

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

LUCIANA SIGUETA NISHIMURA

Polimorfismo PRO198LEU no gene para a enzima antioxidante dependente de selênio glutathiona peroxidase 1 e risco de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre
Orientador:
Prof. Dr. Thomas Prates Ong

São Paulo
2010

LUCIANA SIGUETA NISHIMURA

Polimorfismo PRO198LEU no gene para a enzima antioxidante dependente de selênio glutathiona peroxidase 1 e risco de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre
Orientador:
Prof. Dr. Thomas Prates Ong

São Paulo
2010

LUCIANA SIGUETA NISHIMURA

Polimorfismo PRO198LEU no gene para a enzima antioxidante dependente de selênio glutaciona peroxidase 1 e risco de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe

Comissão Julgadora
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

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

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2010.

DEDICATÓRIA

À *Deus* que me deu força, coragem e determinação para alcançar este objetivo tão esperado.

Aos *meus queridos pais*, por toda confiança, pelos ensinamentos em toda a minha vida, pelo carinho, apoio e atenção em todas as horas, pelo exemplo de pais, e pelo amor incomparável e único.

Ao ***meu irmão Rei*** por ser um exemplo em tudo, e estar sempre, mas sempre ao meu lado para me ajudar, e mostrar que sempre há uma saída.

À ***minha irmã Ana***, que esteve ao meu lado em todas as horas, cuidando de mim, me apoiando e incentivando.

Ao *meu amor Dani*, sempre acreditando nos meus potenciais, me incentivando, me apoiando, me acalmando nas horas mais difíceis e, principalmente, por fazer parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao querido orientador **Prof. Thomas** pela orientação durante o desenvolvimento do trabalho, principalmente por todos os ensinamentos de vida, por todas as conversas, conselhos, atenção, pela paciência, amizade e carinho.

À querida co-orientadora **Profa. Silvia Cozzolino** por ter aberto as portas desde o início da minha vida profissional, e por todos os ensinamentos profissionais e principalmente de vida, conselhos e especialmente por todo carinho e atenção que nunca faltaram.

À **Dra. mãe Soraya** que mais que um exemplo, me ensinou os primeiros passos na carreira e me mostrou um exemplo de profissional, de família e amizade. Sem você não estaria onde estou. Você foi e é, um anjo pra mim. Obrigada pela confiança e por todo seu amor.

À **irmã Lili**, companheira, amiga, única, que esteve literalmente do meu lado, em todos os momentos durante esses anos. Uma amizade eterna, que jamais viverei sem. Você não existe! Obrigada pelo seu amor.

Ao **amigo Rafa**, que sempre estava pronto a ajudar, em todos os momentos, sejam eles profissionais ou pessoais. Obrigada pela sua sincera amizade, que tenho certeza, foi, é, e será muito grandiosa.

À **amiga Bárbara** por sempre estar disposta a ajudar, pelos ensinamentos de como ver a vida, pelo carinho e principalmente pela sua amizade.

À **companheira “Teco” Suzana** que participou arduamente de praticamente todas as etapas do meu mestrado, e passou praticamente todas as dificuldades e aprendizados do meu lado. Só nós mesmas sabemos o que passamos, mas também o que vivemos e aprendemos. Agradeço muito por toda a companhia, risadas, compreensão e a nossa amizade construída. Obrigada por me fazer ser uma pessoa melhor.

Aos ***Amigos do PRONUT*** (Michele, Leo, Marnen, Alexandra) pela companhia nas disciplinas obrigatórias, pelas risadas, por toda força e ajuda nos momentos difíceis que enfrentei no início do mestrado e principalmente pela amizade construída.

Às ***amigas Milena, Ariana, Fernandinha e Camila*** por toda a ajuda, amizade, companheirismo enquanto estiveram presentes no laboratório de Minerais. Amizades conquistadas e permanentes.

Às ***amigas Cris e Maritsa***, por toda ajuda, desde o início, e pelas pessoas que são. Aprendi muito com vocês.

Ao ***Técnico e amigo Alexandre*** por toda ajuda, companheirismo e dedicação.

À ***Tia Lurdinha*** por todo carinho e atenção, pelo sorriso de toda manhã, e por estar sempre pronta a ajudar no que for preciso.

Às ***amigas Fabia, Leticia, Roberta, Juliana***, pelas conversas, ajuda e amizade conquistada.

Aos ***colegas do Lab. de Dieta, Nutrição e Câncer*** por toda colaboração durante o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos ***amigos do Lab. de Lípidos e do lab do Prof. Julio Tirapegui*** pelo carinho e amizade sincera de sempre.

Às ***novas meninas da Profa. Silvia Janaina, Kaluce, Kátia, Grazi, Luciane e Verônica*** pela ajuda, carinho e a conquista de novas amizades.

Ao ***Prof. Fernando Moreno*** por toda a ajuda durante o desenvolvimento do mestrado, sugestões no exame de qualificação e pelos ensinamentos na área profissional, e principalmente pessoal.

Ao **Prof. Marcelo Rogero** pelas sugestões no exame de qualificação e por toda atenção.

Ao **Dr. Brasilino** por toda atenção que nunca faltou desde o início. Pelas sugestões no exame de qualificação. Por todos os ensinamentos e carinho durante a jornada no Hospital Heliópolis.

À **Dra. Adriana Madeira** por ter aberto as portas do Hospital Heliópolis e ajudado muito no início, meio e fim do mestrado. Obrigada pela atenção e carinho de sempre.

À **Dra. Rosana** que sempre esteve por perto disposta a ajudar no desenvolvimento do trabalho, e pelo carinho e atenção.

Ao **Dr. Chagas** pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Ao **Prof. Anatoli Yambartsev**, do Instituto de matemática e estatística (USP), pela paciência e grande ajuda na realização dos testes estatísticos.

Ao **Prof. Alan M Diamond** do Departamento de Nutrição Humana da Universidade de Illinois de Chicago, pela ajuda na padronização da técnica de PCR-RFLP utilizada no presente estudo

Ao **amigo Jean**, obrigada por todos os ensinamentos, por toda paciência, pelas risadas e conversas, e pela amizade construída.

À **amiga Lili**, obrigada por toda ajuda, conversas e amizade conquistada.

Ao **amigo Marcelo** pela colaboração no início do mestrado e pela amizade.

Às **amigas Ceci e Carol e colegas do laboratório de BioMol do Hospital Heliópolis**, por toda a ajuda, compreensão e pela amizade.

À ***toda minha família*** pelo apoio e incentivo.

Aos ***docentes e funcionários do departamento*** de alimentos e nutrição experimental da FCF/USP, pela atenção e apoio.

À ***Elaine e Jorge*** do departamento de pós graduação por toda atenção e paciência.

Aos ***funcionários da portaria da FCF/USP***, em especial ao ***João Felix*** pelo sempre bom humor e amizade.

Ao ***CNPq*** pela bolsa para realização do mestrado.

*Tudo tem sua ocasião própria e há tempo para
todo o propósito debaixo do céu:
Há tempo de nascer e tempo de morrer,
tempo de plantar e tempo de colher;
(Eclesiastes 3: 1-2)*

RESUMO

NISHIMURA, L.S. **Polimorfismo PRO198LEU no gene para a enzima antioxidante dependente de selênio glutationa peroxidase 1 e risco de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe.** 2010. 53f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O selênio é um micronutriente essencial que apresenta ação antioxidante por meio de selenoproteínas, como a glutationa peroxidase 1 (GPX1). O polimorfismo PRO198LEU no gene em questão tem sido relacionado ao aumento do risco para alguns tipos de câncer, como o de mama e pulmão. Atualmente, o câncer de cabeça e pescoço é um importante problema de saúde pública no mundo e, inclusive, no Brasil. O objetivo do presente estudo foi avaliar eventual associação entre o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU e risco de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe, bem como possível interação com utilização de tabaco e ingestão de álcool. O genótipo para o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU foi determinado pela técnica de PCR-RFLP (Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição) e seqüenciamento do DNA em 175 pacientes com câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe (grupo caso) integrantes de parte da casuística do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço, e em 203 indivíduos sem a doença, internados nas enfermarias do Hospital Heliópolis (grupo controle). A frequência do alelo de referência e do polimórfico foi de 0,72 e 0,28, respectivamente, em ambos os grupos. A frequência dos genótipos encontrou-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* nos grupos caso e controle. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quanto à distribuição do genótipo para o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU entre casos (50% PRO/PRO; 43% PRO/LEU e 7% LEU/LEU) e controles (51% PRO/PRO; 43% PRO/LEU e 6% LEU/LEU), não se verificando associação entre esse polimorfismo e risco para o câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe (*Odds ratio* = 1,02; 95% IC = 0,68-1,53; $p = 0,51$; homozigotos polimórficos e heterozigotos agrupados comparados a homozigotos de referência). Além disso, a utilização de tabaco ou ingestão de álcool não modificou a ausência de associação entre o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU e o câncer em questão (Utilização de tabaco maior que 20 *pack years*: *Odds ratio* = 0,94; 95% IC = 0,53-1,70; $p = 0,49$; Ingestão de álcool maior que 80g de etanol/dia: *Odds ratio* = 0,80; IC = 0,46-1,39; $p = 0,26$). Conclui-se que esse polimorfismo não aumenta o risco para o câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe. Palavras-chave: Selênio. Glutaciona peroxidase 1. Polimorfismo *GPX1* PRO198LEU. Câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe. Risco.

