigan K, Aldersea J, Fryers A, Cstrange R. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis.* 1996;17:881-4.

DeMichele A, Aplenc R, Botbyl J, Colligan T, Wray L, Klein-Cabral M, Foulkes A, Gimotty P, Glick J, Weber B, Stadtmauer E, Rebbeck TR. Drug-

metabolizing enzyme polymorphisms predict clinical outcome in a node-positive breast cancer cohort. *J Clin Oncol.* 2005;23:5552-9.

Demokan S, Demir D, Suoglu Y, Kayak E, Akar U, Dalay N. Polymorphisms of the XRCC1 DNA repair gene in head and neck cancer. *Pathol Oncol Res.* 2005;11:22-5.

DeStefani E, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M, Ronco A. Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract-I. *Foods. Oral Oncol.* 1999;35:17-21.

Drummond SN, Gomez RS, Motta Noronha JC, Pordeus IA, Barbosa AA, De Marco L. Association between GSTT-1 gene deletion and the susceptibility to oral squamous cell carcinoma in cigarette-smoking subjects. *Oral Oncol.* 2005;41:515-9.

Duell EJ, Millikan RC, Pittman GS, Winkel S, Lunn RM, Tse CK, Eaton A, Mohrenweiser HW, Newman B, Bell DA. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10:217-22.

Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, Varkonyi A, Zuo ZF, Ashok TD, Mark EJ, Wain JC, Christiani DC, Kelsey KT. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis.* 2000;21:965-71.

Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res.* 1998;58:4515-18.

Evans AJ, Henner WD, Eilers KM, Montalto MA, Wersinger EM, Andersen PE, Cohen JI, Everts EC, Williams JE, Beer TM. Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck.* 2004;26:63–70.

Folkman J. Tumour angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285: 1182-6.

Fontana W, Peyrottes I, Rossi C, Leblanc-Talent P, Ettore F, Bussiere F. Study of sequence of CYP1A1 gene polymorphisms and glutathione S-transferase mu 1 gene in primary breast cancers: an update with an additional 114 cases. *Mutation Research.* 1998;403:45-53.

Franchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer.* 2004;101:973-8.

Gajecka M, Rydzanicz M, Jaskula-Sztul R, Kujawski M, Szyfter W, Szyfter K. 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.* 2005 ; 574:112-23.

Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10:1239-48.

Gattás GJ, Carvalho MB, Siraque MS, Curioni OA, Kohler P, Eluf-Neto J, Wunch-Filho V. Genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 associated with head and neck cancer. *Head Neck.* 2006;28:819-26.

Gattás GJF, Kato M, Soares-Vieira JA, Siraque MS, Kohler P, Gomes L, rego MA, Bydlowski SP. Ethnicity and Glutathione S-Transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:451-8.

Gattás GJF, Soares-Vieira JA. Cytochrome P450-2E1 and Glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. *Occup. Med.* 2000;50:508-11.

Gaudet MM, Olshan AF, Poole C, Weissler MC, Watson M, Bell DA. Diet, GSTM1 and GSTT1 and head and neck cancer. *Carcinogenesis.* 2004;25:735-40.

Geisler AS, 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.

Geisler SA, Olshan AF, Cai J, Weissler M, Smith J, Bell D. Glutathione S-transferase polymorphisms and survival from head and neck cancer. *Head Neck*. 2005;27:232-42.

Giorgadze TA, Zhang PJ, Pasha T, et al. Lymphatic vessel density is significantly increased in melanoma. *J Cutan Pathol*. 2004;31:672-7.

Goloni-Bertollo EM, Biselli JM, Corrêa LCL, Maníglia JV, Rossit ARB, Ruiz MT, Pavarino-Bertelli EC. Avaliação da influência da nulidade dos genótipos GSTM1 e GSTT1 na carcinogênese em cabeça e pescoço. *Rev Assoc Med Bras*. 2006;52:365-8.

Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res*. 2005;569:101-10.

Goode, EL; Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations with Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;11:1513-30.

Goto I, Yoneda S, Yamamoto M, Kawajiri K. Prognostic significance of germ line polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Research*. 1996;56:3725-30.

Gronau S, Koenig-Greger D, Jerg M, Riechelmann H. Gene polymorphisms in detoxification enzymes as susceptibility factor for head and neck cancer? *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;128:674–80.

Hahn M, Hagedorn G, Kuhlisch E, Schackert HK, Eckelt U. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity câncer. *Oral Oncology.* 2002;38:486-90.

Hannen EJM, Riedger D. The quantification of angiogenesis in relation to metastasis in oral cancer: a review. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33:2-7.

