

Eloisa Helena Ribeiro Olivieri
**Polimorfismos em genes do biometabolismo e
risco para o carcinoma de células escamosas de
cabeça e pescoço**
Botucatu - SP
2007

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre.

**Polimorfismos em genes do biometabolismo e
risco para o carcinoma de células escamosas de
cabeça e pescoço**

Eloisa Helena Ribeiro Olivieri
Orientadora: Prof^a Dr^a Silvia Regina Rogatto
Botucatu - SP
2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
NeoGene Laboratório
Departamento de Urologia
Faculdade de Medicina – Botucatu/SP

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Olivieri, EHR Introdução O câncer surge a partir da proliferação celular descontrolada de uma única célula, acredita-se ser clonal em origem e resultante do acúmulo de alterações genéticas e/ou epigenéticas (Braakhuis et al., 2005). O acúmulo de mutações na célula e suas descendentes é um processo lento, e isso, provavelmente, explica a maior incidência do câncer em pessoas idosas.

As alterações genéticas são componentes integrais do câncer e são descritas como unidades determinantes da suscetibilidade a carcinógenos em nível celular. As anormalidades genéticas que precedem o desenvolvimento de um tumor definem as alterações bioquímicas que são responsáveis por uma célula normal adquirir a habilidade de esquivar-se dos mecanismos reguladores que controlam o crescimento celular, motilidade e invasividade. Dentre estas anormalidades estão a expressão aumentada de protooncogenes (Fearon & Vogelstein, 1990), inativação de genes supressores de tumor (Weinberg, 1991), instabilidades cromossômicas (Lengauer et al., 1998), alterações nos genes de reparo a danos no DNA (Hoeijmakers, 2001), reativação da telomerase (Greider & Blackburn, 1996) e alterações epigenéticas (Rountree et al., 2001).

A célula cancerosa tem alto potencial proliferativo, perde a capacidade de aderência, secreta enzimas que atacam a matriz extracelular, invade os tecidos vizinhos, os vasos sanguíneos e linfáticos e se espalha pelo organismo, estabelecendo-se e proliferando em locais distantes de sua origem, onde produz tumores secundários (metástases). As células tumorais promovem angiogênese pela secreção de moléculas que estimulam o crescimento dos vasos sanguíneos capilares.

1 Olivieri, EHR Introdução

Estas alterações, de importância crítica para o entendimento do processo de carcinogênese, não são totalmente caracterizadas.

A visão do câncer como uma doença essencialmente genética é apoiada pelo fato de que as células tumorais apresentam alterações genômicas específicas. Adicionalmente, acredita-se que a suscetibilidade herdada possui um papel efetivo no risco de desenvolvimento do câncer (Perera, 1997).

O Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço (CCECP)

Os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço abrangem um grupo heterogêneo de doenças do trato aerodigestivo superior que incluem o câncer de lábios; cavidade oral (mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua, soalho da boca); faringe, que inclui orofaringe (amídalas, palato mole, base da língua), nasofaringe, hipofaringe; fossa nasal e seios paranasais; laringe (glótica e supraglótica) e glândulas salivares (Schantz et al., 1993; Olshan et al., 2000). Aproximadamente 40% dos cânceres de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade oral, 25% na laringe, 15% na faringe, 7% nas glândulas salivares e 13% nos outros locais (UICC, 1999). Aproximadamente 95% dos tumores se iniciam nas células escamosas (Neville & Day, 2002).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), 60% dos pacientes, por exemplo, com câncer de boca, que chegam aos hospitais credenciados, já estão nos estádios III e IV, cujo tratamento não será curativo. Isso, porque ao diagnóstico acima

2 Olivieri, EHR Introdução

de 40% dos pacientes já têm um ou mais gânglios metastáticos. Além disso, muitos pacientes apresentam risco aumentado de tumores secundários (UICC, 1999).

Os sintomas clínicos iniciais incluem manchas esbranquiçadas ou avermelhadas, ou, ainda, ulcerações superficiais assintomáticas localizadas nas regiões do lábio, língua, glândulas salivares maiores e menores, gengiva, soalho da boca, mucosa da bochecha, vestibulo da boca, palato e úvula. Nos estadios avançados, as úlceras ou tumorações são maiores, podendo infiltrar as estruturas adjacentes (músculos, ossos, pele, nervos, etc.). Estas lesões são dolorosas, de sangramento fácil e odor fétido. O paciente pode apresentar dificuldades de fala, mastigação e deglutição, além de emagrecimento acentuado (UICC, 1999).

Embora considerados como uma única entidade histopatológica, os CCECP de diferentes localizações anatômicas são distintos quanto ao padrão de crescimento, comportamento clínico e prognóstico. Por exemplo, tumores de cavidade oral, geralmente, são mais diferenciados que os carcinomas de orofaringe. Além disso, carcinomas de orofaringe têm uma alta tendência a recorrer localmente e gerar metástases em contraste com os carcinomas de cavidade oral e laringe (UICC, 1999). A base de língua (localizada na orofaringe), por exemplo, e o seio piriforme (na hipofaringe), são locais comuns de neoplasia maligna. Crescem em uma região rica em vasos linfáticos, explicando o grande número de metástase cervical precoce que acomete esses pacientes. Em geral, os cânceres de hipofaringe são mais agressivos que os tumores localizados em outros sítios anatômicos da cabeça e pescoço. Os pacientes com cânceres de faringe mostram baixa taxa de sobrevida e são de difícil tratamento (McMahon & Chen, 2003).

3 Olivieri, EHR Introdução

É desconhecida a razão para a considerável diversidade no comportamento clínico e biológico dos tumores nos diferentes sítios anatômicos, mas provavelmente está relacionada a alterações funcionais de diferentes conjuntos de genes. Apesar da alta frequência da doença e da diversidade no comportamento biológico, ainda não estão completamente estabelecidas quais alterações genéticas estão envolvidas na transformação ou progressão das lesões de cabeça e pescoço (Canevari & Rogatto, 2004).

Etiologia e Epidemiologia

O CCECP é um câncer comum no mundo, estima-se que 500.000 novos casos ocorrerão anualmente (Greenlee et al., 2001). Para 2005, nos Estados Unidos, foram estimados 29.370 novos casos para o câncer de cavidade oral e aproximadamente 7.320 mortes pela doença. Estes tumores apresentam altas taxas de incidência e mortalidade na América do Sul, em particular na região Sudeste do Brasil. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) classifica os carcinomas de cabeça e pescoço como a sexta neoplasia mais incidente no Brasil (<http://www.inca.gov.br>). Segundo o INCA, as estimativas para o ano de 2006 apontaram à ocorrência de 472.050 casos novos de câncer, destes 138.570 atribuídos ao Estado de São Paulo. O câncer de cavidade oral atingiria 13.470 indivíduos, sendo 10.060 do sexo masculino. Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento do câncer de cabeça e pescoço, a sobrevida em cinco anos não tem aumentado significativamente (McMahon & Chen, 2003).

4 Olivieri, EHR Introdução

A etiologia do câncer de cabeça e pescoço é extremamente complexa, devido à natureza multigênica da doença e ao grande número de agentes ambientais potenciais aos quais os indivíduos são expostos. O tabagismo e o etilismo têm sido consistentemente associados a um aumento do risco de câncer de cabeça e pescoço (O'Neill & Fishbein, 1986). O risco relativo para quem usa bebida alcoólica de maneira abusiva é estimado em 2 a 6 vezes, enquanto os que usam tabaco o risco aumenta de 5 a 25 vezes dependendo da quantidade de cigarros/dia, do sexo e diferenças raciais. O risco para o uso simultâneo do tabaco e álcool aumenta para 15 a 40 vezes quando comparado a pessoas não consumidoras (Lazarus & Park, 2000).

Vários estudos indicam a associação entre o consumo de tabaco e o desenvolvimento de carcinomas espinocelulares nas vias aerodigestivas superiores (Sturgis & Wei, 2002; Goldenberg et al., 2004; Sturgis et al., 2004; Viswanathan & Wilson, 2004). DeStefani et al. (1987) e Maier et al. (1992) ao estudarem pacientes com carcinoma de laringe, verificaram que 96,5% e 97,2% dos indivíduos, respectivamente, eram fumantes. Em 1977, Wynder et al., ao compararem indivíduos fumantes e não fumantes, relataram um risco relativo mais elevado (30 vezes) para carcinomas da laringe, nos homens que fumavam pelo menos meio maço de cigarros por dia há mais de 10 anos. O uso da maconha também é visto como um potencial fator de risco, principalmente entre os jovens (Schantz & Yu, 2002). O tabaco processado contém um número superior a três mil compostos, incluindo 30 carcinógenos. Por outro lado, a fumaça gerada, quando o cigarro é queimado, contém mais de quatro mil constituintes químicos, havendo, dentre esses, cerca de 50 carcinógenos. A diversidade química de compostos tóxicos e carcinogênicos na fumaça do cigarro leva à ambigüidade acerca de qual deles é o mais importante.

5 Olivieri, EHR Introdução

Todavia, estudos sobre o mecanismo da carcinogênese induzida pelo tabaco e a dosimetria efetuada em fumantes e mascadores de fumo indicam que os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), as nitrosaminas específicas do tabaco (NET) e as aminas aromáticas são os protagonistas no processo dos cânceres associados ao fumo. Os outros compostos carcinogênicos nos metabólitos do cigarro são os de partícula alfa que emitem ^{210}Po , traços de metais, monóxido de carbono, hidrogênio cianida e fenóis. Estes agentes carcinogênicos são convertidos em metabólitos reativos capazes de interagir com o DNA pela ação das enzimas oxidativas (Shimada & Fujii-Kuriyama, 2004).

A duração do hábito tabagista é outro fator considerável e associado ao aumento linear para o risco de certos cânceres tais como pulmão e cabeça e pescoço. O álcool pode levar à deficiências nutricionais, ao aumento da suscetibilidade a carcinógenos e também à supressão imunológica. Além disso, ele pode agir como um solvente e facilitar a penetração dos carcinógenos nos tecidos alvo (Viswanathan & Wilson, 2004). Embora seja desconhecido o mecanismo pelo qual o álcool induz a carcinogênese, há evidências de que o acetaldeído, o primeiro metabólito após a ingestão do álcool, tem um papel crítico no desenvolvimento dos cânceres relacionados ao álcool (Lazarus & Park, 2000). As células basais e epiteliais dos cânceres do trato aerodigestivo superior devem também ser alteradas por altas concentrações de etanol diretamente na mucosa exposta e, subseqüentemente, por concentrações mais altas de carcinógenos e pró-carcinógenos (Viswanathan & Wilson, 2004).

Além do consumo de tabaco e a exposição individual ao etanol, fatores ocupacionais, radiações, bem como deficiências nutricionais e infecções virais,

6 Olivieri, EHR Introdução

representam os fatores mais relevantes associados à etiologia desse tipo tumoral (Varzim, 2000). Estudos epidemiológicos relatam que o consumo de frutas e vegetais ricos em vitaminas A e C e beta carotenos possuem um efeito benéfico na prevenção de carcinomas orais, enquanto a carne e a pimenta vermelha são consideradas fatores de risco (Franco et al., 1989; Scully & Porter, 2000).

Alguns tipos de vírus como o HPV (papiloma vírus humano), o Epstein-Barr e o HTLV (associados a determinados tipos de leucemia e linfomas) também são considerados agentes passíveis de indução do câncer de cabeça e pescoço (Sugerman & Shillito, 1997).