ABSTRACT

NISHIMURA, L.S. **PRO198LEU polymorphism in the gene for the selenium-dependent antioxidant enzyme glutathione peroxidase 1 and risk of oral cavity and oropharyngeal squamous cell cancer.** 2010. 53f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Selenium is an essential micronutrient that presents antioxidant activity through selenoproteins such as glutathione peroxidase 1 (GPX1). PRO198LEU polymorphism in this gene has been associated with increased risk for some cancer types such as breast and lung cancers. Currently head and neck cancer is a major public health problem in the world and in Brazil. The aim of this study was to evaluate a possible association between *GPX1* PRO198LEU polymorphism and risk of oral cavity and oropharyngeal squamous cell cancer. *GPX1* PRO198LEU polymorphism genotype was determined by PCR-RFLP method (Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism) and DNA sequencing in 175 patients with oral cavity and oropharyngeal squamous cell cancer (case group) from the Head and Neck Cancer Clinical Genome Project, and in 203 cancer-free individuals, hospitalized in the wards of Heliopolis Hospital (control group). The frequency of reference and polymorphic allele was 0.72 and 0.28, respectively, in both groups. The genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium in case and control groups. There was no statistically significant difference ($p > 0.05$) on the distribution of genotype for the *GPX1* PRO198LEU polymorphism between cases (50% PRO/PRO, 43% PRO/LEU and 7% LEU/LEU) and controls (51% PRO/PRO, 43% PRO/LEU and 6% LEU/LEU) and there was no association between this polymorphism and risk for oral cavity and oropharyngeal squamous cell cancer (odds ratio = 1.02, 95% CI = 0.68 to 1,53; $p = 0.51$; polymorphic homozygotes and heterozygotes combined compared with reference homozygotes). Furthermore, the use of tobacco or alcohol intake did not change the lack of association between the *GPX1* PRO198LEU polymorphism and cancer risk (use of tobacco greater than 20 pack years: odds ratio = 0.94, 95% CI = 0.53 to 1,70, $p = 0.49$; alcohol intake greater than 80g ethanol/day: Odds ratio = 0.80, CI = 0.46 to 1.39, $p = 0.26$). We conclude that this polymorphism does not increase the risk of oral cavity and oropharyngeal squamous cell cancer.

Keywords: Selenium. Glutathione peroxidase 1. GPX1 PRO198LEU polymorphism. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell cancer. Risk.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sistema de defesa antioxidante celular. 20
- Figura 2.** Separação em gel de agarose de produtos de PCR digeridos com a enzima *ApaI*, para genotipagem de casos em relação ao polimorfismo *GPXI* PRO198LEU. 32
- Figura 3.** Eletroferograma referente ao sequenciamento de amostra de DNA de paciente com câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe e classificado como homozigoto polimórfico para o polimorfismo *GPXI* PRO198LEU. 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Frequência genética do polimorfismo <i>GPXI</i> PRO198LEU em populações saudáveis.	23
Tabela 2.	Distribuição percentual dos participantes do grupo caso e controle de acordo com faixa etária, etnia e utilização de tabaco e álcool.	29
Tabela 3.	Distribuição do genótipo para o polimorfismo <i>GPXI</i> PRO198LEU nos grupos caso e controle (n;%).	33
Tabela 4.	Frequência dos alelos de referência (C) e polimórfico (T) referentes ao polimorfismo <i>GPXI</i> PRO198LEU em casos e controles.	34
Tabela 5.	Distribuição do genótipo para o polimorfismo <i>GPXI</i> PRO198LEU nos grupos caso e controle, estratificados de acordo com a utilização de tabaco.	34
Tabela 6.	Distribuição do genótipo para o polimorfismo <i>GPXI</i> PRO198LEU nos grupos caso e controle, estratificados de acordo com a ingestão de álcool.	35

LISTA DE ABREVIATURAS

C	Citosina
CAT	Catalase
DIOs	Iodotironinas deiodinases
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ETC	Cadeia de transporte de elétron
GPX	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
GSR	Glutationa redutase
GSSG	Glutationa oxidada
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LEU	Leucina
NADPH + OX	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P- oxireductase
OR	<i>Odds ratio</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRO	Prolina
RFLP	Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
Se	Selênio
SOD	Superóxido dismutase
SPS2	Enofosfatases sintases 2
T	Timina
TrxRs	Tireodoxina redutase
TXN	Tireodoxina
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Selênio (Se)	17
1.2 Glutathiona peroxidase (GPX)	19
1.3 Polimorfismo PRO198LEU (rs1050450) no gene GPX1	21
1.4 Câncer de cabeça e pescoço	23
2 OBJETIVO	26
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
3.1 Participantes do estudo	27
3.1.1 Aspectos éticos	27
3.1.2 Caracterização dos pacientes	28
3.2 Determinação do polimorfismo GPX1 PRO198LEU	29
3.2.1 PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism- polimerase chain reaction)	29
3.2.2 Sequenciamento de DNA para confirmação do genótipo de casos e controles classificados, por PCR-RFLP, como homozigotos polimórficos para o polimorfismo GPX1 PRO198LEU.	30
3.3 Análise estatística	31
4 RESULTADOS	32
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXO	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Selênio (Se)

O Se é um mineral traço distribuído na natureza de forma heterogênea, aparecendo em todos os solos, em pequenas ou grandes concentrações (THOMSON, 2004). Além da distribuição geográfica do Se no solo e, em consequência, no alimento, a quantidade normalmente ingerida por um indivíduo ainda dependerá dos hábitos alimentares e da associação entre o fator econômico e a concentração do Se na dieta (GONZAGA, MARTENS & COZZOLINO, 2005).

Esse micronutriente pode ser encontrado em diversas formas. Na forma inorgânica como selenato ou selenito, que sofrem redução se transformando em selenido e na forma orgânica, como selenometionina e selenocisteína, que posteriormente também serão transformados em selenido. Este pode ser excretado, ou resultar na formação de selenoproteínas (FINLEY, 2006).

A biodisponibilidade de Se nas formas orgânica e inorgânica é relativamente alta, em torno de 70 a 95%, porém irá variar de acordo com a fonte ingerida e o estado nutricional do indivíduo. Além disso, pode ser influenciada pela quantidade e origem alimentar do Se consumido (HOLBEN & SMITH, 1999; ORTUNO, 1997; SCHRAUZER, 2000). O Se é muito bem absorvido, porém os mecanismos de controle homeostático para a absorção de Se não estão bem esclarecidos (PATRICK, 2004).

O alimento mais rico em Se é a castanha do Brasil, com concentrações de 254 µg/100g. O mineral pode ser encontrado também no pão, cereais, carnes e aves domésticas (BROWN & ARTHUR, 2001). Farinhas e carnes, exceto peixe, são as principais fontes de Se (SCHUBERT, 1987). Frutas e hortaliças, por outro lado, são consideradas fontes alimentares pobres nesse micronutriente (GONZAGA, 2002).

Nos alimentos, o selenato representa a forma inorgânica principal do Se encontrada tanto em tecidos de plantas quanto de animais. Já a selenometionina é a forma orgânica predominante em grãos de cereais (RAYMAN, 2008). O Se é armazenado no corpo humano em dois compartimentos. No primeiro, o Se é armazenado como selenometionina nos músculos, esqueleto, eritrócitos, pâncreas, fígado, rins, estômago, cérebro, pele e mucosa

gastrointestinal. E no fígado, na forma de glutathiona peroxidase 1 (GPX1) (UNITED STATES, 2001).

Os seres humanos não sintetizam selenometionina, porém absorvem-na a partir de fontes alimentares vegetais, algas marinhas e suplementos alimentares. O metabolismo dos compostos selenito, selenato e selenocisteína seguem outra via, sendo catabolizados até a forma de selenido. Este último, por sua vez, pode ser novamente metabolizado para selenofosfato, precursor de selenocisteína e de outras selenoproteínas (HOLBEN & SMITH, 1999).

Ingestão deficiente em Se, bem como concentrações baixas de Se em cabelos, unhas e sangue estão associadas com a doença de Keshan. Esta consiste em cardiomiopatia endêmica que acomete principalmente crianças em algumas regiões da China (COMBS, 2001), onde o teor de Se no solo é baixo e ingestão diária do mineral menor de 10µg/dia (PAPP, 2007). Os sinais da doença de Keshan na forma crônica incluem degeneração dos músculos, cardiomegalia, isquemia do miocárdio, eletrocardiograma anormal, edema pulmonar e hipertrofia do fígado (FOX e FAIRWEATHER-TAIT, 1999; HOLBEN e SMITH, 1999).

Outra doença associada à deficiência de Se é a doença de Kashin-Beck, uma osteoartropatia endêmica, que tem como sua principal mudança patológica a múltipla degeneração e necrose da cartilagem hialina do tecido ósseo, resultando em sinais clínicos de baixa estatura, alargamento das articulações, dor óssea e osteoartrite secundária (FOX e FAIRWEATHER-TAIT, 1999; HOLBEN e SMITH, 1999).

Em relação à toxicidade do Se, foi evidenciado que os sintomas de intoxicação aguda são: graves distúrbios gastrointestinais, gosto metálico na boca, odor de alho exalado pelas vias respiratórias, distúrbios neurológicos, síndrome do estresse respiratório, infarto do miocárdio e falência renal. Algumas necrósias também revelaram edema pulmonar grave, necrose do trato gastrointestinal e dos rins, bem como cardiomiopatia (HOLBEN e SMITH, 1999).

A intoxicação crônica por Se em indivíduos adultos ocorre com ingestão maior que 800µg/dia. Anormalidades no sistema nervoso só ocorrem em casos muito graves, com sintomas que incluem paralisia periférica, formigamentos, hiperreflexão dos tendões, distúrbio motor e hemiplegia. (ALARCÓN-NAVARRO & MARTINÉZ, 2000). O limite de ingestão tolerável relativo a esse mineral é de 400 µg/dia para indivíduos com idade superior a 14 anos de idade (UNITED STATES, 2001).

As principais funções do Se estão relacionadas à sua ação antioxidante (ALARCON-NAVARRO e MARTINEZ, 2000; BRIGELIUS-FLOHE, 1999), participação na conversão de T4 em T3 (HOLBEN e SMITH, 1999, KOHRLE, 2000, REILLY, 1996), proteção contra

ação nociva de metais pesados e xenobióticos (ALARCON-NAVARRO e MARTINEZ, 2000, REILLY, 1996), aumento da resistência do sistema imunológico (ORTUNO, 1997; THOMPSON, 2004; ZENG, 2002), fertilidade masculina (BRIGELIUS-FLOHE, 1999; KRYUKOV, 2003). Uma das funções fisiológicas mais importantes do Se é a sua participação nos processos do sistema de defesa antioxidante que ocorrem por meio das selenoproteínas, como a glutatona peroxidase (GPX) que incorporam o micronutriente por meio de um ou mais resíduos de selenocisteína (MOGHADASZADEH & BEGGS, 2006).

O Se tem sido relacionado à redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis (DAVIS e UTHUS, 2002; FOX e FAIRWEATHER-TAIT, 1999; ORTUNO, 1997; RAYMAN, 2000; ZENG, 2002). Nesse sentido, a deficiência de Se tem sido associada ao desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres (COMBS, 2001; HESKETH, 2008). A partir de estudos epidemiológicos, verificou-se a existência de uma relação inversa entre a ingestão de Se e a incidência de câncer da tireóide, pele, mama, ovário e próstata (ALARCÓN-NAVARRO & MARTINEZ, 2000; DAVIS & UTHUS, 2002; KÖHRLE, 1999; LU et al., 2006; NEGRI et al., 2000; SCHRAUZER et al., 1997).