Hartl DL, Jones EW. Mutation, DNA repair, and recombination. In: Hartl DL, Jones EW, editors. *Genetics. Principles and analysis.* Canada: Jones and Bartlett Publishers; 1998. p. 554-97.

Harty LC, Caporaso NE, Hayes RB, Winn DM, Bravo-Otero E, Blot WJ, Kleinman DV, Brown LM, Armenian HK, Faumeni JF Jr, Shields PG. Alcohol dehydrogenase 3 genotype and risk of oral cavity and pharyngeal cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:1698-705.

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;99:777-89.

Hashibe M, Brennan P, Strange RC, Bhisey 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;12:1509-17.

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 Oncol.* 2008;44:200-7.

Hayashi, J. Watanabe, K. Kawajiri, Genetic polymorphisms in the 5' -flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene, *J Biochem.* 1991;110:559-65.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:51-88.

Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology.* 2000;61:154-6.

- Henderson CJ, McLaren AW, Moffat GJ, Bacon EJ, Wolf CR. Pi-class glutathione S-transferase: regulation and function. *Chem Biol Interact.* 1998;112:69-82.
- Hengstler JG, Arand M, Herrero ME, et al. Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. *Recent Results Cancer Res.* 1998;154:47–85.
- Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Mohrenweiser HW, Golden A, Case LD. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis.* 2001;22:917-22.
- Hu Z, Ma H, Chen F, Wei Q, Shen H. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:1810-8.
- Huang WY, Olshan AF, Schwartz SM, Berndt SI, Chen C, Llica V, Chanock SJ, Fraumeni JF Jr, Hayes RB. Selected genetic polymorphisms in MGMT, XRCC1, XPD, and XRCC3 and risk of head and neck cancer: a pooled analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:1747-53.



Hung HC, Chuang J, Chien YC, Chern HD, Chiang CP, Kuo YS, Hildesheim A, Chen CJ. Genetic polymorphism of CYP2E1, GSTM1, and GSTT1: environmental factors and risk of oral cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6:901-5.

Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2005;162:925-42.

IARC Multicenter Oral Cancer Study Group. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:1772-83.

Ingelman-Sundberg M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat Res.* 2001;482:11-9.

Jackson DG. Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and application in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. *APMIS.* 2004;112:526-38.

Jain RK, Padera TP. Prevention and treatment of lymphatic metastasis by antilymphangiogenic therapy. *JNCI.* 2002;94:785-7.

Jourenkova-Mironova N, Voho A, Bouchardy C, Wickman H, Dayer P, Benhamous S, Hirvonen A. Glutathione-S-transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 genotypes and the risk of smoking-related oral and pharyngeal cancers. *Int J Cancer*. 1999;81:44-8.

Kaiserling E. Immunohistochemical identification of lymph vessels with D2-40 in diagnostic. *Pathology Pathologie*. 2004;25:362-74.

Kao SY, Wu CH, Lin SC, Yap SK, Chang CS, Wong YK, Chi LY, Liu TY. Genetic polymorphism of cytochrome P4501A1 and susceptibility to oral squamous cell carcinoma and oral precancer lesions associated with smoking/betel use. *J Oral Pathol Med*. 2002;31:505-11.

Karpanen T, Alitalo K. Lymphatic vessels as targets of tumor therapy? *J Exp Med*. 2001;194:37-42.

Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Hoover RN, Trump BF, Sugimura H, Weston A, Harris CC. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res*. 1992; 52:6712-5.

Kato S, Tajiri T, Matsukura N, Matsuda N, Taniai N, Mamada H, Yoshida H, Kiyam T, Naito Z. Genetic polymorphisms of aldehyde dehydrogenase 2, cytochrome p450 2E1 for liver cancer risk in HCV antibody-positive Japanese

patients and the variations of CYP2E1 mRNA expression levels in the liver due to its polymorphism. *Scand J Gastroenterol.* 2003;38:886-93.

Kato T, Kaneko S, Kohshi K, Munaka M, Kitagawa K, Kunugita N, Ikemura K, Kawamoto T. Genetic polymorphism of tobacco- and alcohol-related metabolizing enzymes and oral cavity cancer. *Int J Cancer.* 1999;83:606-9.

Kato T, Kaneko S, Takasawa S, Nagata N, Inatomi H, Ikemura K, Itoh H, Matsumoto T, Kawamoto T, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphism and susceptibility to smoking related epithelial cancer; oral, lung, gastric, colorectal and urothelial cancer. *Pharmacogenetics.* 1999;9:165-9.