Em conjunto, estes fatores de risco não explicam adequadamente 5 a 10% dos casos de CCECP. Esta disparidade sugere a existência de genes de predisposição envolvidos na etiologia desses tumores. Evidências que reforçam a idéia de predisposição genética incluem o risco aumentado de CCECP entre parentes de primeiro grau de pacientes afetados, presença da doença em pacientes jovens e de pacientes com CCECP sem história de exposição a agentes carcinogênicos conhecidos. Além disso, a presença de múltiplos cânceres primários em um indivíduo é um indicador de predisposição hereditária para o câncer. Quando há história familiar de CCECP em parentes de primeiro grau, o risco aumenta 3 a 8 vezes (Foulkes et al., 1996).

Diferenças individuais geradas por polimorfismos em genes relacionados à capacidade de metabolizar drogas, variações funcionais em enzimas detoxificadoras e capacidade ineficaz de reparo a danos no DNA indicam que a constituição genética deve aumentar a suscetibilidade de um indivíduo ao câncer (Sturgis & Wei, 2002).

7 Olivieri, EHR Introdução

A idade média de apresentação da doença é de 64 anos e a maioria dos casos de CCECP ocorre no sexo masculino. A razão entre homens e mulheres é aproximadamente 10:1 (Stewart & Kleihues, 2003). Estudos apontam o homem como tendo 4 a 5 vezes mais chances de desenvolver o câncer de laringe e hipofaringe do que as mulheres (Dobrossy, 2005). Isto porque os fatores de risco principais para estes tipos de câncer estão ligados ao hábito de fumar e consumir bebidas alcoólicas (Viswanathan & Wilson, 2004). Entretanto, nos últimos anos, esta razão tem-se mostrado em declínio. Na medida em que as mulheres estão adquirindo estes hábitos, porém, percebe-se que também está aumentando o risco da doença e o número de casos no sexo feminino está na ordem de 33,3% entre 1998 e 1999 (<http://cis.nci.nih.gov>).

Estadiamento e prognóstico

Os cânceres de cabeça e pescoço são classificados de acordo com o tamanho e local de envolvimento da neoplasia primária (T), número e tamanho das metástases para os linfonodos cervicais (N) e evidência de metástases à distância (M). O Estadio I caracteriza-se por neoplasia primária ≤ 2 cm no maior diâmetro ou restrita a uma região anatômica sem metástases regionais ou distantes (T₁N₀M₀). No Estadio II, a neoplasia primária mede 2 a 4 cm no maior diâmetro ou há comprometimento de duas áreas de um ponto específico (p.ex., laringe), sem metástases regionais ou distantes (T₂N₀M₀). O Estadio III é caracterizado por neoplasia primária > 4 cm no maior diâmetro ou comprometimento de três áreas adjacentes numa região específica

8 Olivieri, EHR Introdução

da cabeça e pescoço e/ou uma metástase do pescoço isolada, com diâmetro ≤ 3 cm (T_3N_0 ou $T_{1-3}N_1M_0$). No Estadio IV, o câncer é maciço, com invasão óssea e cartilaginosa e/ou com comprometimento de uma região adjacente à região de origem (por ex., da cavidade oral para a orofaringe), a metástase cervical mede > 3 cm; há envolvimento de linfonodos bilaterais, contralaterais ou ipsilaterais múltiplos ou fixação aos tecidos adjacentes; e/ou existem evidências de metástases à distância ($T_{1-4}N_{1-3}M_{0-1}$). Os tumores exofíticos ou verrucosos respondem melhor ao tratamento que as lesões infiltrantes, ulcerativas ou induradas. A presença de metástases cervicais ou à distância está associada a um índice de sobrevida limitado. O grau de diferenciação celular reflete o comportamento biológico e é classificado de I a IV, de modo que os tumores menos diferenciados recebem graduação mais alta (Damm & Bouquot, 1998). Quanto menos diferenciado o câncer, geralmente, maior é a chance de ocorrer metástases regionais e à distância. A invasão de músculos, ossos ou cartilagem reduzem as taxas de cura (Zakrzewska, 1999). A disseminação perineural, evidenciadas pela dor, paralisia ou dormência, indica uma neoplasia altamente agressiva com uma propensão à recorrência. Com o tratamento apropriado, a sobrevida dos pacientes com câncer do Estadio I, geralmente, se aproxima de 90%; no Estadio II, 75%; no Estadio III, 45 a 75%; e no Estadio IV é $< 35\%$. O índice de sobrevida global aos 5 anos é 65% para os pacientes com câncer epidermóide de cabeça e pescoço nos Estádios II e III, limites superiores só são observados em cânceres orais (estimada em 91%) e inferiores em hipofaringe (sobrevida estimada em 31%). O índice cai para $\leq 30\%$ para pacientes com envolvimento de linfonodos. Os pacientes com mais de 70 anos de idade apresentam períodos mais prolongados

9 Olivieri, EHR Introdução

sem a doença e índices de sobrevivência melhores que os pacientes mais jovens (McMahon & Chen, 2003).

O comportamento tumoral é principalmente baseado no estadiamento TNM a partir de considerações anatômicas. Essa classificação é principalmente utilizada para determinar o prognóstico do paciente e prever a resposta ao tratamento (Ludwig & Weinstein, 2005). Contudo, experiências clínicas revelam que, apesar de classificados num mesmo grupo, tumores semelhantes podem ter diferentes comportamentos e prognósticos. Assim, a investigação de marcadores moleculares em tumores primários que possam prever o comportamento tumoral, associada a classificação TNM, é de grande importância para o seguimento do paciente (Ludwig & Weinstein, 2005).

Suscetibilidade e predisposição genética ao câncer

Inicialmente, a suscetibilidade genética ao câncer era atribuída principalmente ao nível de exposição aos xenobióticos, como aqueles presentes na fumaça do cigarro ou em ambientes poluídos, entre outros (Weinberg, 1992). Atualmente, acredita-se que o longo processo que conduz ao câncer, a partir da exposição à xenobióticos, está sujeito às variações individuais que por sua vez, estão sob controle genético. Desse modo, a suscetibilidade para o desenvolvimento inclui tanto componentes ambientais quanto genéticos (Rossit & Conforti-Froes, 2002).

A maioria das neoplasias é, teoricamente, passível de prevenção, uma vez que achados epidemiológicos apontam um grande número de fatores etiológicos

10 Olivieri, EHR Introdução

ambientais, tais como a exposição esporádica ou seqüencial a carcinógenos químicos, radiação ionizante e não ionizante e os estados inflamatórios crônicos (bacterianos, virais ou parasitários). O estilo de vida, particularmente o hábito tabagista e a dieta somam-se aos agentes causadores passíveis de controle, constituindo importante alvo das campanhas de prevenção (Sugimura, 2000). Além destes, fatores como etnia, sexo, idade, status nutricional e de saúde também têm influência nas taxas de incidência e mortalidade por câncer (Perera et al., 1997).

Knudson (1985) propôs a **teoria dos oncodemes**, que permite classificar os indivíduos e as populações em quatro grupos quanto às participações dos fatores ambiental e genético em seu risco de desenvolver o câncer: 1. Mutações ao acaso; 2. Ambiental: contato com carcinógenos; 3. Ambiental/Genético: carcinógenos ambientais agindo em indivíduos geneticamente suscetíveis e 4. Genético: influência genética preponderante à ambiental. No quarto oncodeme, as mutações conferem alto risco individual de um tipo particular de câncer em algum estágio da vida, independente do ambiente. Os indivíduos desta população são ditos **predispostos** e constituem uma minoria. Por outro lado, existe um grupo maior de pessoas que, comparativamente, têm menores chances de desenvolver neoplasias, mas seus riscos ainda são mais elevados que os da população geral, pois respondem drasticamente à exposição ambiental. Esses são ditos **suscetíveis**, pertencendo ao terceiro oncodeme (Knudson et al., 1991). Assim, a identificação precisa de marcadores de suscetibilidade e de genes de predisposição é de fundamental importância na predição de riscos (Albertini, 1999; Rossit & Conforti-Froes, 2002).

As pesquisas no campo da epidemiologia molecular têm fornecido evidências contundentes da contribuição do ambiente no surgimento do câncer humano e

11 Olivieri, EHR Introdução

também sobre as situações de risco fortemente influenciadas pela suscetibilidade genética. Os resultados obtidos de maneira rápida e eficaz pela técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase), os modelos laboratoriais *in vitro* e *in vivo*, os ensaios bioquímicos e os dados epidemiológicos possibilitam o cálculo dos riscos populacionais e individuais quanto ao desenvolvimento de neoplasias. Estas informações podem permitir a intervenção precoce e a implementação de estratégias eficazes de prevenção (Hussaim & Harris, 1998; Bonassi et al., 2000; Partridge et al., 2005; Temam & Janot, 2006). Para tanto, faz-se necessário à identificação de biomarcadores como "indicadores sinalizando eventos em amostras ou sistemas biológicos" (Nebert et al., 1996).

O princípio básico dos marcadores de suscetibilidade reside nas diferenças individuais quanto à sensibilidade às doenças induzidas pelo ambiente. Esses marcadores podem incluir características genéticas, diferenças no metabolismo ou a capacidade diferencial de um órgão se recuperar de agressões ambientais (Taningher et al., 1999). Diferenças genéticas na capacidade das células em repararem lesões no DNA causadas por agentes ambientais ou diferenças na capacidade de metabolização de agentes mutagênicos/carcinogênicos podem estar relacionadas a um risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias (Eubanks, 1994; Guenguerich, 2000).

Os dados do Projeto Genoma Humano trazem esperanças para a compreensão da interação entre os fatores genético e ambiental na suscetibilidade ao câncer, e podem levar a melhoria e simplificação dos métodos de diagnóstico de doenças genéticas, a novas estratégias de prevenção e tratamento das doenças. Recentemente, 57 genes CYPs ativos e 58 pseudogenes foram descobertos por iniciativas desse projeto, além

12 Olivieri, EHR Introdução

de permitirem a identificação molecular de mutações e polimorfismos genéticos que traduz-se para a saúde pública como possibilidade de caracterização da suscetibilidade individual ao câncer (Ingelman-Sundberg, 2005).

Polimorfismos Genéticos

Genes cujas variantes alélicas menos comuns exibem freqüências superiores a 1% são considerados polimórficos. O tipo mais comum de polimorfismo é a substituição de um único nucleotídeo (em inglês, single nucleotide polymorphism ou SNP). Estima-se a presença de, pelo menos, 60 mil SNPs nas regiões codificadoras do genoma humano (cSNPs). Devido à degeneração do código genético (diferentes códons codificam o mesmo aminoácido), alguns cSNPs não resultam em modificação do aminoácido codificado e são então classificados como sinônimos. Os cSNPs não-sinônimos podem resultar em substituições conservadoras (aminoácidos com propriedades físico-químicas semelhantes) ou não-conservadoras, estas últimas associadas a alterações estruturais e funcionais das proteínas codificadas (Eichler, 2006). Os polimorfismos genéticos denominados funcionais podem levar à perda ou ao ganho de função das proteínas codificadas, embora a perda de função seja mais freqüente (Ingelman-Sundberg, 2004a).

No âmbito da farmacogenética, há inúmeros exemplos de cSNPs em vias metabólicas (citocromo P450 ou CYP e N-acetiltransferase ou NAT), em transportadores (P-glicoproteína ou Pgp) e em receptores farmacológicos (beta-adrenérgicos, glicocorticóides). Entende-se como farmacogenética o estudo das

13 Olivieri, EHR Introdução

variabilidades na resposta aos medicamentos devido à hereditariedade, variabilidade atualmente explicada pelos polimorfismos genéticos (Landi et al., 1999, Suarez-Kurtz, 2004; Carlton et al., 2006).