Alguns estudos têm investigado em modelos animais e em humanos a ação anticarcinogênica das selenoproteínas (COMBS, 1998; DAVIS e UTHUS, 2002; EL-BAYOUMY, 2001; KÖHRLE, 2000; LOBINSKI et al., 2000). De forma geral, as ações anticarcinogênicas do Se tem sido relacionadas à destoxificação de carcinógenos, inibição da proliferação celular e angiogênese, indução da apoptose, estímulo do sistema imune e proteção contra danos oxidativos (LU & JIANG, 2005; RYAN-HARSHMAN & ALDOORI, 2005). Nesse sentido, os diferentes mecanismos de ação sugerem que esse micronutriente deve atuar em diversos alvos moleculares (MEDINA, 2001). Estudos apontam que uma ingestão de aproximadamente 200 µg/dia é considerada fator de redução de risco para o desenvolvimento de câncer (ALARCON-NAVARRO e MARTINEZ, 2000; CLARK & COMBS, 1996; TOLONEN, 1995).

1.2 Glutathiona peroxidase (GPX)

O selenoproteoma humano é composto por pelo menos 25 selenoproteínas, das quais parte se associa à fertilidade, função imune, metabolismo de hormônios tireoidianos e defesa contra estresse oxidativo (SCHOMBURG et al., 2004). Poucas dessas selenoproteínas têm

suas funções estabelecidas, destacando-se GPXs, tireodoxinas redutases (TrxRs), enofosfatases sintetases 2 (SPS2) e iodotironinas deiodinases (DIOs), que apresentam funções de oxiredução (PAPP, 2007).

GPX são enzimas dependentes de Se que catalisam a oxidação de glutathiona reduzida (GSH) e permitem redução de peróxido de hidrogênio a água, prevenindo a peroxidação lipídica e o dano celular (CEBRIAN et al, 2006). Foram descritas 5 GPXs dependentes de Se em humanos: citosólica (GPX1); gastrointestinal (GPX2); plasmática (GPX3), fosfolípide hidroperóxido (GPX4) e no epitélio olfativo e tecidos embrionários (GPX6) (HESKETH, 2008, KRYUKOV et al., 2003). A GPX1 é a selenoproteína mais abundante em humanos e se encontra expressa em praticamente todos os tecidos (LEI et al., 2007). Compõe juntamente com as enzimas superóxido dismutase e catalase, o principal sistema antioxidante celular (CEBRIAN et al., 2006) (**Figura 1**).

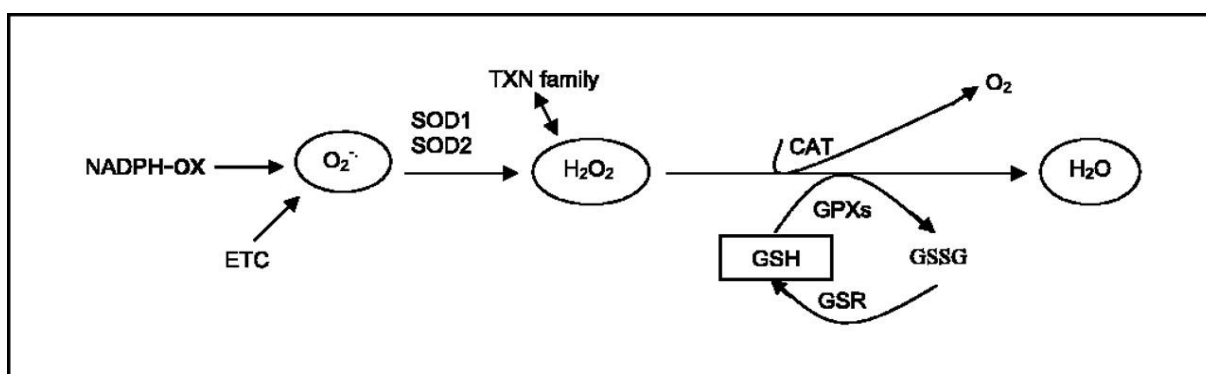


Figura 1. Sistema de defesa antioxidante celular. Cadeia de transporte de elétron (ETC); Nicotinamida adenina dinucleotídeo - P - oxireductase (NADPH+OX); superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT); tireodoxina (TXN); Glutathiona reduzida (GSH); glutathiona redutase (GSR); glutathiona oxidada (GSSG) (Retirada de CEBRIAN et al., 2006).

Em níveis adequados de Se séricos, ocorre aumento da expressão dessa enzima em tecidos com altos índices de produção de peróxidos, predominantemente nos eritrócitos, rins, fígado e pulmões. A GPX1 é capaz de metabolizar um grande número de hidroperóxidos livres, inclusive aqueles liberados a partir de ácidos graxos de cadeia longa, por ação de fosfolipases (MATÉS, PÉREZ-GÓMEZ & DE CASTRO, 1999; TAPIERO, TOWNSEND & TEW, 2003). Essa enzima também serve como reserva corporal de Se, podendo ser utilizada para as necessidades imediatas desse nutriente (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999; FOX & FAIRWEATHER-TAIT, 1999; KOHRLE, 1999).

Dentre as diferentes GPX, verifica-se no caso da GPX1, que seus níveis de RNAm, proteína e atividade são mais sensíveis à deficiência dietéticas de Se (LEI et al., 2007). Observa-se em ratos, nesta condição, reduções de 99% no RNAm de GPX1 no fígado e de 90% na atividade (LEI et al., 2007). Em células de hepatoma, a deficiência de Se resulta em reduções de 60% no RNAm da GPX1 e de 93% na redução de sua atividade (BAKER et al., 1993). Por outro lado, ratos deficientes em Se, ao serem tratados com este mineral, apresentaram rápida normalização da expressão e atividade de GPX. Nesse contexto, frente à sensibilidade e saturabilidade da atividade de GPX1 ao Se dietético, essa enzima tem sido utilizada como biomarcador do estado nutricional de Se, bem como das necessidades desse micronutriente (LEI et al., 2007).

As GPXs destacam-se como importantes mediadoras das ações do Se na redução do risco do desenvolvimento de câncer, especialmente daqueles em que o estresse oxidativo é importante componente etiológico (LU & JIANG, 2005).

Alterações na expressão e atividade da GPX1 têm sido associadas ao desenvolvimento tumoral. Ressalta-se, ainda, a necessidade de se elucidar aspectos moleculares referentes ao envolvimento da GPX1 no desenvolvimento do câncer, bem como avaliar o potencial da GPX1 como alvo importante para prevenção e tratamento do câncer (LEI et al., 2007). Ações do Se em nível genômico e a interação entre o consumo deficiente deste elemento com fatores genéticos são relevantes para elucidar a relação entre Se corpóreo e suscetibilidade ao câncer (HESKETH, 2008).

1.3 Polimorfismo PRO198LEU (rs1050450) no gene GPX1

Grande interesse tem sido voltado para estudos com câncer e impacto de polimorfismos genéticos em genes que codificam para enzimas antioxidantes, incluindo a GPX1 (MATHERS & HESKETH, 2007). Aventa-se a hipótese de que indivíduos com polimorfismos nesses genes, que resultassem em menor atividade enzimática, apresentariam maior risco de desenvolvimento de câncer devido a uma menor capacidade de destoxificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (CEBRIAN et al., 2006).

Dentre os diferentes polimorfismos de nucleotídeo único encontrados no gene para GPX1 localizada no cromossomo 3p21.3, destaca-se o PRO198LEU resultante da substituição de citosina por timina no éxon 2 (FOSBERG et al., 2000). Estudos que avaliaram a influência

do polimorfismo *GPX1* PRO198LEU no risco de desenvolvimento do câncer são poucos e com dados conflitantes.

Em mulheres dinamarquesas com câncer de mama, verificou-se que cada alelo variante resultou em reduções de 5% na atividade eritrocitária de GPX. Para avaliar a eventual diferença de resposta à suplementação com Se dos alelos da *GPX1* que codificam para prolina ou leucina na posição 198, foram construídos clones de células de câncer de mama que expressavam exclusivamente um ou outro alelo (HU & DIAMOND, 2003). Neste caso, o alelo variante que codifica para leucina apresentou menor resposta em relação à estimulação da atividade de *GPX1*, observada durante a suplementação com Se, em comparação ao alelo de referência.

Considerando-se a alta prevalência desse polimorfismo em caucasianos, esse autores destacaram que o polimorfismo em questão poderia ter importantes repercussões em termos de saúde pública. Por exemplo, indivíduos com genótipo homozigoto para o alelo variante apresentavam maior risco para câncer de pulmão em comparação àqueles com genótipo homozigoto para o alelo de referência (RATNASINGE et al., 2000). Resultados similares foram observados no estudo de Lee et al. (2006). Neste caso, indivíduos com câncer de pulmão, heterozigotos ou homozigotos para o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU, apresentavam maiores excreções urinárias de 8-hidroxidesoxiguanina em comparação àqueles considerados homozigotos para o alelo de referência. Esses resultados sugerem que indivíduos com alelo variante apresentariam maior risco de câncer de pulmão induzido por estresse oxidativo em comparação àqueles com apenas alelos de referência (LEE et al., 2006). Em mulheres, a redução da atividade de GPX associada ao polimorfismo *GPX1* Pro198Leu se relacionou com risco aumentado de câncer de mama (RAVN-HAREN et al., 2006).

Por outro lado, o alelo variante referente ao polimorfismo *GPX1* PRO198LEU apresentou efeito protetor contra o câncer de pulmão, observando-se forte interação do polimorfismo com consumo de cigarro e álcool, mas não com a ingestão de frutas e hortaliças (RAASCHOU-NIELSEN et al., 2007). O alelo variante esteve também associado a um maior tempo de recorrência de câncer de bexiga (ZHAO et al., 2005), bem como à redução do risco de câncer de próstata (ARSOVA-SARAFINOVSKA et al., 2008). Neste último estudo, não houve influência do genótipo na atividade da GPX no eritrócito em indivíduos com câncer de próstata.