Kawajiri K, Watanabe J, Gotoh O, TAGASHIRA Y, Sogowa K, Fujii-Kuriyama Y. Structure and drug inducibility of the human cytochrome P-450c gene. *Eur J Biochem.* 1986;159:219-25.

Kellen E, Hemelt M, Broberg K, Golka K, Kristensen VN, Hung RJ, et al. Pooled Analysis and Meta-analysis of the Glutathione S-Transferase P1 Ile 105Val Polymorphism and Bladder Cancer: A HuGE-GSEC Review. *Am J Epidemiol.* 2007;165:1221-30.

Konig-Greger D, Riechelmann H, Wittich U, Gronau S. Genotype and phenotype of glutathione-S-transferase in patients with head and neck carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;130:718-25.

Kutler DI, Auerbach AD, Satagopan J, Giampietro PF, Batish SD, Huvos AG, Goberdhan A, Shah JP, Singh B. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129:106–12.

Kyzas PA, Cunha IW, Ioannidis JPA. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in Head and Neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clinical Cancer Research.* 2005;11:1434-40.

Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res.* 2000;463:247–83.

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistic, 1999. *CA Cancer J Clin.* 1999;49:8-31.

Lazarus P, Sheikh SN, Ren Q, Schantz SP, Stern JC, Richie JP Jr, Park JY. P53, but not P16 mutations in oral squamous cell carcinomas are associated with specific CYP1A1 and GSTM1 polymorphic genotypes and patient tobacco use. *Carcinogenesis.* 1998;19:509-14.

Lee JM, Lee YC, Yang SY, Yang PW, Luh SP, Lee CJ, Chen CJ, Wu MT. Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of the esophageal cancer. *Int J Cancer*. 2001;95:240-6.

Leichsenring A, Losi-Guembarovski R, Maciel ME, Losi-Guembarovski A, Oliveira BW, Ramos G, Cavalcanti TC, Bicalho MG, Cavalli IJ, Cólus IM, Ribeiro EM. CYP1A1 and GSTP1 polymorphisms in an oral cancer case-control study.. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39:1569-74.

Lewis S, Cherry NM, Niven RM, Barber PV, Povey AC. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms and lung cancer risk. *Cancer Lett*. 2002;180:165-71.

Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*. 1974;34:997-1004.

Longatto Filho, Martins A, Araújo, Costa SMA, Schmitt FA. VEGFR-3 expression in breast cancer tissue is not restricted to lymphatic vessels. *Pathology – Research and Practice*. 2005;201:93-9.

Longatto Filho A, Oliveira TG, Pinheiro C, Brasilino de Carvalho M, Curioni AO, Mercante AMC, Schmitt FC, Gattas GJF. How useful is the assessment of lymphatic vascular density in oral carcinoma prognosis? *World Journal Of Surgical Oncology*. 2007;5:140-8.

Macho A, Hirsch T, Marzo I, et al. Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis. *J Immunol.* 1997; 158:4612–9.

Marchand A, Barouki R, Garlatti M. Regulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression by CYP1A1 activity. *Mol Pharmacol.* 2004;65:1029-37.

Marques CF, Koifman S, Koifman RJ, Boffetta P, Brennan P, Hatagima A. Influence of CYP1A1, CYP2E1, GSTM3 and NAT2 genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: results from a case-control study in Rio de Janeiro. *Oral Oncology.* 2006;42:632-7.

Marshall JR, Boyle P. Nutrition and oral cancer. *Cancer Causes Control.* 1996;7:101-11.

Matthias C, Bockmuhl U, Jahnke V, Harries LW, Wolf CR, Jones PW, Aldersea J, Worrall SF, Hand P, Fryer AA, Strange RC. The glutathione S-transferase GSTP1 polymorphism: effects on susceptibility to oral/pharyngeal and laryngeal carcinomas. *Pharmacogenetics.* 1998; 8:1-6.

Matthias C, Jahnke V, Fryer AA, Strange RC. [Influence of glutathione s-transferase and cytochrome p450 polymorphisms on prognosis of head and neck cancer. *Laryngorhinootologie.* 2002;81:406-12.

Matthias C, Jannke V, Jones PW, Hoban PR, Aldersea JE, Worrall SF, et al. 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* 1999;8:815-23.

McGrath M, Michaud D, De Vivo I. Polymorphisms in GSTT1, GSTM1, NAT1 and NAT2 genes and bladder cancer risk in men and women. *BMC Cancer*. 2006;6:239.

McLaughlin JK, Gridley G, Block G, Winn DM, Preston-Martin S, Schoenberg JB, Greenberg RS, Stemhagen A, Austin DF, Ershow AG. Dietary factors in oral and pharyngeal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1988;80:1237-43.