Os polimorfismos são amplamente estudados na identificação de fatores genéticos que contribuam para a variabilidade observada entre indivíduos na resposta farmacológica, visando à individualização da terapia medicamentosa do câncer. Apesar dos avanços farmacológicos no tratamento do câncer, a resposta à quimioterapia é, na maioria dos pacientes, imprevisível; a escolha de protocolos de tratamento é frequentemente empírica; as doses são fixas e próximas da dose máxima tolerada; os efeitos tóxicos são comuns e, não raramente graves. A identificação de polimorfismos em vias metabólicas, transportadores e receptores de medicamentos permitem desenhar estudos clínicos dirigidos a grupos selecionados de pacientes que reúnam características farmacogenéticas preditivas de máxima resposta terapêutica com mínima toxicidade. Isto permite a redução do tempo, do custo, da incidência e gravidade das reações adversas durante o desenvolvimento clínico de novos fármacos (Ingelman-Sundberg, 2005).

Enzimas do biometabolismo e câncer

A maioria dos agentes carcinogênicos requer ativação metabólica antes de se ligarem às biomoléculas (DNA, RNA e proteínas). Assim, as variações nos processos de ativação e detoxicação de compostos químicos e drogas tem um papel crucial na carcinogênese (Eubanks, 1994). Distúrbios no equilíbrio desses processos podem

14 Olivieri, EHR Introdução

explicar a variabilidade na resposta individual à exposição destes compostos. A quantidade final efetiva de carcinógenos produzida depende da ação competitiva entre os mecanismos de ativação e detoxicação, envolvendo as enzimas que tomam parte nessas vias bioquímicas da célula (Georgiadis et al., 2004).

A maquinaria de metabolização xenobiótica possui dois tipos de enzimas: as de metabolismo oxidativo mediado ou de Fase I; e as enzimas conjugadas ou de Fase II. Muitos compostos são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas da Fase I, que são principalmente enzimas da superfamília do citocromo P450 (CYPs). As reações da Fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno (glutathiona, sulfato, glicose, acetato) pelas glutathiona-S-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos da Fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção (Nebert, 1991; Persson et al., 1995). O equilíbrio entre as enzimas que aumentam a toxicidade (ex., produto dos genes CYP1A1, CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1) ou inativam ou detoxificam (ex., GSTT1, GSTM1, NAT) os produtos químicos pode conferir sensibilidade individual diferenciada (Albertini, 1999).

A superfamília de genes do citocromo P450 (CYPs) representa uma das principais classes de biotransformação da Fase I, composta por mais de 500 isoenzimas. Tais monooxigenases participam tanto da biossíntese como da degradação de esteróides, ácidos graxos, prostaglandinas, aminas, ferormônios e metabólitos vegetais. Metabolizam ainda, inúmeras drogas e carcinógenos/mutágenos químicos, entre outros poluentes ambientais. Essas reações ocorrem, principalmente, no fígado; contudo existe expressão não hepática em menor grau por todo o organismo, incluindo intestino, pulmão e rim, entre outros. Os CYPs podem não apenas catalisar

15 Olivieri, EHR Introdução

diferentes reações oxidativas, como também metabolizar uma variedade de xenobióticos lipofílicos (Nebert, 1991; Lin, 2006; Nebert & Dalton, 2006).

Uma vez que muitas dessas enzimas têm expressão induzida, tanto o agente indutor como o mecanismo molecular de indução podem variar, tornando perigosa qualquer generalização. Muitas das substâncias que agem como indutoras são, em realidade, substratos para a enzima P450 que as induzem, estimulando assim seu próprio metabolismo, bem como o de qualquer outro composto que seja substrato da mesma enzima P450. Além disso, muitos compostos que induzem as enzimas P450 podem também induzir uma ou mais enzimas da Fase II (Rogers, 1994). Compostos endógenos relevantes durante o processo de diferenciação da célula transformada até o estágio maligno, também sofrem transformação pela família P450 (Rannug et al., 1995).

Dentre as enzimas denominadas de Fase II, envolvidas nos processos de desintoxicação, as glutatona transferases (GSTs) desempenham um papel predominante no metabolismo celular, bem como na modificação de compostos eletrofílicos reativos, tanto pela conjugação com as glutatona como também por ligação não covalente com vários agentes xenobióticos, incluindo carcinógenos e drogas citotóxicas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes na dieta alimentar e na fumaça dos cigarros, impedindo a ligação destes ao DNA (Strange & Fryer, 1999; Nakazato et al., 2003). Há evidências que variações no metabolismo de carcinógenos, causados por polimorfismos em genes da fase I, combinados com o genótipo nulo de genes da fase II, podem predispor um indivíduo ao desenvolvimento de câncer no trato aero-digestivo superior e pulmão, especialmente em fumantes (Bolt & Thier, 2006).

16 Olivieri, EHR Introdução

Os estudos caso-controle representam uma abordagem inicial e uma das principais fontes de evidências para a avaliação entre polimorfismos genéticos e exposição a agentes xenobióticos na determinação do risco relativo de desenvolvimento de cânceres comuns. Os estudos epidemiológicos modernos que avaliam os fatores genéticos associados à suscetibilidade ao câncer incluem determinações genotípicas baseadas na análise direta do DNA obtido principalmente do sangue periférico. Esta abordagem metodológica foi facilitada pelo desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, contornando as dificuldades metodológicas inerentes às determinações fenotípicas. Com estes avanços, a genotipagem dos polimorfismos de várias enzimas metabolizadoras de agentes xenobióticos tornou-se exequível e utilizada de forma crescente na avaliação da suscetibilidade ao câncer. A aplicação deste conhecimento básico permitirá identificar na população subgrupos de indivíduos com risco diferencial ao desenvolvimento de carcinomas que devem ser o alvo principal de campanhas de prevenção. No conjunto, estes dados poderão se mostrar de grande impacto, pois se sabe que a associação de vários produtos gênicos que atuam em diferentes vias de detoxicação de agentes carcinogênicos determina o perfil de suscetibilidade individual (Ingelman-Sundberg, 2005).

Enzimas de fase I - Família Citocromo P 450

P450 é o nome dado a uma classe de citocromos que são controlados por genes denominados CYPs (Nebert, 1991). Este nome se refere ao termo pigmento, que

17 Olivieri, EHR Introdução

originou o **P**, e ao pico de absorção de 450nm deste composto, medido por espectrofotometria (Omura & Sato, 1964; Remmer & Merker, 1965). A superfamília de genes do citocromo P450 codifica numerosas enzimas que catalisam uma notável variedade de reações químicas envolvendo um grande número de substratos. Todos os genes desta superfamília evoluíram a partir de um ancestral comum, há cerca de dois bilhões e meio de anos (Ingelman-Sundberg et al., 1999). Este é considerado o sistema biológico de catalização mais versátil conhecido (Robert et al., 2005).

Nos mamíferos, esse sistema enzimático encontra-se em todos os tecidos examinados, embora em maior abundância no tecido hepático (Rogers, 1994). Em nível celular é encontrado predominantemente no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias. No genoma humano há 57 genes codificadores de enzimas P450, incluídos em 18 famílias, e cerca de 6 deles estão envolvidos na codificação de enzimas que metabolizam compostos exógenos (Ingelman-Sundberg, 2004b; Nebert & Dalton, 2006). Os substratos para o CYP450 incluem vitaminas, esteróides, ácidos graxos, prostaglandinas, aminas e xenobióticos, tais como drogas (incluindo antibióticos), carcinógenos ambientais, antioxidantes, solventes, anestésicos, corantes, pesticidas, produtos derivados de petróleo, alcoóis, entre outros.

A maioria das reações inicia-se com a transferência de elétrons da NAD(P)H para o citocromo P450 NADPH redutase, no sistema microsomal ou para a ferredoxina redutase e, então, para o citocromo P450. Isso leva a uma ativação reduzida do oxigênio molecular, seguido da inserção de um átomo de oxigênio no substrato. Os citocromos podem não apenas catalisar diferentes reações oxidativas, como também metabolizar uma variedade de xenobióticos lipofílicos (Nebert, 1991; Lin & Lu, 1998) que conduzem à formação de compostos mais polares, mais

18 Olivieri, EHR Introdução

facilmente excretáveis diretamente, ou após conjugação com agentes hidrossolúveis, como o ácido glicurônico e a glutatona. A conjugação representa o processo de detoxificação, contudo grande parte dos compostos estranhos é convertida, mediado pelo CYP450, a produtos com poder aumentado de citotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade.

As isoenzimas P450 estão divididas em famílias, com base em sua relação evolutiva determinada pelo grau de homologia de genes individuais e, conseqüentemente pela composição dos aminoácidos nas proteínas. Os genes CYP1A1, 1A2, 1B1, 2D6, 2E1 e 3E4 são polimórficos. Devido a capacidade individual de metabolização das toxinas ser alterada por variantes alélicas, o polimorfismo genético das enzimas codificadas por estes genes tem sido proposto como biomarcador de suscetibilidade a carcinógenos ambientais e à toxicidade (Topic et al., 2000; Miller et al., 2001).

O Gene CYP1A1

O gene CYP1A1 está mapeado em 15q22-24 (Hildebrand et al., 1985) e possui 6311pb. Esse gene contém 7 éxons e 6 íntrons (Evans, 1993) (**Figura 1**). Até o presente, são conhecidos 15 SNPs que caracterizam as variantes alélicas: *1A, *1B, *1C, *2A, *2B, *2C, *3, *4, *5, *6, *7, *8, *9, *10, *11, sendo os polimorfismos mais estudados: o MspI (*2A) e o que leva a troca de aminoácidos Ile-Val (*2C) (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>) (**Tabela 1**).

19 Olivieri, EHR Introdução

Figura 1. Esquematização do gene CYP1A1 e alguns dos seus sítios de restrição (modificado de Kawajiri, 1999).

Tabela 1 - Nomenclatura e características do gene CYP1A1 e sua proteína.

Alelo	Proteína	Alteração nucleotídica	Denominação mais comum	Efeito
CYP1A1*1A	CYP1A1.1	-	Tipo selvagem	-
CYP1A1*1B	CYP1A1.1	-3219 C>T	-	-
CYP1A1*1C	CYP1A1.1	-3229 G>A	-	-
CYP1A1*2A	CYP1A1.1	3801 T>C (MspI)	M1	-
CYP1A1*2B	CYP1A1.2	2455 A>G; 3801 T>C	-	I462
CYP1A1*2C	CYP1A1.2	2455 A>G (Ile-Val)	M2	I462
CYP1A1*3	CYP1A1.1	3205 T>C	M3	-
CYP1A1*4	CYP1A1.4	2453 C>A	M4	T461
CYP1A1*5	CYP1A1.5	2461 C>A	-	R464
CYP1A1*6	CYP1A1.6	1636 G>T	-	M33
CYP1A1*7	CYP1A1.7	2346_2347 insT	-	fran shift
CYP1A1*8	CYP1A1.8	2414T>A	-	I448
CYP1A1*9	CYP1A1.9	2461C>T	-	R464
CYP1A1*10	CYP1A1.10	2500C>T	-	R477
CYP1A1*11	CYP1A1.11	2546C>G	-	P492

(Fonte: <http://www.imm.ki.se/CYPalleles>)

20 Olivieri, EHR Introdução

O polimorfismo detectado pela enzima de restrição MspI, abordado neste estudo, trata-se de uma transição T para C na posição 3801 (Spurr et al., 1987) e tem sido associado, experimentalmente, com o aumento da atividade catalítica (Landi et al., 1994).