Vale também ressaltar a importância de se considerar a população estudada, já que a frequência do alelo polimórfico varia em diferentes populações. Verifica-se que a frequência

do alelo polimórfico variou de 0,053, na população japonesa, à 0,364, na população turca (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência genética do polimorfismo *GPXI* PRO198LEU em populações saudáveis.

<i>População</i>	<i>Nº indivíduos</i>	<i>Frequência do alelo</i>		<i>Referência</i>
		<i>C (referência)</i>	<i>T (polimórfico)</i>	
<i>Japonesa</i>	209	0,947	0,053	<i>ICHIMURA et al. (2004)</i>
<i>Polonesa</i>	90	0,794	0,206	<i>MOSTOWSKA et al. (2007)</i>
<i>Inglesa</i>	761	0,752	0,248	<i>LIGHTFOOT et al. (2006)</i>
<i>Sueca</i>	214	0,727	0,273	<i>FORSBERG et al. (2000)</i>
<i>Alemã</i>	117	0,714	0,286	<i>ZARBOCK et al. (2007)</i>
<i>Norte-Americana</i>	683	0,698	0,302	<i>LIGHTFOOT et al. (2006)</i>
<i>Canadense</i>	372	0,675	0,325	<i>KNIGHT et al. (2004)</i>
<i>Dinamarquesa</i>	798	0,66	0,34	<i>RAASCHOU-NIELSEN et al. (2007)</i>
<i>Afro-Americana</i>	119	0,651	0,349	<i>CHOI et al. (2007)</i>
<i>Finlandesa</i>	313	0,637	0,363	<i>RATNASINGHE et al. (2000)</i>
<i>Turca</i>	250	0,636	0,364	<i>SUZEN et al. (2009)</i>

(Retirado de SUZEN et al., 2009)

1.4 Câncer de cabeça e pescoço

No Brasil, o câncer de boca está entre os dez tipos de câncer mais frequentes. A estimativa de incidência para o ano de 2010 no Brasil apontou esse tumor como o 5º mais frequente entre os homens (10.330 casos estimados) (INCA, 2010). No Estado de São Paulo, o câncer de cabeça e pescoço, mais especificamente o da cavidade oral (carcinoma epidermóide), é a quinta neoplasia maligna mais comum na população masculina. Foram estimados cerca de 3.230 casos novos para 2010 (INCA, 2010).

A neoplasia mais freqüente de cabeça e pescoço é o carcinoma epidermóide, ocorrendo em mais de 90% dos casos, e com mais de 300.000 novos casos ao ano no mundo, sendo caracterizado pela evolução insidiosa e metástases cervicais uni ou bilaterais precoces (MIRRA 2001). Este tipo de tumor pode desenvolver-se em todo epitélio de revestimento e glandular e assim ter representações na pele da cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, laringe, nasofaringe e glândulas salivares (RODRIGUEZ-MONGE et al., 1997).

Dentre os fatores que determinam o prognóstico desse câncer estão a região anatômica, tamanho e espessura, comprometimento linfonodal, tratamento e diferenciação tumoral (TRALONGO, 1999). O índice de sobrevida nesses pacientes em 5 anos é baixa, representando uma taxa de sobrevida neste período de 50%, ou menos (KADEMARI et al., 2005).

Estudos epidemiológicos mostram que o risco de desenvolvimento de câncer oral é de 5 a 9 vezes maior em tabagistas do que em não tabagistas, sendo diretamente proporcional a quantidade consumida. O uso do álcool também é fator de risco para o desenvolvimento do câncer das vias aerodigestivas superiores e potencializa a ação do tabaco (FORASTIERE et al., 2001). Também está descrita a associação entre a condição socioeconômica, dieta deficiente em antioxidantes (ANDERSEN et al., 2008; BEEVI et al., 2004) e o aparecimento do tumor (BREEN et al., 2001).

Esses aspectos comportamentais como o uso de tabaco, álcool e alimentação inadequada favorecem o aumento do estresse oxidativo (ELANGO et al., 2006; RASHEED et al., 2007a), o que pode promover o processo tumoral. Manoharam et al. (2005) avaliaram pacientes com câncer de cavidade oral e observaram níveis aumentados nos marcadores de estresse oxidativo como malondialdeído e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ao compará-los com indivíduos saudáveis. Além disso, foi verificada nos mesmos redução na atividade das enzimas antioxidantes como, por exemplo, a GPX. Estes autores verificaram, ainda, que pacientes com tumores bucais de estágio II a IV apresentaram, também, aumento e redução gradual do estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes, respectivamente.

Estudos apontam uma deficiência de Se associada ao câncer de cabeça e pescoço (BUNTZEL et al., 2003; PRASAD et al., 1998; YADAV et al., 2002). Comparados a grupos controles, pacientes com este tipo de câncer apresentaram níveis séricos de Se reduzidos e que diminuiriam, ainda mais, conforme o aumento da malignidade tumoral (YADAV et al., 2002). Além disso, observou-se nesses mesmos pacientes que a redução nos níveis séricos de Se foi acompanhada da redução da atividade de GPX e aumento dos níveis de malondialdeído (BUNTZEL et al., 2003).

Em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, que apresentam um sistema de defesa antioxidante comprometido, células da mucosa tornam-se mais suscetíveis às ações deletérias de ERO, criando um ambiente mais favorável para danos no DNA (Ácido desoxirribonucléico) e progressão da doença (BEEVI et al., 2004). Entretanto, não é claro o benefício de modificações dietéticas ou suplementação nutricional para reduzir o estresse oxidativo (BEEVI et al., 2004). De forma interessante, em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos a radioterapia, a suplementação com Se resultou em aumento dos níveis séricos do micronutriente e aumento da atividade sérica de GPX (ELANGO et al., 2006).

2 OBJETIVO

Avaliar eventual associação entre o polimorfismo PRO198LEU no gene que codifica para a enzima antioxidante dependente de selênio GPX1 e risco de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe, bem como possível interação com utilização de tabaco e ingestão de álcool.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Participantes do estudo

Foram utilizadas amostras de DNA genômico previamente extraídas de 175 pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide da cavidade oral e orofaringe (grupo caso), acompanhados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis a partir do ano de 2002, integrantes de parte da casuística do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço, e de 203 indivíduos internados nas enfermarias do Hospital Heliópolis, sem neoplasias ou histórico clínico de neoplasia ou com internação para tratamento de doenças relacionadas ao consumo de álcool e tabaco, ocupacionais ou imunodeficiências (grupo controle). O seguimento dos pacientes foi feito por uma equipe multidisciplinar de acordo com a rotina estabelecida no serviço, garantindo um seguimento mínimo de 24 meses após o tratamento inicial. Os registros dos prontuários médicos dos pacientes estavam disponibilizados dentro do site do projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço: <http://ctc.fmrp.usp.br/ClinicalGenomics/appSP/> e incluíam informações clínicas, bem como epidemiológicas abrangentes quanto aos fatores de risco relacionados à doença, que incluem tabagismo e etilismo.

3.1.1 Aspectos éticos

O material utilizado para a realização do presente estudo consistiu de DNA extraído de sangue, coletado após entrevista e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pacientes do grupo caso e indivíduos do grupo controle, integrantes de parte da casuística do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis sob número 386, em 15/04/05. O DNA estava armazenado em freezer -80°C no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis. Os dados clínicos e as informações contidas nos prontuários foram mantidos em sigilo, garantindo assim a confidencialidade das informações. O presente estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade Ciências Farmacêuticas da Universidade de São

Paulo (USP), sob número 98/2008 em 20/10/2008, e do Hospital Heliópolis, sob número 657 em 09/12/2008 (Em anexo).

3.1.2 Caracterização dos pacientes

As idades dos pacientes do grupo caso e controle variavam entre 29 e 81, e entre 20 e 86, respectivamente. Todos os pacientes eram do sexo masculino. Para a etnia, os dados foram auto relatados pelos participantes durante a entrevista. A distribuição percentual dos indivíduos dos grupos caso e controle em relação à faixa etária, etnia, utilização de tabaco e álcool estão mostrados na tabela a seguir (**Tabela 2**). Não houve diferença entre casos e controles quanto idade e etnia. Tabagistas e etilistas eram mais prevalentes entre casos do que em controles ($p < 0,05$).

Foram analisados o consumo de tabaco e álcool por casos e controles. O consumo de tabaco foi expresso em *pack years*, variação que inclui tanto a intensidade quanto a duração da utilização de tabaco. Um *pack year* corresponde a fumar um maço de cigarro (20 cigarros) por dia durante um ano (GATTAS et al., 2006). O tipo de fumo também foi considerado (LOLIO et al., 1993). De acordo com Gattas et al. (2006), a avaliação da ingestão de álcool foi calculada a partir da dose estimada em gramas de etanol por dia, considerando-se que cerveja, vinho e destilados apresentavam teores de etanol de 5%, 12% e 41%, respectivamente.

Tabela 2. Distribuição percentual dos participantes do grupo caso e controle de acordo com faixa etária, etnia e utilização de tabaco e álcool.

Variável	Casos n (%)	Controles n (%)	Total n (%)	p
Faixa etária				
< 40	5 (3)	13 (6)	18 (5)	
40 - 49	56 (32)	61 (30)	117 (31)	
50 - 59	61 (35)	72 (36)	133 (35)	
60 - 69	41 (23)	42 (21)	83 (22)	
≥ 70	12 (7)	15 (7)	27 (7)	0,815
Etnia				
Branco	110 (63)	110 (54)	220 (58)	
Mulato	42 (24)	66 (33)	108 (29)	
Negro	19 (11)	23 (11)	42 (11)	
Amarelo	0 (0,00)	1 (0)	1 (0)	0,215
NA*	4 (2)	3 (2)	7 (2)	
Tabagismo				
Nunca fumou	2 (1)	36 (18)	38 (10)	
Somente no passado	23 (13)	65 (32)	88 (23)	
Sim, ainda fuma	143 (82)	100 (49)	243 (65)	0,000
NA*	7 (4)	2 (1)	9 (2)	
Etilismo				
Nunca	8 (4)	31 (15)	39 (10)	
So no passado	47 (27)	76 (38)	123 (33)	
Sim, ainda bebe	113 (65)	94 (46)	207 (55)	0,001
NA*	7 (4)	2 (1)	9 (2)	

* não avaliado

3.2 Determinação do polimorfismo *GPXI* PRO198LEU

3.2.1 PCR-RFLP (Restriction fragment lenght polymorphism - polimerase chain reaction)

A determinação do polimorfismo *GPXI* PRO198LEU (rs1050450, éxon 2) foi realizada a partir da metodologia utilizada por Hu e Diamond (2003). Com base na seqüência da *GPx1* de humanos (ISHIDA et al. 1987), foram utilizados primers (superior, 5'-

TGCCCTACGCAGGTACA-3’; inferior, 5’-TCCCAAATGACAATGACACAG-3’) para produzir fragmentos de 338 bp, flanqueando o polimorfismo em questão.