McWilliams JE, Evans AJ, Beer TM, Andersen PE, Cohen JI, Everts EC, Henner WD. Genetic polymorphisms in head and neck cancer risk. *Head Neck*. 2000;22:609-17.

Miller RG Jr. Survival analysis. New York (NY): John Wiley & Sons;1981.p. 114–8.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.

Morita S, Yano M, Tsujinaka T, Akiyama Y, Taniguchi M, Kaneko K, Miki H, Yoshino K, Kusuoka H, Monden M. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1999;80:685-8.

Mulder TP, Manni JJ, Roelofs HM, Peters WH, Wiersma A. Glutathione S-transferases and glutathione in human head and neck cancer. *Carcinogenesis*. 1995;16:619-24.

Nebert DW, Mckinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol*. 1996;15:273-80.

Negri E, Franceschi S, Bosetti C, Levi F, Conti E, Parpinel M, La Vecchia C. Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer*. 2000;86:122-7.

Neuhaus T, Ko YD, Lorenzen K, Fronhoffs S, Harth V, Bröde P, Vetter H, Bolt HM, Pesch B, Brüning T. Association of cytochrome P450 2E1 polymorphisms and head and neck squamous cell cancer. *Toxicol Lett*. 2004;151:273-82.

Ng SK, Kabat CG, Wynder EL. Oral cavity cancer in non-users of tobacco. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85:743-5.



Nieto A, Sánchez MJ, Martínez C, Castellsagué X, Quintana MJ, Bosch X, Conde M, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S. Lifetime body mass index and risk of oral cavity and oropharyngeal cancer by smoking and drinking habits. *Br J Cancer*. 2003;89:1667–71.

Oliver G. Lymphatic vasculature development. *Nature Reviews/Immunology*. 2004;4:35-45.

Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9:185-91.

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;25:37-43.

Oude Ophuis MB, van Lieshout EM, Roelofs HM, Peters WH, Manni JJ. Glutathione S-transferase-M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphisms in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. *Cancer*. 1998;82:936-43.

Padera TP, Stoll BR, Tooderman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK. Cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*. 2004,427:695-699.

Park JY, Muscat JE, Ren Q, Schantz SP, Hardwick RD, Stern JC, Pike V, Richie Jr JP, Lazarus P. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6:791-7.

Park JY, Schantz SP, Stern JC, Kaur T, Lazarus P. Association between glutathione S-transferase pi genetic polymorphisms and oral cancer risk. *Pharmacogenetics.* 1999;9:497-504.

Park LY, Muscat JE, Kaur T, Schantz SP, Stern JC, Richie JP Jr, Lazarus P. Comparison of GSTM polymorphisms and risk for oral cancer between African-Americans and Caucasians. *Pharmacogenetics.* 2000;10:123-31.

Pavanello S, Clonfero E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat Res.* 2000;463:285-308.

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 Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:2196-202.

Puri SK, Fan CY, Hanna E. Significance of extracapsular lymph node metastases in patients with head neck squamous cell carcinoma. *Curr Opin. Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;11:119-23.

Ragin CCR, Modugno F, Gollin SM. The Epidemiology and Risk Factors of Head and Neck Cancer: a Focus on Human Papillomavirus. *J Dent Res*. 2007;86:104-14.

Rajkumar T, Sridhar H, Balaram P, Vaccarella S, Gajalakshmi V, Nandakumar A, Ramdas K, Jayshree R, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, Weiderpass E. Oral cancer in Southern India: the influence of body size, diet, infections and sexual practices. *Eur J Cancer Prev*. 2003;12:135–43.

Reis-Filho JS, Schmitt FC. Lymphangiogenesis in tumours: what do we know? *Microsc Res Tech*. 2003;60:171-80.

Roepman P, Jager A, Koerkamp MJAG, Kummer JA, Slootweg PJ, Holsteg FCP. Maintenance of head and neck tumor gene expression profiles upon node metastasis. *Cancer Res*. 2006;66:11110-4.

Rossini A, Rapozo DCM, Amorim LMF, Macedo JMB, Medina R, Neto JFN, Gallo CVM, Pinto LFR. Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population. *Genet Mol Res*. 2002;1:233-40 .

Rydzanicza M, Wierzbicka M, Gajecka M, Szyfter W, Szyftera K. The impact of genetic factors on the incidence of multiple primary tumors (MPT) of the head and neck. *Cancer Letters*. 2005;224:263-78.

Sato M, Sato T, Izumo T, Amagasa T. Genetic polymorphism of drugmetabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. *Carcinogenesis*. 1999;20:1927-31.