A enzima CYP1A1 é considerada a principal enzima extra-hepática em humanos e está presente em muitos tecidos epiteliais (Bartsch et al., 2000). Está envolvida na ativação da maioria das classes de pró-carcinógenos do tabaco e encontra-se induzida em pulmão, em linfócitos e placenta após exposição aos HAP (Lin, 2006).

Polimorfismos no gene CYP1A1 têm mostrado aumento da atividade catalítica microsomal, por converter pró-carcinógenos, incluindo os HAPs, em aminas aromáticas (Bartsch et al., 2000).

A indução do CYP1A1 ocorre via ligação do composto indutor ao receptor de hidrocarbonetos de arila (AHR); o receptor ativa a transcrição de vários genes que codificam proteínas envolvidas na metabolização de xenobióticos (Kawajiri et al., 1993). A bioativação de vários HAPs é iniciada com a estimulação do receptor Ah e este, por sua vez, ativa a transcrição da P4501A1, epóxido hidrolase e outras enzimas (Robert et al., 2005). Tanto a atividade de catalisação quanto o modo de indução parecem ser altamente conservados em animais superiores, confirmando sua importante função fisiológica.

A frequência dos alelos do gene CYP1A1 é variada entre os diferentes grupos étnicos, como mostra a **Tabela 2**.

Tabela 2. Frequência do polimorfismo no gene CYP1A1 em diferentes grupos étnicos.

CYP1A1	CAUCASIANOS	ASIÁTICOS	
Selvagem CYP1A1*1A/ CYP1A1*1A	82,5%	42%	
Heterozigoto CYP1A1*1A/ CYP1A1*2A	16,5%	44%	
Homozigoto (mutado) CYP1A1*2A/CYP1A1*2A	1,2%	14%	

Fonte: Garte et al. (2001), com modificações.

Vários estudos indicam a associação entre as variantes do gene CYP1A1 e o aumento do risco para câncer de laringe (Kellermann et al., 1973; Gajecka et al., 2005) e tumores mais diferenciados (G1/G2) em câncer de laringe (Matthias et al., 2006), cavidade oral (Sugimura et al., 2006), renal e de uretra (Emery et al., 1978; Gahmberg et al., 1979; Kouri et al., 1982; Korsgaard et al., 1984), pulmão (Kawajiri et al., 1990; Hayashi et al., 1992), esôfago (Wu et al., 2002) e em leucemia (Voso et al., 2005).

A existência de diversos polimorfismos já detectados no CYP1A1 ressalta a necessidade de verificação dos haplótipos decorrentes das várias combinações possíveis e do impacto de cada um deles como moduladores da suscetibilidade ao câncer.

O Gene CYP1A2

O gene CYP1A2 está mapeado em 15q22-qter e está distribuído em 7 éxons e 6 íntrons (**Figura 2**). Os éxons 2, 4, 5 e 6 chegam a ser de 80 a 91% semelhantes nos genes CYP1A1 e CYP1A2, respectivamente (Landi et al., 1999). Seu produto é a O-dietilase fenacetina que possui 7,8 kilobases. Apresenta 34 SNPs que caracteriza as

22 Olivieri, EHR Introdução

variantes alélicas: *1A, *1B, *1C, *1D, *1E, *1F, *1G, *1H, *1J, *1K, *1L, *1M, *1N, *1P, *1Q, *1R, *1S, *1T, *1U, *2, *3, *4, *5, *6, *7, *8, *9, *10, *11, *12, *13E, *14, *15 e *16 (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>) (Tabela 3). As variantes abordadas neste estudo foram *1A (com a atividade enzimática normal), *1C e *1D. Os polimorfismos CYP1A2/A*1C e CYP1A2/B*1D ocorrem na região 5' do gene CYP1A2. No primeiro há uma substituição em ponto da base guanina (tipo selvagem) para a base adenina (tipo mutado) na posição -2964 (-2964G>A) (Nakajima et al., 1994a). No segundo, há uma deleção de uma timina na posição -1569 (-1569 delT) (Nakajima et al., 1999).

Figura 2. Esquematização do gene CYP1A2 e os sítios polimórficos estudados.

Tabela 3. Nomenclatura alélica do CYP1A2 e sua proteína.

Alelo	Proteína	Locus polimórfico	Efeito	Atividade Enzimática
CYP1A2*1A Selvagem	CYP1A2.1	Nenhum	-	Normal
CYP1A2*1B	CYP1A2.1	1545T>C	-	-
CYP1A2*1C	CYP1A2.1	-2964 G>A	-	Diminuída
CYP1A2*1D	CYP1A2.1	-1569 delT	-	-
CYP1A2*1E	CYP1A2.1	-740T>G	-	-
CYP1A2*1F	CYP1A2.1	-163C>A	-	Inducibilida

Sítio
polimórfico
Ddel
CYP1A2/A

23 Olivieri, EHR Introdução

aumentada				
CYP1A2*1G	CYP1A2.1	-740T>G; 1545T>C	-	-
CYP1A2*1H	CYP1A2.1	951A>C; 1545T>C	-	-
CYP1A2*1J	CYP1A2.1	-739T>G ; -163C>A	-	-
CYP1A2*1K	CYP1A2.1	-739T>G; -729C>T; 163C>A	-	Diminuído
CYP1A2*1L	CYP1A2.1	- 3860G>A; 2467delT; 163C>A; 5347T>C	- - - -	-
CYP1A2*1M	CYP1A2.1	-163C>A; 2159G>A	-	-
CYP1A2*1N	CYP1A2.1	- 3594T>G; 2467delT; 163C>A; 2321G>C; 5521A>G; 5347T>C	- - - - - -	-
CYP1A2*1P	CYP1A2.1	- 3594T>G; 2467delT; 733G>C; 163C>A; 2321G>C; 5521A>G; 5347T>C	- - - - - - -	-
CYP1A2*1Q	CYP1A2.1	- 2808A>C; 163C>A; 2159G>A	- - -	-
CYP1A2*1R	CYP1A2.1	- 3594T>G; 2467delT; 367C>T; 163C>A; 2321G>C; 5521A>G; 5347T>C	- - - - - - -	-
CYP1A2*1S	CYP1A2.1	- 3053A>G; 5347T>C	- - -	-
CYP1A2*1T	CYP1A2.1	- 2667T>G; 5347T>C	- - -	-

CYP1A2*1U	CYP1A2.1	678C>T; 5347T>C	-	-
CYP1A2*2	CYP1A2.2	63T>C	F21L	-
CYP1A2*3	CYP1A2.3	2385G>A; 5347T>C	D348N	Diminuído
CYP1A2*4	CYP1A2.4	2499A>T	I386F	Diminuído
CYP1A2*5	CYP1A2.5	3497G>A	C406Y	-
CYP1A2*6	CYP1A2.6	5090C>T	R431W	Diminuído
CYP1A2*7	CYP1A2.7	3534G>A	Defeito splicing	Diminuído
CYP1A2*8	CYP1A2.8	5166G>A; 5347T>C	R456H	Diminuído
CYP1A2*9	CYP1A2.9	248C>T	T83M	-
CYP1A2*10	CYP1A2.10	502G>C	E168Q	-
CYP1A2*11	CYP1A2.11	558C>A	F186L	Diminuído

24 Olivieri, EHR Introdução

CYP1A2*12	CYP1A2.12	634A>T	S212C	-
CYP1A2*13	CYP1A2.13	1514G>A	G299S	-
CYP1A2*14	CYP1A2.14	5112C>T	T438I	-
CYP1A2*15	CYP1A2.15	125C>G; 5347T>C	P42R	Diminuída
CYP1A2*16	CYP1A2.16	2473G>A; 5347T>C	R377Q	Diminuída

(Fonte: <http://www.imm.ki.se/CYPalleles>)

Este gene é induzido pelo 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) e pelo HPA. A atividade do CYP1A2 pode influenciar a suscetibilidade individual ao risco de câncer e a eficácia terapêutica de algumas drogas, pois muitos medicamentos podem inibir o gene CYP1A2 levando à toxicidade aguda. Também é induzido pela exposição a organoclorados (**Tabela 4**), à atividade física intensa e a dietas ricas em frituras e carnes cozidas em excesso (Loft et al., 2001).

Tabela 4. Distribuição tecidual e indutores dos genes CYP1A1 e CYP1A2.

CYP1A	Tecido	Indutores Enzimáticos
CYP1A1	Pulmão, placenta, linfócitos, laringe, rim, fígado fetal.	Fumaça de cigarro, bifenóis policlorinados, dioxina, flavonas, derivados do indol, UV
CYP1A2	Fígado e mucosa olfatória	Carnes cozidas em excesso, fumaça de cigarro, omeprazol, fenitoína, pancreatite crônica, bifenóis polibromanados, dioxina, organoclorados, atividade física intensa, dieta rica em frituras

Fonte: Landi et al. (1999), com modificações.

A descoberta das variantes alélicas do gene CYP1A2 foi relacionada a cânceres coloretal (Lang et al., 1994; Sachse et al., 2003), bexiga (Lee et al., 1994), pulmão (Kellermann et al., 1980), rim (Cheung et al., 1999) e pâncreas (Li et al., 2005).

25 Olivieri, EHR Introdução

Há evidências do seu envolvimento em interações medicamentosas (Flockhart & Tanus-Santos, 2002) e reações adversas a drogas (Rademaker, 2001), mas há poucos estudos na avaliação de suscetibilidade ao câncer. Entretanto, há evidências de que a atividade do gene CYP1A2 pode ser um fator de risco ao desenvolvimento de cânceres em tecidos que estão em contato com os carcinógenos (Pavanello et al., 2002).

O Gene CYP2E1

O gene CYP2E1 está mapeado em 10q24.3-qter (McBride et al., 1987) e contém 11413 pb e 9 éxons (Umeno et al., 1988). O gene CYP2E1 apresenta 13 SNPs que caracterizam as variantes: *1A, *1B, *1C, *1D, *2, *3, *4, *5A, *5B, *6, *7A, *7B e *7C (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>) (Tabela 5).

Tabela 5. Nomenclatura do CYP2E1, sua proteína e outras características.