A reação de PCR foi conduzida com 40 ciclos de amplificação que consistiram em:

- Desnaturação do DNA alvo por aquecimento (5 minutos a 94°C), de modo a separar as duas cadeias;

- Anelacão dos *primers* por ligações de ponte de hidrogênio às sequências complementares no fragmento do DNA alvo. Para isto, a mistura foi resfriada para a temperatura de 58°C por 60 segundos;

- Extensão dos iniciadores através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela DNA polimerase (7 minutos a 72°C).

Os produtos de PCR (2 microlitros) foram digeridos utilizando a enzima de restrição Apa I. A quantidade utilizada para a restrição foi de 30U, e a duração foi de 16 horas, a 37°C. Posteriormente as amostras foram submetidas à eletroforese em géis de agarose a 2%, utilizando o brometo de etídio para a visualização no transiluminador Amersham Bioscience® Macro UV 25.

Em todas as reações de PCR conduzidas, utilizou-se controle negativo (adição de todos os reagentes, com exceção do DNA) para verificar eventuais contaminações. Além disso, foram utilizadas como controles positivos, amostras de DNA de indivíduos classificados, por seqüenciamento de DNA, como homozigotos de referência para o polimorfismo *GPXI* PRO198LEU.

3.2.2 Sequenciamento de DNA para confirmação do genótipo de casos e controles classificados, por PCR-RFLP, como homozigotos polimórficos para o polimorfismo *GPXI* PRO198LEU.

O sequenciamento de DNA de casos e controles classificados, por PCR-RFLP, como homozigotos polimórficos para o polimorfismo *GPXI* PRO198LEU, foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (USP). A reação de sequenciamento foi feita a partir de produtos de PCR utilizando-se o MegaBACE™ 1000 Specifications, um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia GE Healthcare. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET

Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) código US81090. As sequências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12. Essas reações alcançam normalmente entre 500 e 600 bases com fidelidade de análise de 98,5%.

Para encaminhar as amostras para o sequenciamento, inicialmente foi realizada a técnica de PCR para amplificação do amplicon de interesse. O produto de PCR obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar se somente uma banda estava presente. A partir desse momento, foi realizada a purificação desses produtos de PCR, utilizando o kit Wisard® Gel and PCR Clean-up System QIAquick, da Promega. Após a purificação dos produtos de PCR, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% para confirmação da banda de DNA e quantificação do produto purificado, utilizando o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), como padrão.

3.3 Análise estatística

Todos os testes foram fixados com valores de confiança em 95% ($p < 0,05$). O teste Qui-quadrado foi realizado para comparar a distribuição do polimorfismo *GPX1* PRO198LEU nos grupos caso e controle, bem como para verificar se essa distribuição se encontrava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. *Odds Ratio* (OR) foi calculado para avaliar associação entre o genótipo da *GPX1* e risco de desenvolvimento de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe isoladamente e quando considerado a utilização de tabaco e ingestão de álcool.

4 RESULTADOS

A Figura 2 apresenta resultados referentes à separação em gel de agarose de produtos de PCR digeridos com a enzima *ApaI*, para genotipagem de casos em relação ao polimorfismo *GPX1* PRO198LEU.

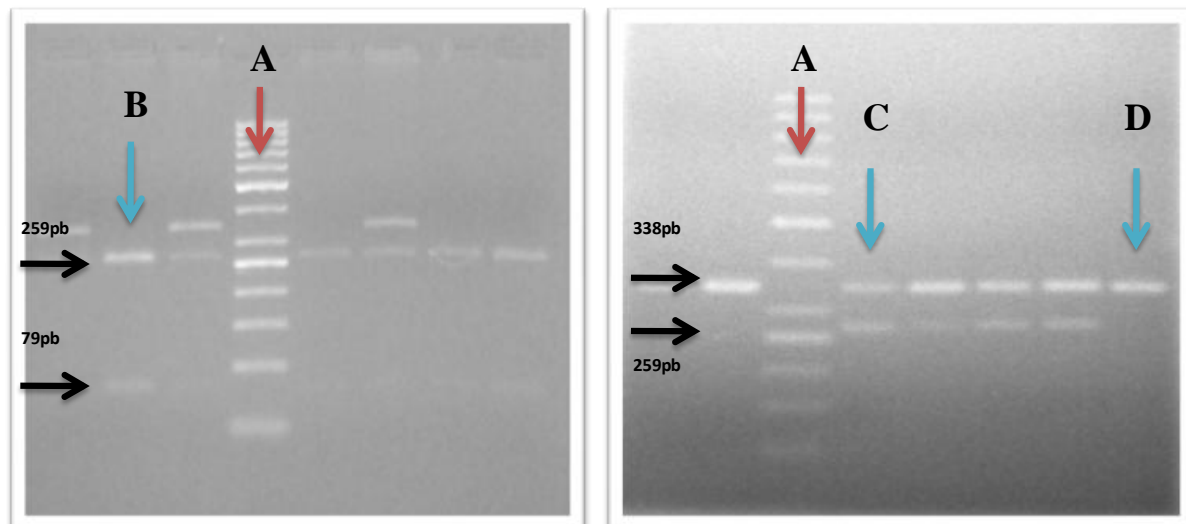


Figura 2. Separação em gel de agarose de produtos de PCR digeridos com a enzima *ApaI*, para genotipagem de casos em relação ao polimorfismo *GPX1* PRO198LEU. (A) Marcador de 50 pb; (B) Homozigoto de referência (Pro/Pro); (C) Heterozigoto (Pro/Leu); (D) Homozigoto polimórfico (Leu/Leu).

A presença de uma citosina na posição 911 (éxon 2) do gene para a *GPX1* (alelo de referência) gera um sítio de restrição para a enzima *ApaI* (KNIGHT ET al. 2004). A presença de timina, por sua vez, nessa mesma posição no gene em questão (alelo variante) elimina o sítio de restrição para a enzima *ApaI*. Dessa forma indivíduos considerados homozigotos de referência, heterozigotos e homozigotos polimórficos podem ser identificados pela presença de bandas de 259 pb e 79 pb; 338 pb, 259 pb e 79 pb; e 338 pb, respectivamente.

O genótipo de todos os casos (n =12) e controles (n =13) classificados, pela técnica de PCR-RFLP, como homozigotos para o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU, foi confirmado pela técnica de seqüenciamento do DNA. A concordância entre os resultados obtidos pelas 2 técnicas foi de 100%. A Figura 3 apresenta eletroferograma de indivíduo do grupo caso classificado como homozigoto polimórfico. Observou-se um único pico de curva na coloração vermelha referente ao alelo polimórfico T

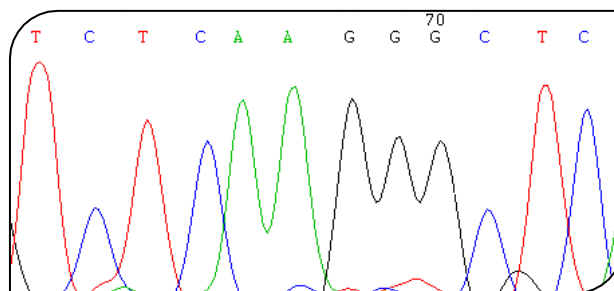


Figura 3. Eletroferograma referente ao sequenciamento de amostra de DNA de paciente com câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe e classificado como homozigoto polimórfico para o polimorfismo *GPXI* PRO198LEU.*a presença de um único pico de curva na coloração vermelha indica o genótipo em questão.

A Tabela 3 apresenta a distribuição do genótipo para o polimorfismo *GPXI* PRO198LEU nos grupos caso e controle.

Tabela 3. Distribuição do genótipo para o polimorfismo *GPXI* PRO198LEU nos grupos caso e controle (n;%).

Genótipo	Caso n (%)	Controle n (%)	Total n (%)	OR*	IC** (95%)	<i>p</i>
Pro/Pro	88 (50)	103 (51)	191 (51)			
Pro/Leu	75 (43)	87 (43)	162 (43)	1,01	(0.663 - 1.536)	0,5259
Leu/Leu	12 (7)	13 (6)	25 (7)	1,08	(0.469 - 2.489)	0,9836
Pro/Leu e Leu/Leu	87 (50)	100 (49)	187 (50)	1,02	(0.680 - 1.526)	0,5060
Total	175 (100)	203 (100)	378 (100)			

**Odds Ratio* **Intervalo de confiança

A distribuição dos genótipos nos casos e controles encontrou-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. A partir dos resultados encontrados, observou-se que não houve associação entre o polimorfismo *GPXI* PRO198LEU e risco de desenvolvimento de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe, visto que a distribuição do polimorfismo entre os grupos não apresentou diferenças estatisticamente significante ($p > 0,05$).

A Tabela 4 apresenta a frequência dos alelos de referência (C) e polimórfico (T) referentes ao polimorfismo *GPX1* PRO198LEU em casos e controles. Verifica-se a mesma frequência dos alelos nos grupos caso e controle.

Tabela 4. Frequência dos alelos de referência (C) e polimórfico (T) referentes ao polimorfismo *GPX1* PRO198LEU em casos e controles.

Alelo	Caso (n=175)	Controle (n= 203)
C	0,72	0,72
T	0,28	0,28

A Tabela 5 apresenta a distribuição do genótipo para o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU nos grupos caso e controle, estratificados de acordo com a utilização de tabaco. Nesse caso, não se verificou associação entre o polimorfismo em questão e risco de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe em pacientes que consumiam mais ou menos que 20 pack years.

Tabela 5. Distribuição do genótipo para o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU nos grupos caso e controle, estratificados de acordo com a utilização de tabaco.