Schimming R, Reusch P, Kuschnierz J, Schmelzeisenet R. Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity: do they prognostic relevance? *J Cranio-maxillofacial Surg*. 2004;32:176-81.

Scully C. Oral squamous cell carcinoma; from a hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol*. 2002;38:227-34.

Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:7293-7.

Shen H, Xu Y, Qian Y, Yu R, Qin Y, Zhou L, Wang X, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer*. 2000;88:601-6.

Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res*. 1998;58:604-8.

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;109:95–101.

Singh M, Shah MM, 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;638:184-94.

Stamatoyannopoulos JA. The genomics of gene expression. *Genomics*. 2004;84:449-57.

Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ*; 1999;148:231-49.

Stücker I, Hirvonen A, de Waziers I, Cabelguenne A, Mitrunen K, Cénée S, Koum-Besson E, Hémon D, Beaune P, Lorient MA. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases as modulators of lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 2002;23:1475-81.

Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, Eicher AS, Clayman GL, Strom SS, Spitz MR, Wei Q. Polymorphism of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*. 1999;20:2125-9.

Sugimura T, Kumimoto H, Tohnai I, Fukui T, Matsuo K, Tsurusako S, Mitsudo K, Ueda M, Tajima K, Ishizaki K. Gene-environment interaction involved in oral carcinogenesis: molecular epidemiological study for metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *J Oral Pathol Med.* 2006; 35:11-8.

Tae K, Lee HS, Park BJ, Park CW, Kim KR, Cho HY, Kim LH, Park BL, Shin HD. Association of DNA repair gene XRCC1 polymorphisms with head and neck cancer in Korean population. *Int J Cancer.* 2004;111:805-8.

Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Experimental Pathology.* 2005;86: 347-63.

Thompson LH. Unraveling the Fanconi anemia-DNA repair connection. *Nat Genet.* 2005;37:921-2.

Tsuchida S, Sato K. Glutathione transferases and cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1992;27:337-84.

Varela-Lema L, Taioli E, Ruano-Ravina A, Barros-Dios JM, Anantharaman D, Benhamou S, et al. Meta-analysis and pooled analysis of GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms and oral and pharyngeal cancers: a HuGE-GSEC review. *Genet Med.* 2008;10:369-84.

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer*. 1996; 32:2474-84.

Von Pawel J. Gefitinib (Iressa, ZD1839): a novel targeted approach for the treatment of solid tumors. *Bull Cancer*. 2004;91:70-6.

Walker CL. Cancer susceptibility genes and molecular carcinogenesis. American Association for Cancer Research Special Conference: Cancer Susceptibility Genes and Molecular Carcinogenesis. *Mol Med Today*. 1996;2:364-5.

Warren S; Gates O. Multiple primary malignant tumors: a survey of the literature and a statistical study. *Am J Cancer*. 1932; 16:1358.

Weidner N. Intratumoral microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol*. 1995;147:9-19.

Wilting J, Papoutsi M, Christ B, Nicolaidis KH, Von Kaisenberg CS, Borges J, Stark GB, Alitalo K, Tomarev SI, Rössler J. The transcription factor Prox1 is a marker for lymphatic endothelial cells in normal and diseased human tissues. *FASEB J* 2002;16:1271-3.

- Woolgar J, Rogers S, Lowe D, Brown J, Vaughan E. Cervical lymph node metastasis in oral cancer: the importance of even microscopic extracapsular spread. *Oral Oncol.* 2003;39:130-7.
- Xie H, Hou L, Shields PG, Winn DM, Gridley G, Bravo-Otero E, Diehl SR, Bowman ED, Brown LM, Hayes RB. Metabolic polymorphisms, smoking, and oral cancer in Puerto Rico. *Oncol. Res.* 2004;14:315-20.
- Xie K, Huang S. Regulation of cancer metastasis by stress pathways. *Clin Exp Metastasis.* 2003;20:31-43.
- Yen CY, Liu SY, Chen CH, Tseng HF, Chuang LY, Yang CH, Lin YC, Wen CH, Chiang WF, Ho CH, Chen HC, Wang ST, Lin CW, Chang HW. Combinational polymorphisms of four DNA repair genes XRCC1, XRCC2, XRCC3, and XRCC4 and their association with oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med.* 2008;37:271-7.
- Zavras AI, Wu T, Laskaris G, Wang YF, Cartos V, Segas J, Lefantziz D, Joshipura K, Douglass CW, Diehl SR. Interaction between a single nucleotide polymorphism in the alcohol dehydrogenase 3 gene, alcohol consumption and oral cancer risk. *Int J Cancer.* 2002;97:526-30.