Alelo	Proteína	Locus polimórfico	RFLP	Atividade Enzimática
CYP2E1*1A	CYP2E1.1	Nenhum	-	Normal
CYP2E1*1B	CYP2E1.1	9896C>G	TaqI-	-
CYP2E1*1C	CYP2E1.1	6 repetições em 5'	-	-
CYP2E1*1D	CYP2E1.1	8 repetições em 5'	DraI e XbaI	↑ ingestão de álcool
CYP2E1*2	CYP2E1.2	1132G>A	-	Reduzida
CYP2E1*3	CYP2E1.3	10023G>A	-	Normal
CYP2E1*4	CYP2E1.4	4768G>A	-	Normal
CYP2E1*5A	CYP2E1.1	-1293G>C; -1053C>T (c1>c2); 7632T>A	PstI+ RsaI- DraI-	-

26 Olivieri, EHR Introdução

CYP2E1*5B	CYP2E1.1	- 1293G>C; - 1053C>T (c1>c2)	RsaI- PstI+	-
CYP2E1*6	CYP2E1.1	7632T>A	DraI-	-
CYP2E1*7A	CYP2E1.1	-333T>A	-	-
CYP2E1*7B	CYP2E1.1	-71G>T; -333T>A	-	-
CYP2E1*7C	CYP2E1.1	- 333T>A; - 352A>G	-	-

(Fonte: <http://www.imm.ki.se/CYPalleles>)

O sítio polimórfico detectado pelas enzimas RsaI/PstI (CYP2E1*5B), localizado na região de regulação da transcrição diferencia o alelo CYP2E1*1A tipo selvagem (c1) do alelo raro CYP2E1*5B (c2). Este SNP encontra-se mapeado na região 5' que flanqueia o gene (Hayashi et al., 1991). A mudança de nucleotídeo afeta a ligação do fator de transcrição e altera a sua regulação, sugerindo uma explicação molecular para as diferenças interindividuais na atividade de oxidação de alguns substratos (Hayashi et al., 1991; Hirvonen et al., 1993). Essa alteração resulta em diferentes níveis de expressão de mRNA do CYP2E1. Enquanto Hayashi et al. (1991) associaram esse SNP com aumento da transcrição do gene ou ao risco de desenvolvimento do carcinoma oral (Liu et al., 2001), outros autores não observaram tal associação (Powell et al., 1998; Marchand et al., 1999; Matthias et al., 1999; Gajecka et al., 2005).

O CYP2E1 é o principal responsável pela ativação metabólica de muitos carcinógenos de baixo peso molecular, incluindo certas nitrosaminas, as quais podem estar envolvidas na carcinogênese de alguns tipos tumorais (Yang et al., 2005). A proteína CYP2E1 é uma das principais responsáveis pela oxidação do etanol, produzindo radicais livres reativos que podem iniciar a peroxidação lipídica e conseqüentemente influenciar na carcinogênese (Albano et al., 1991; Persson et al., 1993).

27 Olivieri, EHR Introdução

O gene CYP2E1 é expresso nos tecidos do trato aerodigestivo superior (Carriéri et al., 1996) e devido à sua função na ativação de pró-carcinogênicos, especialmente de N-nitrosaminas, é um excelente candidato na avaliação de risco de carcinomas de cabeça e pescoço.

Enzimas de fase II - Glutathiona-S- Transferases

As GSTs são importantes no processo do sistema de detoxificação celular. Essas enzimas pertencem a uma família de proteínas diméricas solúveis e multifuncionais que catalisam a reação de conjugação da glutathiona (GSH) com diferentes espécies de compostos eletrofílicos, impedindo a ligação destes ao DNA, e tornando-os mais facilmente excretáveis (Persson et al., 1995). Tais compostos eletrofílicos reativos podem ser resultantes ainda, de processos endógenos, iniciados, por exemplo, na respiração e em processos inflamatórios, ou ainda, por radiação ionizante com a produção de espécies reativas de oxigênio, incluindo radicais superóxido e hidroxila. Acredita-se que essas enzimas desempenham uma função protetora contra radicais livres (Taningher et al., 1999). Desempenham, também, papel na modulação da ativação de enzimas e proteínas importantes para determinadas funções celulares como o reparo a danos no DNA. As GSTs, estão envolvidas na detoxificação de vários carcinógenos potenciais do tabaco e outros hidrocarbonetos aromáticos (Engel et al., 2002; Zheng et al., 2002). A ativação do benzo [a] pireno resulta na transformação em 7,8-diol-9,10-epóxido, um conhecido substrato para o GSTM1 (Conforti-Froes, 2004). Vários quimioterápicos são também

28 Olivieri, EHR Introdução

substratos para os GSTs e, neste caso, a sua conjugação pode levar a uma diminuição do efeito e a ocorrência de resistência celular aos seus efeitos (Wormhoudt et al., 1999). É provável que diferenças hereditárias nas atividades dessas enzimas, decorrentes de polimorfismos genéticos, modulem o risco de câncer devido à exposição a agentes ambientais como a fumaça do cigarro, poluição e consumo de álcool (Vineis et al., 1999).

As glutionas transferases estão presentes na maioria dos organismos vivos, incluindo as bactérias, leveduras, fungos e plantas. A classificação destas enzimas é baseada na especificidade de substrato, seqüência de aminoácidos e comportamento cinético da enzima. Foram descritas sete classes distintas de GSTs solúveis, seis das quais são citosólicas e conhecidas como alfa, teta, mu, pi, kapa e zeta, sendo a outra classe ligada à membrana. A classe teta é a mais antiga, supondo-se que um gene ancestral teta sofreu duplicação precoce antes da divergência de fungos e animais. Duplicações posteriores originaram as outras classes de GSTs. São encontrados no citoplasma em microsomas e mitocôndrias de todas as células eucarióticas e procarióticas e são expressos em altos níveis no fígado, onde representam mais de 4% das proteínas solúveis totais. Ocorrem em menores concentrações em outros órgãos como pulmões e intestino delgado (McIlwain et al., 2006).

Entre as proteínas citosólicas, merecem destaque, com relação à suscetibilidade ao câncer, as GSTM1 (classe mu), GSTT1 (classe teta) e GSTP1 (classe pi).

As GSTM1 e GSTT1 possuem ação coordenada uma vez que detoxificam os muitos produtos das reações catalisadas pelos CYPs ou da peroxidação de lipídeos e

29 Olivieri, EHR Introdução

do DNA, gerados do estresse oxidativo. Estas duas GSTs são sujeitas a deleção completa dos genes que a codificam.

Além da atividade catalítica bem caracterizada, algumas dessas isoenzimas podem regular a atividade mitótica de algumas proteínas quinases (McIlwain et al., 2006). Dessa forma, a expressão diferenciada das isoenzimas GSTs pode influenciar a suscetibilidade, o prognóstico e o tratamento no câncer (McIlwain et al., 2006).

O Gene GSTM1 e o Gene GSTT1

O gene GSTM1 está mapeado em 1p13.3; é polimórfico na população humana, com dois alelos funcionais (GSTM1*a e GSTM1*b) que diferem em uma simples base no éxon 7 levando a uma substituição do aminoácido Lys pela Asn sem causar diferença funcional entre os alelos, e um alelo com atividade nula (GSTM1*0), respectivamente, sendo que aqueles funcionais têm a mesma eficácia metabólica.

O gene GSTT1 está mapeado em 22q11.2, e assim como o gene GSTM1, também é polimórfico na população humana, podendo apresentar fenótipo nulo por deleção. A deleção em homozigose do gene GSTM1 é observada em taxas que variam entre 20 a 70% nas diferentes populações investigadas, enquanto para o GSTT1 essa taxa é de 15 a 38% (Rossit & Conforti-Froes, 2000; Sharma et al., 2006). Indivíduos com ausência da capacidade de produzir as enzimas GSTM1 e GSTT1 acumulam muitos aductos de DNA pela ineficiência de excreção de carcinógenos ativados, tais como o 7,8-diol-9,10-epóxido.

30 Olivieri, EHR Introdução

Em uma proporção substancial da população caucasóide é encontrada a deleção homozigótica dos genes de GSTT1 e GSTT1, que resulta na falta da produção destas isoenzimas (Zheng et al., 2002). Um alelo não funcional GSTT1 (GSTT1*0) é o resultado de uma deleção completa ou parcial do gene e a enzima é completamente ausente em homozigose (GSTT1*0/0). A ausência da atividade enzimática em genótipos nulos foi comprovada por ensaios revelando mais de 94% de concordância entre fenótipo e genótipo (Zhong et al., 1991; Bruhn et al., 1998). Portadores de deleção homozigota são categorizados em fenótipo **nulo**, enquanto que aqueles que apresentam um ou outro alelo funcional são agrupados no fenótipo **positivo**.

Sprenger et al. (2000) delinearão uma metodologia baseada na PCR e seqüenciamento para discriminar indivíduos com genótipo GSTT1 com deleção homozigota (*0/0), heterozigotos (*A/0) e homozigotos selvagem (*A/A). Os autores encontraram em uma população caucasóide de 180 indivíduos uma distribuição de alelos que segue o equilíbrio de Hardy-Weinberg: 20% *0/0, 46% *A/0 e 34% *A/A. Comparações genótipo-fenótipo demonstraram uma herança codominante por um efeito dose-gene: amostras com os dois alelos ativos apresentavam uma atividade de expressão estatisticamente superior quando comparadas às amostras com presença de um ou nenhum alelo ativo.

CYPs e GSTs em Carcinomas de Cabeça e Pescoço

Relatos em literatura têm associado o CCECP a diferentes genes polimórficos envolvidos no metabolismo (Engel et al., 2002). Um resumo dos genes abordados neste estudo, correlacionando-os ao risco de desenvolvimento de CCECP, encontra-se na **Tabela 6**.

Há um número limitado de relatos correlacionando o gene CYP1A1 e o risco de desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço (Olshan et al., 2000; Hahn et al., 2002; Kao et al., 2002; Matthias et al., 2002; Gronau et al., 2003a; Ali et al., 2004; para revisão: Agundez, 2004; Gajecka et al., 2005; Matthias et al., 2006; Sugimura et al., 2006) e alguns apresentam resultados contraditórios. Sato et al. (2000) e Tanimoto et al. (1999) relataram que o genótipo CYP1A1*2A/CYP1A1*2A era mais freqüente nos pacientes com CCECP do que no grupo controle. Além disso, esses pacientes consumiam doses mais baixas de cigarro que os pacientes com genótipos CYP1A1*1A/CYP1A1*1A e CYP1A1*1A/CYP1A1*2A. Isso também foi observado por Nakachi et al. (1993), que sugeriram que isso poderia refletir uma relação dose-resposta da reação enzimática. Outra interpretação menos provável seria que indivíduos com o genótipo CYP1A1*2A/CYP1A1*2A teriam, geneticamente, um alto risco ao carcinoma independentemente do consumo do cigarro. O polimorfismo CYP1A1*2C foi significativamente diferente entre pacientes jovens com câncer de cavidade oral e lesões orais pré-cancerosas do que em controles (Kao et al., 2002). Georgiadis et al. (2004) encontraram uma relação direta entre o genótipo mutado CYP1A1*2A em indivíduos expostos ao tabaco com maiores níveis de aductos no DNA e aumento de células com morfologia aberrante.

32 Olivieri, EHR Introdução

Vários estudos indicam uma associação entre as variantes do gene CYP1A1 e o aumento do risco para câncer de laringe (Kellermann et al., 1973), cavidade oral (Tanimoto et al., 1999; Sato et al., 2000) e cabeça e pescoço (Park et al., 1997; Matthias et al., 1998; Olshan et al., 2000; Gattás et al., 2006).

Adicionalmente, estudos em CCECP referente à combinação dos genótipos CYP1A1*2C/CYP1A1*2C e GSTM1*nulo (deleção para a enzima metabolizadora glutationa S-transferase) revelaram riscos elevados, sendo maior que os relativos aos genes CYP1A1 e GSTM1 separadamente (Sato et al., 2000). Sreelekha et al. (2002) num estudo de pacientes indianos com câncer oral verificaram que a frequência de distribuição do genótipo CYP1A1*2A/CYP1A1*2A, GSTM1 e GSTT1 nulos era significativamente diferente dos controles podendo conferir um risco aumentado ao desenvolvimento deste câncer. Outros relatos não encontraram associação entre polimorfismos genéticos em CYPs e GSTs em carcinomas de cabeça e pescoço (Oude-Ophuis et al., 1998, Cheng et al., 2003).