Tabagismo (Pack year)	<i>GPX1</i> PRO198LEU	Caso * (n)	Controle ** (n)	OR ***	95%CI ****	p
≤20	Pro/Pro	42	29			
	Pro/Leu + Leu/Leu	41	30	0,9217	0,4735–1,7940	0,4720
>20	Pro/Pro	43	50			
	Pro/Leu + Leu/Leu	40	49	0,9492	0,5295–1,7015	0,4896

* De um total de 175 indivíduos do grupo caso, 7 indivíduos não informaram a quantidade de utilização de tabaco e 2 indivíduos relataram nunca ter fumado. **De um total de 203 indivíduos do grupo controle, 9 indivíduos não informaram a quantidade de utilização de tabaco e 36 indivíduos relataram nunca ter fumado. ***Odds Ratio **** Intervalo de confiança

A Tabela 6 apresenta a distribuição do genótipo para o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU nos grupos caso e controle, estratificados de acordo com a ingestão de álcool. Nesse caso, não se verificou associação entre o polimorfismo em questão e risco de câncer

epidermóide da cavidade oral e orofaringe em pacientes que ingeriam mais ou menos que 80 g etanol por dia.

Tabela 6. Distribuição do genótipo para o polimorfismo GPX1 PRO198LEU nos grupos caso e controle, estratificados de acordo com a ingestão de álcool.

Etilismo (g etanol/ dia)	GPX1 PRO198LEU	Caso* (n)	Controle** (n)	OR***	95%CI****	p
≤ 80	Pro/Pro	19	41			
	Pro/Leu + Leu/Leu	23	40	1,2408	0,5875–2,6205	0,3538
> 80	Pro/Pro	62	42			
	Pro/Leu + Leu/Leu	53	45	0,7978	0,4567–1,3939	0,2573

* De um total de 175 indivíduos do grupo caso, 10 indivíduos não informaram a quantidade de ingestão de álcool e 8 relataram nunca ter bebido. **De um total de 203 indivíduos do grupo controle, 4 indivíduos não informaram a quantidade de ingestão de álcool e 31 indivíduos relataram nunca ter bebido.***Odds Ratio ****Intervalo de confiança

5 DISCUSSÃO

De forma geral, associação entre estresse oxidativo e câncer tem sido avaliada por meio da quantificação de biomarcadores como danos no DNA, EROs e antioxidantes. Nesse contexto uma abordagem que também pode trazer informações relevantes consiste na avaliação de polimorfismos funcionais em genes que controlam o dano oxidativo celular, tais como os que codificam para enzimas antioxidantes (LIGHTFOOT et al., 2006).

A importância do Se e selenoproteínas no contexto do câncer de cabeça e pescoço foi ressaltada (HU et al., 2004). Dentre as 25 selenoproteínas humanas (CASTELLANO et al., 2005), apenas as GPXs, TrxRs, SPS2, e DIOs tem funções estabelecidas de oxirredução (PAPP, 2007). Considerando a importância do estresse oxidativo nas diferentes etapas da carcinogênese (FOSBERG et al., 2001; MANOHARAM et al., 2005), descreve-se na literatura que polimorfismos no gene para a GPX1 poderiam representar fator relacionado ao desenvolvimento do câncer (HU & DIAMOND, 2003; RATNASINGHE et al., 2000). Dentre essas variações genéticas, destaca-se o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU (MATHERS & HESKETH, 2007).

Aventa-se a hipótese que indivíduos com esse polimorfismo teriam menor capacidade de detoxificar EROs e, com isso, maior risco para o câncer (RASSCHOU-NIELSEN, 2006). É limitada a disponibilidade de informações quanto à consequência funcional da substituição de uma prolina por uma leucina no códon 198 da enzima GPX1 (ICHIMURA et al., 2004; HESKETH, 2008). Pacientes com câncer de pulmão heterozigotos ou homozigotos polimórficos para *GPX1* PRO198LEU apresentavam maior excreção urinária de 8-hidroxi-desoxiguanina em comparação aos homozigotos de referência (LEE et al., 2006). Além disso, o tratamento *ex vivo* de leucócitos com peróxido de hidrogênio resultou em maior dano no DNA no caso de indivíduos saudáveis com o alelo variante em comparação aos com apenas o alelo de referência (MIRANDA-VILELA et al., 2010). Observou-se que o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU esteve associado à redução da atividade enzimática em um estudo (RAVN-HAREN et al., 2006) mas não em outros dois (ARSOVA-SARAFINOVSKA et al., 2008; FOSBERG et al., 2000). A suplementação com Se de células de câncer de mama transfectadas com o alelo de referência ou polimórfico resultou em diferentes respostas em relação à indução da atividade da GPX (HU & DIAMOND, 2003). Mais especificamente observou-se menor indução nas células com o alelo variante, sugerindo uma consequência funcional para esse polimorfismo. De forma semelhante, verificou-se em indivíduos saudáveis

que a associação entre concentrações plasmáticas de Se e atividade da GPX1 foi diferente de acordo com o genótipo (maior associação para homozigotos de referência em comparação aos homozigotos polimórficos), indicando que o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU influencia a resposta enzimática ao Se (JABLONSKA et al., 2009). Nesse sentido, ressalta-se que o genótipo para selenoproteínas deve ser considerado em estudos de suplementação, inclusive visando a quimioprevenção do câncer (HESKETH, 2008; MATHERS & HESKETH, 2007).

No presente estudo, não se verificou associação entre o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU e risco de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe em homens. Efeitos biológicos de genótipos podem ser apenas evidentes nos indivíduos com exposição elevada a fatores ambientais como tabaco e álcool (CHOI et al., 2007). Nesse sentido, no presente estudo, consumo de tabaco ou ingestão de álcool, fatores de risco estabelecidos para a doença (ELANGO et al., 2006) e que promovem o estresse oxidativo (COX et al., 2006), não modificou a ausência de associação entre o polimorfismo em questão e risco para tal câncer. Identificaram-se na literatura apenas 2 estudos em que se avaliou o impacto do polimorfismo *GPX1* PRO198LEU no risco para câncer de cabeça e pescoço em outras populações. Em afro-americanas, a frequência do genótipo homozigoto polimórfico foi de 25,6% e 12,4% em casos e controles, respectivamente, verificando-se aumento do risco desse tipo de câncer associado a esse polimorfismo (HU et al., 2004). Por outro lado, em estudo mais recente conduzido em pacientes taiwaneses com câncer da cavidade oral, não se verificou associação entre o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU e risco para a doença (WU et al., 2010). Vale ressaltar que nesse estudo foram identificados indivíduos heterozigotos, mas não homozigotos polimórficos em uma amostra de 122 casos e 122 controles, indicando que o aspecto étnico representa fator importante a ser considerado (ICHIMURA et al., 2004). Miranda-Vilela et al. (2010) ressaltam que poucos estudos com o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU foram conduzidos no Brasil, em que se verifica intensa miscigenação. Resultados obtidos por esses autores indicam frequência de 0,69 e 0,31 para os alelos de referência e variante, respectivamente, em indivíduos brasileiros saudáveis. Essa frequência é bastante semelhante à verificada em nosso estudo, que foi de 0,72 (alelo de referência) e 0,28 (alelo polimórfico) tanto em pacientes com câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe, quanto no grupo controle, indicando que esse polimorfismo é bastante prevalente na população estudada.

Relativamente poucos estudos avaliaram a influência desse polimorfismo no risco de câncer de forma geral. Nesse sentido, em alguns casos verificou-se que o alelo polimórfico LEU aumentou o risco para a doença, embora em outros casos o mesmo ou não esteve

associado ao risco de câncer ou reduziu seu risco (ARSOVA-SARAFINOVSKA et al. 2008; LEE et al., 2006; WU et al., 2010)

De acordo com estudos de caso-controle, o polimorfismo *GPXI* PRO198LEU esteve associado com risco aumentado para o câncer de bexiga (ICHIMURA et al., 2004; PAZ-Y-MIÑO et al., 2010). Também no caso do câncer de pulmão, foi descrito associação entre esse polimorfismo e risco para a doença, embora a utilização de tabaco não tenha influenciado essa interação (LEE et al., 2006; RATNASINGHE et al., 2000). Da mesma forma, o alelo polimórfico aumentou o risco para o linfoma de Hodgkin, câncer que acomete o sistema linfático e cujo desenvolvimento envolve processos oxidativos e inflamatórios (BAECKLUND et al., 2006). No caso do câncer de mama, um estudo indicou que o polimorfismo *GPXI* PRO198LEU aumentou o risco para a doença (RAVN-HAREN et al., 2006). Além disso, nesse estudo os autores avaliaram também a influência do genótipo sobre a atividade da GPX, verificando que cada alelo polimórfico reduziu em 5% a atividade enzimática.

Em contrapartida, o alelo polimórfico LEU esteve associado à redução do risco do câncer de próstata (ARSOVA-SARAFINOVSKA et al., 2008). Mais especificamente, essa associação foi evidente nos pacientes com 65 anos de idade ou mais, mas não em indivíduos mais novos. De acordo com os autores, uma explicação para esse efeito protetor, em princípio paradoxal, seria de que o risco para doença não seria influenciado pelo polimorfismo em questão, mas pela co-segregação de um polimorfismo funcional em um gene localizado próximo ao *GPXI*. Além disso, os autores não verificaram influência do genótipo na atividade da GPX1. De forma semelhante, esse alelo esteve também associado à redução do risco de câncer de pulmão (RAASCHOU-NIELSEN et al., 2006; YANG et al., 2004).

Além disso, alguns estudos mostram que o polimorfismo *GPXI* PRO198LEU não ocasionaria nem proteção nem aumento do risco para o desenvolvimento do câncer. Ahn et al. (2005) relatam a possibilidade de que ausência de associação entre o polimorfismo *GPXI* PRO198LEU e risco de câncer de mama estaria relacionado à possibilidade de que efeitos no risco poderiam apenas ser observados em indivíduos com ingestão elevada de Se ou frutas e verduras. Em pacientes com câncer de pele (VOGEL, 2004), cólon (HANSEN et al., 2005) ou fígado (EZZIKOURI et al., 2010), também não foi observado associação entre o polimorfismo em questão e desenvolvimento dos cânceres em questão. Uma meta análise foi realizada a partir de estudos que avaliaram o polimorfismo *GPXI* PRO198LEU e risco para o desenvolvimento de câncer de mama. A partir dessa análise foi possível concluir que existe forte sugestão de ausência de associação entre o polimorfismo em questão e risco para o

desenvolvimento de câncer de mama (HU et al., 2010). A ausência de associação entre esse polimorfismo e câncer de próstata não foi modificada por fatores que afetam o estresse oxidativo, tais como tabagismo, consumo de álcool e uso de suplementos vitamínicos (CHOI et al., 2007).

Explicação para ausência de associação entre o polimorfismo *GPX1* PRO198LEU e risco para câncer nesses estudos e, inclusive, em nosso, poderia estar relacionado à possibilidade de que isoladamente polimorfismos comuns não apresentariam consequência funcional suficiente para levar ao desenvolvimento do câncer (COX et al., 2006). Nesse caso, a influência de variações genéticas no risco de câncer se daria pela somatória de efeitos de polimorfismos de baixa penetrância (CHOI et al., 2007). Análises mais detalhadas de polimorfismo por meio de haplótipos, bem como de combinação de polimorfismos em genes relacionados à detoxificação de EROs, poderiam esclarecer melhor o resultado encontrado, visto que o sistema de defesa antioxidante relaciona-se não somente a uma única enzima antioxidante, e sim a várias que se relacionam entre si (ARSOVA-SARAFINOVSKA et al., 2008; ICHIMURA et al., 2004). Assim, por exemplo, isoladamente os polimorfismos *GPX1* PRO198LEU e *SOD2* VAL16ALA não aumentaram o risco para o câncer de mama, enquanto em indivíduos homocigotos para ambos os polimorfismos se verificou risco aumentado para a doença (COX et al., 2006). Além disso, fatores ambientais poderiam interagir com variações genéticas para modular o risco do câncer (ZHUO & DIAMOND, 2009). Nesse sentido, no caso da enzima *GPX1*, levando-se em conta a importância do Se para sua atividade, seria relevante considerar especificamente o estado nutricional para o micronutriente em estudos buscando relacionar polimorfismos no gene em questão e risco de câncer (HESKETH, 2008).

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que isoladamente o polimorfismo *GPXI* PRO198LEU não aumentou o risco para o desenvolvimento do câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe. O mesmo foi observado quando analisada a associação do mesmo polimorfismo com o risco de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe, levando-se em consideração o consumo de tabaco e ingestão de álcool.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN J, GAMMON MD, SANTELLA RM, GAUDET MM, BRITTON JA, TEITELBAUM SL, TERRY MB, NEUGUT AI, AMBROSONE CB. No association between glutathione peroxidase Pro198Leu polymorphism and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 2005;14(10):2459-61.

ALARCON-NAVARRO M, MARTINEZ MCL. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci. Total Environ.* 2000;249:347-71.

ANDERSEN ZJ, LASSEN CF, CLEMMENSEN IH. Social inequality and incidence of and survival from cancers of the mouth, pharynx and larynx in a populationbased study in Denmark, 1994–2003. *Eur. J. Cancer.* 2008;44:1950–61.

ARSOVA-SARAFINOVSKA Z, MATEVSKA N, EKEN A, PETROVSKI D, BANEV S, DZIKOVA S, GEORGIEV V, SIKOLE A, ERDEM O, SAYAL A, AYDIN A, DIMOVSKI AJ. Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. *Int Urol Nephrol.* 2008;41(1):63-70.

BAECKLUND E, ILIADOU A, ASKLING J, EKBOM A, BACKLIN C, GRANATH F, CATRINA AI, ROSENQUIST R, FELTELIUS N, SUNDSTROM C, KLARESKOG L. Association of chronic inflammation, not its treatment, with increased lymphoma risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(3):692-701.

BAKER RD, BAKER SS, LAROSA K, WHITNEY C, NEWBURGER PE. Selenium regulation of glutathione peroxidase in human hepatoma cell line Hep3B. *Arch Biochem Biophys.* 1993;304:53–7.

BEEVI SSS, RASHEED AMH, GEETHA A. Evaluation of oxidative stress and nitric oxide levels in patients with oral cavity cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2004;34(7):379-85.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil: 2009. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/estimativa_incidencia_cancer_2009.pdf. Acesso em: 28 Abr. 2010.

BREEN N, WAGENER DK, BROWN ML, DAVIS WW, BALLARD-BARBASH R. Progress in cancer screening over a decade: results of cancer screening from the 1987, 1992, and 1998 national health interview surveys. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(22):1704-13.

BRIGELIUS-FLOHE´ R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biol Med.* 1999;27:951–65.

BROWN KM, ARTHUR JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr.* 2001;4(2B):593-9.

BÜNTZEL J, GLATZEL M, MICKE O, FRÖHLICH D. Status of essential trace elements in untreated carcinomas of the head and neck. *Laryngorhinootologie,* 2003;82(8):573-7.

CASTELLANO S, LOBANOV AV, CHAPPLE C, NOVOSELOV SV, ALBRECHT M, HUA D, LESCURE A, LENGAUER T, KROL A, GLADYSHEV VN, AND GUIGO R. Diversity and functional plasticity of eukaryotic selenoproteins: identification and characterization of the SelJ family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102: 16188–16193.

CEBRIAN A, PHAROAH PD, AHMED S, SMITH PL, LUCCARINI C, LUBEN R, REDMAN K, MUNDAY H, EASTON DF, DUNNING AM, PONDER BAJ. Tagging single-nucleotide polymorphisms in antioxidant defense enzymes and susceptibility to breast cancer. *Cancer Res.* 2006;15(2):1225-33.

CHOI JY, NEUHouser ML, BARNETT M, HUDSON M, KRISTAL AR, THORNQUIST M, KING IB, GOODMAN GE, AMBROSONE CB. Polymorphisms in oxidative stress-related genes are not associated with prostate cancer risk in heavy smokers. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.,* 2007;16:1115–20.

CLARK LC, COMBS Jr. GF, TURNBULL CW, SLATE EH, CHALKER DK, CHOW J, DAVIS LS, GLOVER RA, GRAHAM GF, GROSS EG, KRONGRAD A, LESHNER Jr. JL, PARK HK, SANDERS Jr. BB, SMITH CL, TAYLOR JR. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: a randomized controlled trial. Nutrition Prevention of Cancer Study Group. *JAMA, J Am Med Assoc.* 1996;276:1957-63.

COMBS JGF. Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition.* 2001;85:517-547.

COX DG, Tamimi RM, Hunter, DJ. Gene × Gene interaction between MnSOD and GPX-1 and breast cancer risk: a nested case-control study . *BMC Cancer.* 2006, 6:217.

DAVIS CD, UTHUS EO. Dietary selenite and azadeoxy - cytidine treatments affect dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation in rat colon and DNA methylation in HT-29 cells. *J Nutr.* 2002;132:292-7.

ELANGO N, SAMUEL S, CHINNAKKANNU P. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant status in stage (III) human oral squamous cell carcinoma and treated with radical radio therapy: influence of selenium supplementation. *Clin Chim Acta*. 2006;373:92-8.

EL-BAYOUMY K. The preventive role of selenium on genetic damage and on cancer: review. *Mutat Res*. 2001;475(1/2):123-39.

EZZIKOURI S, FEYDI AEE, AFIFI R, BENAZZOUZ M, HASSAR M, PINEAU P, BENJELLOUN S. Polymorphisms in antioxidant defence genes and susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Moroccan population. *Free Radical Res*. 2010;44(2):208–16.

FINLEY JW. Bioavailability of selenium from foods. *Nutr Rev*. 2006;64(3):146–51.

FORASTIERE A, KOCH W, TROTTI A, SIDRANSKY D. Head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2001;345(26):1890-900.

FORSBERG L, DE FAIRE U, MARKLUND S.L, ANDERSSON PM, STEGMAYR B, MORGENSTERN R. Phenotype determination of a common Pro-Leu polymorphism in human glutathione peroxidase 1. *Blood Cells, Mol, Dis*. 2000;26:423–6.

FOSBERG L, FAIRE U, MORGENSTERN R. Oxidative Stress, Human Genetic Variation, and Disease *Free Radic Biol Med*. 2001 Mar 1;30(5):500-5.

FOX TE, FAIRWEATHER-TAIT SJ. Selenium. In: HURRELL, R., editor. *The mineral fortification of foods*. Leatherhead: Leatherhead Publishing; 1999. v.2, p. 1-44.

GATTAS GJF, CARVALHO MB, SIRAQUE MS, CURIONI OA, KOHLER P, ELUF-NETO J, WUNSCH-FILHO V. Genetic polymorphisms of CYP1a1, CYP2e1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. *Head Neck*. 2006;28(9):819-26.

GONZAGA IB, MARTENS A, COZZOLINO SMF. Selênio. In: COZZOLINO SMF, organizador. *Biodisponibilidade de nutrientes*. São Paulo: Manole; 2005. p. 539-577.

GONZAGA IB. Avaliação nutricional relativa ao selênio em crianças com dieta enriquecida de castanha-do-Brasil. São Paulo; 2002. 161 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

HANSEN R, SAEBO M, SKJELBRED CF, NEXO BA, HAGEN PC, BOCK G, BOWITZ LOTHE IM, JOHNSON E, AASE S, HANSTEEN I-L, VOGEL U, KURE EH. GPX Pro198Leu and OGG1 Ser326Cys polymorphisms and risk of development of colorectal adenomas and colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2005;229(1):85–91.

HESKETH J. Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics. *Annu Rev Nutr.* 2008;28(1):157-77.

HOLBEN DH, SMITH AM. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J Am Diet Assoc.* 1999;99:836-43.

HU J, ZHOU G, WANG N, WANG Y. GPX1 Pro198Leu polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2010. [No Prelo].

HU YJ, DIAMOND AM. Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res.* 2003;63(12):3347-51.

HU YJ, DOLAN ME, BAE R, YEE H, ROY M, GLICKMAN R, KIREMIDJIAN-SCHUMACHER L, DIAMOND AM. Allelic loss at the GPx-1 locus in cancer of the head and neck. *Biol Trace Elem Res.* 2004;101(2):97-106.

ICHIMURA Y, HABUCHI T, TSUCHIYA N, WANG L, OYAMA C, SATO K, NISHIYAMA H, OGAWA O, KATO T. Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. *J Urol.* 2004;172:728–32.

ISHIDA K, MORINO T, TAKAGI K, SUKENAGA Y. Nucleotide sequence of a human gene for glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(23):10051.

JABLONSKA E, GROMADZINSKA J, RESZKA E, WASOWICZ W, SOBALA W, SZESZENIA-DABROWSKA N, BOFFETTA P. Association between GPx1 Pro198Leu polymorphism, GPx1 activity and plasma selenium concentration in humans *Eur J Nutr.* 2009.