Alberg et al. (2000) observaram uma associação entre os genótipos GSTT1*nulo e NAT2 (acetilação lenta) como fatores de risco associados à fumaça do cigarro em pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço.

33 Olivieri, EHR Introdução 34 Olivieri, EHR Introdução 35 Olivieri, EHR Introdução

Xie et al. (2004) estudaram os polimorfismos nos genes CYP1A1(CYP1A1*2C), GSTM1 e GSTT1 em pacientes com câncer de cavidade oral quanto ao consumo de tabaco numa população de Porto Rico. O risco de câncer de cavidade oral foi proporcional ao aumento do consumo de tabaco em pacientes com o genótipo GSTM1*positivo. Contrastando com alguns dados da literatura, os autores concluíram que o genótipo GSTM1*positivo estaria associado com o aumento do risco para o desenvolvimento de câncer oral em indivíduos com consumo de grandes quantidades de tabaco quando comparado ao genótipo GSTM1*nulo.

Gronau et al. (2003b) demonstraram que pacientes com câncer de laringe apresentavam genótipo GSTM1*nulo mais frequentemente do que os controles. A coincidência de genótipos GSTT1 e GSTM1 nulos era duas vezes mais freqüente em casos do que controles. Os autores sugeriram que a deficiência simultânea de várias enzimas de detoxificação aumenta o risco de CCECP em indivíduos expostos ao tabaco e álcool.

Em um estudo de 2005, Geisler et al., avaliaram os polimorfismos nos genes GSTT1, GSTM1, GSTP1 e no gene de reparo a danos no DNA (XRCC1), em pacientes diagnosticados com CCECP, quanto ao potencial uso como marcador prognóstico. Indivíduos com o gene GSTT1 funcional possuíam um risco três vezes maior de óbito por CCECP em relação ao grupo controle (OR, 3.4; 95% CI, 1.33-8.41) em análise pareada por idade e estágio da doença.

Não há relatos em literatura correlacionando os polimorfismos do gene CYP1A2 em CCECP. In vivo, a atividade do gene CYP1A2 encontra-se aumentada e sugere-se ser um fator de suscetibilidade para o câncer de bexiga, cólon e reto (Daly et al., 1994; Sachse et al., 2003); contraditoriamente, a baixa expressão desse gene

36 Olivieri, EHR Introdução

estaria associada com câncer testicular (Vistisen et al., 2004) e não há associação em relação ao câncer de mama (Long et al., 2006). Quando combinado o genótipo de alta atividade do CYP1A2 com um gene do biometabolismo de fase II (NAT2) acetilador lento, houve um aumento do risco para câncer de pulmão (Seow et al., 2001). Foi observado um aumento no risco de desenvolvimento do carcinoma de pâncreas em indivíduos CYP1A2*1D/ NAT1 acetilador rápido que consumiam altas quantidades de tabaco (Li et al., 2006).

Diferentes estudos abordam a influência do polimorfismo no gene CYP2E1 no desenvolvimento de câncer. Muitos resultados são contraditórios. Alguns autores descrevem associação significativa, quando considerados os fatores de risco como tabaco e álcool, em câncer de pulmão (Uematsu et al., 1994; Iizasa et al., 2005), nasofaringe (Hildesheim et al., 1997), carcinoma hepatocelular (Ladero et al., 1996), câncer de mama (Shields et al., 1996), cavidade oral (Hung et al., 1997), esôfago (Li et al., 2005), e coloretal (Kiss et al., 2000). Enquanto outros falham em mostrar essa relação em câncer de pulmão (Hirvonen et al., 1992; Kato et al., 1992; Sugimura et al., 1995; Watanabe et al., 1995; London et al., 1996), carcinoma hepatocelular (Kato et al., 1995; Wong et al., 2000), câncer urotelial (Anwar et al., 1996; Farker et al., 1998), cabeça e pescoço (Matthias et al., 1998; Neuhaus et al., 2004), células escamosas do esôfago (Lucas et al., 1996); carcinoma gástrico (Kato et al., 1995), de próstata (Murata et al., 2001) ou cérvix (Kim et al., 2000). Foram relatados dados contraditórios, descrevendo um efeito protetor do alelo variante no risco de desenvolvimento do tumor (Persson et al., 1993; Lê Marchand et al., 1998; Tan et al., 2000).

O alelo selvagem CYP2E1*1A foi descrito primeiramente como associado ao risco aumentado em câncer de pulmão e fígado (Persson et al., 1993; Yu et al., 1995).

37 Olivieri, EHR Introdução

Entretanto, novos estudos não demonstraram associação entre esse alelo e o câncer (Ladero et al., 1996; London et al., 1996), inclusive quando este foi associado a hábitos tabagista e etilista (Morita et al., 1997). O alelo CYP2E1*5B foi descrito como raro em populações caucasóides européias e afro-americanas, mas apresentou maior incidência em chineses (Hayashi et al., 1991; Stephens et al., 1994). Esse alelo foi associado ao CCECP em indivíduos fumantes e etilistas, tendo maior incidência em pacientes com carcinoma de faringe (Bouchardy et al., 2000). Contraditoriamente, alguns relatos sugerem uma associação na redução do risco de desenvolvimento de câncer (Lê Marchand et al., 1998; Lin & Lu, 1998).

Os estudos caso-controle representam uma abordagem inicial e uma das principais fontes de evidências para a avaliação entre polimorfismos genéticos e exposição a agentes xenobióticos na determinação do risco relativo de desenvolvimento de cânceres comuns.

A aplicação deste conhecimento básico permitirá a identificação de subgrupos de indivíduos com risco diferencial ao desenvolvimento de carcinomas que devem ser o alvo principal de campanhas de prevenção. No conjunto, estes dados poderão se mostrar de grande impacto, pois se sabe que a associação de vários produtos gênicos que atuam em diferentes vias de detoxicação de agentes carcinogênicos determina o perfil de suscetibilidade individual.

Olivieri, EHR Material e Métodos 40 Entrevista/questionário epidemiológico

As informações epidemiológicas foram obtidas por entrevista e preenchimento de um questionário com dados sobre tabagismo, etilismo, dados sócio-demográficos e história familiar de câncer (**Anexo 1**). Este estudo faz parte de uma pesquisa maior realizada em colaboração com o Dr. Luiz Paulo Kowalski, Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP e com a Dra Marcília de Araújo Medrada Faria, Departamento de Ética e Legislação Trabalhista, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. Foram utilizados dados e amostras obtidos anteriormente em estudo do tipo caso-controle de base hospitalar sob título “Epidemiologia molecular dos carcinomas de vias aéreas digestivas superiores”, aprovado pelo Comitê de Ética Médica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, SP (**Anexo 2**). Os termos de Consentimento Livre e Esclarecido encontram-se nos arquivos dos referidos Hospitais. **Caracterização da Amostra**

Este estudo utilizou uma abordagem do tipo caso-controle de base hospitalar. Foram coletadas amostras de sangue periférico de 156 pacientes (**Anexo 3**) com idade entre 22-86 anos com diagnóstico confirmado de CCECP de vias aéreas digestivas superiores (cavidade oral, laringe ou faringe), sem tratamento químico ou radioterápico, classificados segundo a OMS (CID-10). Desses, 58 (37%) apresentavam carcinomas de cavidade oral, 78 (50%) faringe e 20 de laringe (13%).

O grupo controle

Olivieri, EHR Material e Métodos 41

foi constituído por 145 indivíduos entre 24-86 anos, confirmados como portadores de outras enfermidades que não câncer e sem história ou suspeita de câncer de vias digestivas superiores (**Anexo 4**). Primeiramente, as amostras foram separadas de forma global (sem pareamento por idade e sexo) e os cinco polimorfismos foram avaliados segundo os resultados da análise de genotipagem. Na comparação dos genótipos entre os diferentes sítios anatômicos, os grupos casos e controles foram pareados por idade e sexo. O limite para o pareamento entre os indivíduos foi de ± 2 anos. Para a análise estatística, os pacientes foram agrupados em três diferentes grupos, segundo a localização anatômica: (1) cavidade oral: retromolar, palato duro, gengiva, língua, soalho de boca, borda da língua e mucosa bucal; (2) laringe: cordas vocais, supraglote, epiglote e glote; (3) hipofaringe (seio piriforme), orofaringe (amígdala ou tonsila, base da língua e palato mole) e nasofaringe. A classificação histopatológica foi realizada de acordo com a “WHO International Classification of Tumors” (1990). O estadiamento clínico foi determinado pelo estadiamento TNM do câncer (AJCC, 1998).

Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído a partir do sangue periférico (5-10 mL). O sangue colhido foi acondicionado com anticoagulante, solução estéril de EDTA 6% , e tratado com tampão de lise de células vermelhas (RCLB pH 7,6 1X: 10 mM de Tris; 5 mM de MgCl₂ e 10 mM de NaCl), três vezes. Após cada lavagem com este tampão, as

Olivieri, EHR Material e Métodos 42

amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por trinta minutos a fim de se eliminar as hemácias.

Após este primeiro procedimento, isolou-se a papa leucocitária e o sedimento foi ressuspenso em 500 µL de tampão de lise de células brancas (75 mM de NaCl; 24 mM de EDTA pH 8,0 e 2% de SDS). A lise celular foi seguida pela adição de proteinase K (SIGMA) a uma concentração final de 200 µL/mL e o material foi incubado à 37°C por 12 horas.

Para a extração de proteínas e ácidos graxos, liberados juntamente com o DNA após o rompimento dos leucócitos, utilizou-se o tratamento com solventes orgânicos (fenol-clorofórmio). Adicionaram-se 500 µL de solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizou-se por um minuto seguido da centrifugação a 13000 rpm por trinta minutos. O sobrenadante foi transferido e repetiu-se esta lavagem mais duas vezes. Em seguida, foram acrescentados ao sobrenadante, 500 µL de clorofórmio, para eliminar os resquícios do fenol, e procedeu-se a última centrifugação a 13 000rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi novamente isolado e adicionaram-se 50 µL de acetato de amônio 7M e etanol absoluto gelado. O DNA foi precipitado após aproximadamente 16 horas a -20°C. O material foi centrifugado a 14 000 rpm a 4°C e o álcool foi descartado.

O sedimento foi seco e o DNA foi posteriormente ressuspenso em um volume adequado de água ultrapura estéril. Após a quantificação em espectrofotômetro, 200-500ng de DNA foram utilizados nas diferentes reações de amplificação pela reação em cadeia da polimerase. Polimorfismos específicos dos genes CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 foram selecionados para este estudo

Olivieri, EHR Material e Métodos 43

(Tabela 7). Os polimorfismos de um único nucleotídeo dos genes da família CYP foram identificados pela análise de RFLP conforme detalhado na Tabela 8.

Tabela 7. Localização cromossômica, iniciadores e condições da PCR (reação em cadeia da polimerase) dos respectivos genes.