KADEMARI D, BELL RB, BAGHERI S, HOLMGREN E, DIERKS E, POTTER B, LOUIS H. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(11):1599-605.

KNIGHT JA, ONAY UV, WELLS S, ELLEN HL, SHI JQ, ANDRULIS IL, OZCELIK H. Genetic variants of GPX1 and SOD2 and breast cancer risk at the Ontario site of the breast cancer family registry. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.*, 2004;13:146–9.

KÖHRLE J, BRIGELIUS-FLOHÉ R, BÖCK A, GÄRTNER R, MEYER O, FLOHÉ L. Selenium in biology: facts and medical perspectives. *Biol Chem.* 2000;381:849–64.

KOHRLE J. The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie.* 1999;81:527-33.

KRYUKOV GV, CASTELLANO S, NOVOSELOV SV, LOBANOV AV, ZEHTAB O, GUIGO R, GLADYSHEV VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science.* 2003;300:1439–43.

LEE CH, LEE KY, CHOE KH, HONG YC, NOH S. Effects of oxidative DNA damage and genetic polymorphism of the glutathione peroxidase 1 (GPX1) and 8-Oxoguanine glycosylase 1 (hOGG1) on lung cancer. *J Prev Med Public Health,* 2006;39(2):130-4.

LEI XG, CHENG WH, McCLUNG JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annu Rev Nutr.* 2007;27:41-61.

LIGHTFOOT TJ, SKIBOLA CF, SMITH AG, FORREST MS, ADAMSON PJ, MORGAN J, BRACCI PM, ROMAN E, SMITH MT, HOLLY EA. Polymorphisms in the oxidative stress genes, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2006;91:1222-7.

LOBINSKY R, EDMONDS JS, SUZUKI KT, UDEN PC. Species-selective determination of selenium compounds in biological materials. *Pure Appl Chem.* 2000;72(3):447-61.

LOLIO CA, SOUZA JMP, SANTO AH, BUCHALLA CM. Prevalência de tabagismo em localidade urbana da região sudeste do Brasil. *Rev Saúde Pública.* 1993;27(4):262-5.

LU H, CAI L, MU LN, LU QY, ZHAO J, CUI Y, SUL JH, ZHOU XF, DING BG, ELASHOFF RM, MARSHALL J, YU SZ, JIANG QW, ZHANG ZF. Dietary mineral and trace element intake and squamous cell carcinoma of the esophagus in a Chinese population. *Nutr Cancer.* 2006;55(1):63-70.

LÜ J, JIANG C. Selenium and cancer chemoprevention: hypotheses integrating the actions of selenoproteins and selenium metabolites in epithelial and non-epithelial target cells. *Antioxid Redox Signaling.* 2005;7(11/12):1715-27.

MANOHARAN S, KOLANJIAPPAN K, SURESH K, PANJAMURTHY K. Lipid peroxidation & antioxidants status in patients with oral squamous cell carcinoma. *Indian J Med Res.* 2005;122:529-34.

MATÉS JM, PÉREZ-GÓMEZ C, CASTRO, IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999;32(8):595-603.

MATHERS JC, HESKETH JE. The biological revolution: understanding the impact of SNPs on diet-cancer interrelationships. *J Nutr.* 2007;137:253S–8S.

MEDINA D, THOMPSON H, GANTHER H, IP C. Se-methylselenocysteine: a new compound for chemo-prevention of breast cancer. *Nutr Cancer.* 2001;40(1):12-7.

MIRANDA-VILELA AL, ALVES PCZ, AKIMOTO AK, LORDELO GS, GONÇALVES CA, GRISOLIA CK, KLAUTAU-GUIMARÃES MN. Gene polymorphisms against DNA damage induced by hydrogen peroxide in leukocytes of healthy humans through comet assay: a quasi-experimental study. *Environ. Health.* 2010;9:21.

MIRRA AP, LATORRE MRDO, VENEZIANO BB. Incidência de câncer no município de São Paulo, Brasil, 1997-1998: mortalidade de câncer no município de São Paulo, Brasil: tendência no período 1969-1998. São Paulo: MS/USP, FSP; 2001. 61 p.

MOGHADASZADEH B, BEGGS AH. Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. *Physiology.* 2006;21:307-15.

MOSTOWSKA A, HOZIASZ KK, LIANERI M, PIWOWAR W, JAGODZINSKI PP. Polymorphism variants of genes encoding main antioxidant enzymes and the risk of CL/P-affected pregnancies. *Clin Biochem.* 2007;40:416–41.

NEGRI E, FRANCESCHI S, BOSETTI C. Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer.* 2000;86:122–7.

ORTUNO J, ROS G, PERIAGO MJ, MARTINEZ C, LOPEZ G, RODRIGO J. Importancia nutricional del selenio. *Arch Latinoam Nutr.* 1997;47(1):6-13.

PAPP LV, LU J, HOLMGREN A, KHANNA KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signaling.* 2007;9(7):775-806.

PATRICK L. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. *Altern Med Rev.* 2004;9(3):239-58.

PAZ-Y-MIÑO C, MUÑOZ MJ, LÓPEZ-CORTÉS A, CABRER AA, PALACIOS A, CASTRO B, PAZ-Y-MIÑO N, SÁNCHEZ ME. Frequency of polymorphisms pro198leu in GPX-1 gene and ile58thr in MnSOD gene in the altitude Ecuadorian population with bladder cancer. *Oncol Res.* 2010;18(8):395-400.

PRASAD AS, BECK FWJ, DOERR TD, SHAMSA FH, PENNY HS. Nutritional and zinc status of head and neck cancer patients: an interpretive review. *J Am Coll Nutr.* 1998;17(5):409-18.

RAASCHOU-NIELSEN O, SORENSEN M, HANSEN RD. GPX1 Pro198Leu polymorphism, interactions with smoking and alcohol consumption, and risk for lung cancer. *Cancer Lett.*, 2007;247:293-300.

RASHEED MH, BEEVI SS, RAJARAMAN R, BOSE SJC. Alleviation of oxidative and nitrosative stress following curative resection in patient with oral cavity cancer. *J Surg Oncol.* 2007;96(3):194-9.

RATNASINGHE D, TANGREA JA, ANDERSEN MR, BARRETT M.J. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res.* 2000;60(15):6381-83.

RAVN-HAREN G, OLSEN A, TJØNNELAND A, DRAGSTED LO, NEXØ BA, WALLIN A, OVERVAD K, RAASCHOU-NIELSEN O, VOGEL U. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis.* 2006;27(4):820-5.

RAYMAN MP, INFANTE HG, SARGENT M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *Br J Nutr.*, 2008;100:238-53.

RAYMAN MP. The importance of selenium to human health. *Lancet.* 2000;356(9225):233-41.

REILLY C. Selenium in food and health. Londres: Blackie Academic and Professional; 1996. 338 p.

RODRIGUEZ-MONGE EJ, SHIN DM, LIPPMAN SM. Head and neck cancer. In: PAZDUR, R., editor. *Medical oncology: a comprehensive review.* Huntington: PRR, 1997. p. 1-21. Disponível em: www.cancernetwork.com/textbook/morev13.htm. Acesso em: 28 Abr. 2010.

RYAN-HARSHMAN M, ALDOORI W. The relevance of selenium to immunity, cancer, and infectious/inflammatory diseases. *Can J Diet Pract Res.* 2005;66(2):98-102.

SCHOMBURG L, SCHWEIZER U, KÖHRLE J. Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(16):1988-95.

SCHRAUZER GN Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J Nutr.* 2000;130:1653-56.

SCHRAUZER GN, WHITE DA, SCHNIEDER CJ. Cancer mortality correlation studies III: statistical associations with dietary selenium intakes. *Bioinorg Chem.* 1997;7:23-31.

SCHUBERT A, HOLDEN JM, WOLF WR. Selenium content of a core group of foods based on a critical evaluation of published analytical data. *J Am Diet Assoc.* 1987;87:285-99.

SUZEN HS, GUCYENER E, SAKALLI O, UCKUN Z, KOSE G, USTEL D, DUYDU Y. CAT C-262T and GPX1 Pro198Leu polymorphisms in a Turkish population. *Mol Biol Rep.* 2009;37(1):87-92.

TAPIERO H, TOWNSEND DM, TEW KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother.* 2003;57:134-44.

THOMSON CD. Assessment of requirement for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58:391-402.

TOLONEN M. Vitaminas y minerales en la salud y la nutricion. Zaragoza: Acribia; 1995. p. 45-83.

TRALONGO V, RODOLICO V, LUCIANI A, MARRA G, DANIELE E. Prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a review of the literature. *Anticancer Res.* 1999;19(4C):3503-10.

UNITED STATES. Institute of Medicine. Food Nutrition Board. Introduction to dietary reference intakes. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. cap.1, p. 21-34, 2001. Disponível em: <http://www.nap.edu/openbook>. Acesso em: 28 Abr 2010.

VOGEL U, OLSEN A, WALLIN H, OVERVAD K, TJONNELAND A, NEXO BA. No association between GPX Pro198Leu and risk of basal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.*, 2004;13(8):1412-3.

WU S, LEE K , CHEN C, LIN C, TSENG Y, MA H, TSAI S , TSAI L Epistasis of oxidative stress-related enzyme genes on modulating the risks in oral cavity cancer. *Clin Chim Acta.*2010.

YADAV SP, GERA A, SINGH I, CHANDA R. Serum selenium levels in patients with head and neck cancer. *J Otolaryngol.* 2002;31(4):216-9.

YANG P, BAMLET WR, EBBERT JO, TAYLOR WR, ANDRADE M. Glutathione pathway genes and lung cancer risk in young and old populations. *Carcinogenesis.* 2004;25(10):1935-44.

ZARBOCK R, HENDIG D, SZLISKA C, KLEESIEK K, GOETTING C. Pseudoxanthoma elasticum: genetic variations in antioxidant genes are risk factors for early disease onset. *Clin. Chem.*, 2007;53(10):1734-40.

ZENG H. Selenite and selenomethionine promote HL-60 cell cycle progression. *J Nutr.* 2002;132(4):674-9.

ZHAO H, LIANG D, GROSSMAN HB, WU X. Glutathione peroxidase 1 gene polymorphism and risk of recurrence in patients with superficial bladder cancer. *Urology.* 2005;66(4):769-74.

ZHUO P & DIAMOND AM. Molecular mechanisms by which selenoproteins affect cancer risk and progression. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1790(11):1546-54.