Gene	Localização cromossômica	Método de genotipagem	Iniciadores	Condições da PCR
------	--------------------------	-----------------------	-------------	------------------

CYP1A1	15q22-15q24	PCR - RFLP	5'-CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT-3' 5'-TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT-3'	95° - 10' 40 ciclos: 95° - 1' 60° - 1' 72° - 1' 72° - 7' 4° - ∞
CYP1A2	15q22-qter	PCR-RFLP	CYP1A2/A P1 5' GCT ACA CAT GAT CGA GCT ATA C 3' P2 5' CAG GTC TCT TCA CTG TAA AGT TA 3'	94° - 10' 35 ciclos: 94° - 1' 52° - 1' 72° - 3' 72° - 7' 4° - ∞
			CYP1A2/B P3 5' TGA GCC ATG ATT GTG GCA TA 3' P4 5' AGG AGT CTT TAT GGA CCC AG 3'	94° - 10' 45 ciclos: 94° - 1' 54° - 1' 72° - 1' 72° - 7' 4° - ∞
CYP2E1	10q24.3-qter	PCR-RFLP	RsaI (out) 5'- TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3' 5'- CCAGTCGAGTCTACATTGTCA- 3' RsaI (in) 5'- GGTGCAGTGTTAGGTGCAGC- 3' 5'TTCATTCTGTCTTCTAACTGG- 3'	94° - 10' 35 ciclos: 94° - 1' 58° - 1' 72° - 1' 72° - 7' 4° - ∞
GSTM1	1p13.1-1p13.3	PCR multiplex	GSTM1: F: 5'- GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G - 3' R: 3'- GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C - 5'	94° - 10' 40 ciclos 94° - 1'

Olivieri, EHR Material e Métodos 44

54° - 1` 72° - 2` 72° -

7 ⁺ 4 ^o - ∞	GSTT1	22q11.2- 22q11.23	PCR multiplex	CYP1A1 (controle interno) : F: 5'- GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT - 3' R: 3'- CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC - 5' GSTT1: F: 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC - 3' R: 3'- TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA -5'
--------------------------------------	--------------	----------------------	------------------	---

Tabela 8. Enzima de restrição, sítio de corte e tamanho (pb) dos fragmentos observados na análise de RFLP.

Gene	Enzima de restrição e sítio de corte	Quantidade de enzima utilizada	Padrão dos fragmentos
CYP1A1	Msp I : 5` ... C▼CGG ...3` 3` ... GGC▲C ...5`	10U	340pb 200pb 140pb
CYP1A2/A	Dde I : 5` ... C▼TNA ...3` 3` ... AANT▲C ...5`	10U	596pb 464pb 132pb
CYP1A2/B	Nde I : 5` ... CA▼TATG ...3` 3` ... GTAT▲AC ...5`	30U	167pb 149pb 18pb
CYP2E1	Rsa I : 5` ... GT▼AC...3` 3` ... CA▲TG...5`	30U	300pb 250pb 50pb

Detecção das variantes alélicas do gene CYP1A1

O polimorfismo estudado do gene CYP1A1 refere-se a uma substituição de T para C na posição 3801 do gene (3801T>C). Esta substituição cria um sítio polimórfico do tipo RFLP detectado pela endonuclease de restrição MspI. Este polimorfismo do gene CYP1A1 apresenta duas variantes alélicas: *1A para ausência do sítio polimórfico e *2A para a presença. Os três genótipos possíveis são denominados Olivieri, EHR Material e Métodos 45

CYP1A1*1A/CYP1A1*1A para o homocigoto predominante (*1A/*1A); um indivíduo homocigoto para o alelo raro possui genótipo **CYP1A1*2A/CYP1A1*2A** (*2A/*2A) e o indivíduo de genótipo **CYP1A1*1A/CYP1A1*2A** (*1A/*2A) é heterocigoto (Brooks et al., 1989).

Para a análise deste RFLP MspI, utilizou-se a PCR para a amplificação de um fragmento de 340pb. Os oligonucleotídeos utilizados estão apresentados na **Tabela 7** (Gustason et al., 1987). Aproximadamente 200ng de DNA genômico foram amplificados numa reação de 25µL contendo 10mM de Tris-HCL pH 8,0; 50mM de KCl; 1 mM de MgCl₂; 400 ng de cada iniciador; 200mM de cada dNTP e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen - Life Technologies). As reações foram processadas num termociclador PTC200 (MJ Research) e segundo as condições apresentadas na **Tabela 7**. Após a avaliação da origem e especificidade do produto amplificado pela eletroforese em gel de agarose a 1%, os fragmentos amplificados foram clivados com 10U da enzima MspI a 37°C, por 24 horas (**Tabela 8**). Após a clivagem e eletroforese em gel agarose a 2%, identificam-se os genótipos *1A/*1A caracterizado pela ausência deste sítio de restrição e uma banda de 340pb; *2A/*2A caracterizado pela presença do sítio de restrição e dois fragmentos, um de 200bp e um de 140pb. Os indivíduos heterozigotos apresentam os três fragmentos (**Figura 3**).

Olivieri, EHR Material e Métodos 46

340 pb

200 pb

140 pb

MM: marcador de tamanho

molecular

Figura 3. A parte superior da figura mostra o cromossomo 15 no qual está mapeado o gene CYP1A1 (q22-24) e a seqüência de nucleotídeos amplificada pela PCR. Em **azul** estão destacados os iniciadores e em **vermelho** o polimorfismo reconhecido pela MspI. Abaixo da seqüência de nucleotídeos estão indicados o tipo de polimorfismo e o sítio de reconhecimento da enzima de restrição. A parte inferior à esquerda apresenta um esquema dos possíveis genótipos visualizados após o corte com a enzima de restrição. À direita está uma foto em gel de agarose 2% correspondendo aos genótipos do esquema. Foi utilizado o marcador de tamanho molecular de 100pb.

Transição: T C

Olivieri, EHR Material e Métodos 47

Detecção das variantes alélicas do gene CYP1A2

Para o gene CYP1A2, foram analisados dois RFLPs diferentes na porção 5'. A variante alélica CYP1A2/A apresenta uma substituição da base G para A (-2964G>A). A variante CYP1A2/B apresenta uma deleção de **T** na posição -1569. Estas variantes foram detectadas pela análise de PCR-RFLP utilizando as enzimas de restrição DdeI e NdeI, respectivamente.

Para a análise destes RFLPs, utilizou-se a PCR para amplificação dos fragmentos e posterior detecção dos genótipos: CYP1A2/A, utilizando os

iniciadores P1 e P2 e CYP1A2/B, os iniciadores P3 e P4 (**Tabela 7**). Os reagentes para amplificação foram os mesmos citados anteriormente para o gene CYP1A1. As condições de amplificação da PCR estão descritas na **Tabela 7**. Os fragmentos amplificados foram digeridos com enzimas de restrição apropriadas (**Tabela 8**) a 37°C por 24 horas e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% para a genotipagem do CYP1A2/A. Para o gene CYP1A2/B as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 6% e coloração por nitrato de prata.

Os três genótipos possíveis para o CYP1A2/A são denominados:

CYP1A2*1A/CYP1A2*1A, para o indivíduo homozigoto predominante que não possui o sítio de reconhecimento da enzima DdeI e apresenta um fragmento com 596pb após a clivagem; **CYP1A2*1C/CYP1A2*1C**, para o indivíduo homozigoto para o alelo raro pois a substituição de base cria um sítio de reconhecimento para a DdeI e gera dois fragmentos de 464pb e 132pb após a clivagem. O indivíduo de genótipo **CYP1A2*1A/CYP1A2*1C** é heterozigoto e possui os três fragmentos (**Figura 4**).

Olivieri, EHR Material e Métodos 48

As variantes alélicas do gene CYP1A2/B são denotadas com a nomenclatura CYP1A2*1A ou CYP1A2*1D segundo a presença ou não do sítio de restrição para a enzima NdeI, respectivamente. A anotação **CYP1A2*1A/CYP1A2*1A** representa o indivíduo homozigoto predominante com a presença do sítio e o fragmento amplificado possui 149pb. O genótipo raro (mutado) **CYP1A2*1D/CYP1A2*1D** não possui o sítio de reconhecimento da enzima de restrição, apresentando um fragmento de 167pb e o genótipo heterozigoto (**CYP1A2*1A/CYP1A2*1D**) mostra ambos os fragmentos (167pb e 149pb). Geralmente, o fragmento menor de 18pb resultante da presença do sítio não é visualizado após a eletroforese (**Figura 5**).

Olivieri, EHR Material e Métodos 49

132pb

GENÓTIPOS

CYP1A2/A

Figura 4. A parte superior da figura mostra o cromossomo 15 no qual está mapeado o gene CYP1A2/A (15q22-24) e a seqüência de nucleotídeos amplificada pela PCR. Em **azul** estão destacados os iniciadores e em **vermelho** o polimorfismo reconhecido pela DdeI. Abaixo da seqüência de nucleotídeos estão indicados o tipo de polimorfismo e o sítio de reconhecimento da enzima. A parte inferior à esquerda mostra um esquema dos possíveis genótipos visualizados após o corte com a enzima de restrição. À direita está uma foto em gel de agarose 2% correspondendo os genótipos do esquema. Foi utilizado marcador de tamanho molecular de 100pb. **q22-qter MM:** marcador de tamanho

Transversão: G ↓ A Molecular

596pb

DdeI: C ↓ TNAA

464pb

***1A/*1A *1A/*1C *1C/*1C**

CCromossomo 155

Olivieri, EHR Material e Métodos 50

167pb

149pb

q22-q

Deleção:T

NdeI:CA↓TATG

Figura 5. A parte superior da figura mostra a localização do CYP1A2/B (15q22-24) e a seqüência de nucleotídeos amplificada pela PCR. Em azul estão destacados os iniciadores e em vermelho polimorfismo reconhecido pela NdeI. Abaixo da seqüência de nucleotídeos é mostrado o tipo de polimorfismo e o sítio de corte da enzima. A parte inferior à esquerda apresenta um esquema dos possíveis genótipos visualizados após o corte com a enzima de restrição. À direita está uma foto em gel de poliacrilamida 6% correspondendo aos genótipos do esquema. Foi utilizado marcador de tamanho molecular de 100pb.

*1A/*1A *1A/*1D *1D/*1DMM: marcador de tamanho

molecular

GGEENNÓÓTTIIPPOOSS

oCCromssomo155

CYP1A2/B

tNdeI/NdeI1569delTdelTOlivieri, EHR Material e Métodos 51

Detecção das variantes alélicas do gene CYP2E1

O polimorfismo estudado do gene CYP2E1 apresenta-se na região 5' flanqueadora do gene e refere-se a uma transição de C para T na posição -1053. Esta substituição exclui o sítio de restrição detectado pela endonuclease RsaI. Este polimorfismo apresenta duas variantes alélicas: **c1** para presença do sítio polimórfico (alelo selvagem) e **c2** para a ausência do sítio (alelo raro). Os três genótipos possíveis são denominados **c1/c1** para o homocigoto predominante; um indivíduo homocigoto para o alelo raro possui genótipo **c2/c2** e o indivíduo de genótipo **c1/c2** é heterocigoto (Watanabe et al., 1990; Gao et al., 2002).

Inicialmente, um conjunto de iniciadores externos (RsaI - out) foi utilizado na PCR para detecção do polimorfismo RsaI na região reguladora do gene, resultando na amplificação de um fragmento de 412 pares de base. Para amostras de baixa qualidade de amplificação, foi utilizada a "nested" PCR, uma PCR secundária a partir do produto da primeira PCR, e assim um segundo conjunto de iniciadores internos (RsaI - in) (**Tabela 7**) resultaram na amplificação de um fragmento de 300 pares de base (Wong et al., 2000; Nishimoto et al., 2002). Para ambas as reações, aproximadamente 200ng de DNA genômico foram amplificados num volume final de 25µL contendo 10mM de Tris-HCL pH 8,0; 50mM de KCl; 1 mM de MgCl₂; 400 ng de cada iniciador; 200mM de cada dNTP e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen - Life Technologies). As reações foram processadas num termociclador PTC200 (MJ Research) e estão apresentadas na **Tabela 7**. Após a avaliação da origem e especificidade do produto amplificado pela eletroforese em gel de agarose a 1%, os fragmentos amplificados foram clivados com 30U da enzima RsaI à 37°C, por 24 horas (**Tabela 8**). Após a

Olivieri, EHR Material e Métodos 52

clivagem e eletroforese em gel agarose a 2%, identificam-se os alelos **c1** caracterizados pela presença deste sítio de restrição e duas bandas, uma de 250 pb e outra de 50pb; o genótipo **c2** caracterizado pela ausência do sítio de restrição e apenas um fragmento de 300pb. Os indivíduos heterocigotos apresentaram os três fragmentos (**Figura 6**).

Olivieri, EHR Material e Métodos 53

molecular

MM: marcador de tamanho

q24.3-qter

CCromossomo 100

CCYYP22E1

```
ccagtcgagctacattgtcagttctcacctcgaggggtgccaaaaccagaggggaagcaaaggcccctgaagc
ctctgccagagggccaacgccccttcttggtcaggagaggtgcagtgttaggtagcacaaccaatgacttgctatgt
ggctaataaattgtcaagagaaaaactgggttagaatgcaatatatagtagtagtctcattttgtataatacaagt
```


atagaatggcataactcaaaatccaagtgattggctggattgtaaatactttttttcttcatttctcatcatatcttatt
atacataagattcattgtaataataaaag**gtac**aaaattgcaacctatgaattaagaacttctatatattccagtaga
agacagaatgaa

Figura 6. A parte superior da figura mostra o cromossomo 10 no qual está mapeado o gene CYP2E1 (q24.3-qter) e a seqüência de nucleotídeos amplificada pela PCR. Em **azul** estão destacados os iniciadores e em **vermelho** o polimorfismo reconhecido pela RsaI. Abaixo da seqüência de nucleotídeos estão indicados o tipo de polimorfismo e o sítio de reconhecimento da enzima de restrição. A parte inferior à esquerda apresenta um esquema dos possíveis genótipos visualizados após o corte com a enzima. À direita está uma foto em gel de agarose 2% correspondendo os genótipos do esquema. Foi utilizado marcador de tamanho molecular de 100pb.

Transição: T C

RsaI: GT ↓ AC

c1/c2 c1/c1 c2/c2

GENÓTIPOS

250pb

50pb

300pb

RRssaaI

-1053 T → C

Olivieri, EHR Material e Métodos 54

Detecção das variantes alélicas dos genes GSTM1 e GSTT1

As análises dos polimorfismos genéticos dos genes GSTM1 e GSTT1 foram determinadas simultaneamente com o uso da PCR-multiplex, onde o gene GSTM1 e o gene GSTT1 foram amplificados pelos iniciadores descritos na **Tabela 7**. A PCR foi realizada em um volume final de 25µL contendo 10 mM Tris HCl pH 8.3; 50 mM KCl; 1.0 mM MgCl₂; 5% DMSO; 5.0 mM de cada dNTP; 50-200mg de DNA genômico; 1.5 unidades de Taq DNA polimerase (Life Technologies); 50mM de cada oligonucleotídeo. As condições de amplificação estão apresentadas e o produto da PCR foi analisado após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. A presença dos genes GSTM1 e GSTT1, em cada indivíduo, é determinada pela presença de bandas de 218 (GSTM1) e 460 (GSTT1) pares de base e uma banda de 312 (CYP1A1) pares de base corresponde ao controle interno que caracteriza a positividade da reação em cadeia da polimerase. As

Figuras 7 e 8 apresentam as regiões genômicas amplificadas na investigação dos locos GSTM1 e GSTT1 e a visualização do perfil de bandas.

CCr omosssomo 1

GSTT1

CCrromossomo 2222

Figura 7. A parte superior da figura mostra o cromossomo 1 no qual está mapeado o gene GSTM1 (p13.3) e a seqüência de nucleotídeos amplificada pela PCR. Na parte inferior, encontra-se o cromossomo 22 no qual está mapeado o gene GSTT1 (q11.12) e a seqüência de nucleotídeos amplificada pela PCR. Em azul estão destacados os iniciadores utilizados na reação.

GSTM1

cttgggctcaaataacggtggagggtcaaggacatcatagacgagaaaaatctcaaaaagtgatctgcagaaggccaagaatatgtgggctggaa
cctccataacacgtgaagcaaacagatctcatcccatatcactcctcttacctgtttcctgcaaacatggccgctccccagaaactctgagta
gagcttagcttttcaggagttc

Olivieri, EHR Material e Métodos 56

GSTT1 nulo: linhas 8, 9 e 12

GSTM1nulo/ GSTM1+/ GSTM1nulo/ GSTM1+/ GSTT1nulo GSTT1+ GSTT1+ GSTT1nulo
GGEENNÓÓTTIIPPOOSS

460pb – GSTT1

312pb – CYP1A1

(Controle interno)

Figura 8. Esquema dos possíveis genótipos visualizados após a PCR-Multiplex para os genes GSTM1 e GSTT1. Na parte inferior da figura são visualizadas duas fotos em gel de agarose 1,5% correspondendo os genótipos do esquema. Foi utilizado marcador de tamanho molecular de 100pb.

218pb – GSTM1

GSTM1 nulo: linhas 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11 e 13

GSTM1 e GSTT1 nulos: linhas 8 e 9

MM: Marcador de tamanho molecular

MM 1 2 3 4 5 6 7 8

MM 9 10 11 12 13 14 15 16

Olivieri, EHR Material e Métodos 57

Análise estatística

As diferenças entre cada variável do estudo foram analisadas utilizando o Teste de Wilcoxon & Mann-Whitney e o Teste t de Student, para amostras independentes e, quando não atendiam, para o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para verificar associação entre os grupos e a variável categórica de interesse, foram utilizados o teste de hipótese de frequências - Teste chi-quadrado (χ^2) ou o Teste exato de

Fisher, dependendo da casuística. Na comparação entre os três grupos com variáveis numéricas, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) ou o Teste de Kruskal Wallis, quando a pressuposição de normalidade e igualdade entre as variâncias dos grupos não foram iguais. Para comparações múltiplas entre os grupos, utilizou-se o Teste de Dunn. Em todas as análises, foram considerados 95% de significância ($\leq 0,05$) e Odds Ratio (OR). Foram considerados grupos com poder estatístico aqueles que apresentaram $n > 3$ observações.

Todas as análises foram realizadas pelo software InStat (GraphPad InStat version 3.0, GraphPad Software, San Diego, Califórnia - USA) e pelo software SPSS for Windows XP v.12 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Olivieri, EHR Material e Métodos 58

Agrupamentos Genotípicos - Software NeoGene Analysis

Nos estudos com polimorfismos genéticos, muitas vezes não se encontram resultados satisfatórios na associação genótipo versus fenótipo, pois as análises comparativas dos genes são realizadas individualmente. Dessa forma, além das análises estatísticas pelo Teste Exato de Fisher e/ou χ^2 , os dados foram tabulados e compilados no programa Neogene Analysis, que tem como característica principal, permitir o agrupamento de genótipos, formando assim classes genotípicas que podem ser mais informativas do que os polimorfismos individuais. O programa compara os genótipos determinados nos casos e controles com os existentes na classe de referência, e identifica as combinações de cada indivíduo. A classe de referência, que deve previamente ser informada ao programa, é formada a partir da análise combinatória (permutação) do genótipo dos seis polimorfismos estudados.

Este programa é um sistema rápido, que atende as necessidades do usuário, economizando tempo e evitando processos manuais de análise combinatória. O programa NeoGene Analysis foi desenvolvido em Linguagem Delphi 7.0, após estruturação modelada em DER (Diagrama de Entidade/Relacionamento) pelo nosso grupo (Marchi F; Rainho CA; Rogatto SR - programa disponibilizado para download após solicitação e análise do grupo).

O sistema inicia-se quando o usuário informa quais genes serão analisados, pela opção Nova Análise, no qual são selecionadas as opções SIM e NÃO para definição de quais genes serão habilitados e/ou desabilitados, respectivamente, e qual o tipo de análise combinatória desejada (2x2, 3x3, 4x4 e assim por diante - limite de oito genes) (**Figura 9**).

Olivieri, EHR Material e Métodos 59

Na etapa seguinte, um gerador de classes permite que todas as combinações de genes sejam criadas pelo programa (**Figura 10**). É possível também, que sejam carregadas classes pelo sistema de um arquivo externo (p.ex., extensão.xls). Após ser carregada, a tabela de análise pode então ser iniciada, com probabilidades e combinações gerando resultados de agrupamentos genotípicos, onde posteriormente avaliam-se quais seqüências combinatórias são mais ou menos frequentes entre os grupos amostrais analisados (**Figura 11**).

O programa finaliza a análise gerando uma tabela de informações, a qual pode ser salva em formato “.xls” (**Figura 12**).

Figura 9. Representação da janela do programa NeoGene Analysis na fase de escolha da combinação e dos genes que serão analisados.

Olivieri, EHR Material e Métodos 60

Figura 10. Janela do programa NeoGene Analysis na opção Gerador de Classes no qual são realizadas todas as combinações possíveis entre os genes.

Figura 11. Última janela gerada pelo programa NeoGene Analysis com os resultados obtidos da análise combinatória entre os grupos.

Olivieri, EHR Material e Métodos 61

Figura 12. Resumo dos resultados gerados pelo programa.

A **Tabela 9** apresenta um resumo dos parâmetros utilizados no programa NeoGene Analysis e a nomenclatura reduzida para a definição e identificação das classes genotípicas.

Tabela 9. Nomenclatura NeoGene Analysis.

Classes de referência	Ordem das combinações	Genótipos	Combinações
As classes de referência representam as combinações possíveis dos genótipos	1° CYP1A1	S = selvagem	Ex: H S M M P N CYP1A1: heterozigoto CYP1A2/A: selvagem CYP1A2/B: mutado CYP2E1: mutado GSTM1: positivo GSTT1: nulo
	2° CYP1A2/A		
	3° CYP1A2/B		
	4° CYP2E1		
	5° GSTM1		
6° GSTT1	H = heterozigoto		
	M = mutado		
	P = positivo		
	N = nulo		

Olivieri, EHR Material e Métodos 62

Método de Análise dos Resultados

Algumas variáveis do questionário epidemiológico ou as analisadas nos prontuários dos pacientes não puderam ser obtidas para todos os casos e controles. Para a análise estatística, os grupos foram pareados por idade e sexo, exceto na análise referente ao consumo de tabaco e álcool. O consumo de tabaco foi definido nos casos onde os pacientes responderam positivamente ao consumo corrente ou regular de tabaco por mais de um ano em qualquer período de vida (exceto os casos que tivessem parado de fumar por mais de 20 anos). O tempo de consumo de tabaco foi expresso em anos e a quantidade em cigarros/dia. Usuários de álcool foram definidos como aqueles que consumiam sete a dez doses de álcool por mais de um ano em qualquer período. Dados de frequência e quantidade de álcool consumido foram estimados para todas as bebidas alcoólicas, separadas em fermentadas e destiladas, e classificadas quanto ao tempo (em anos) e quantidade consumida (ml/dia).

Para a avaliação da presença de história familiar no grupo amostral, parentes de primeiro e segundo grau com câncer foram considerados como positivos para história familiar. A evidência dessa informação foi baseada na avaliação de registros médicos do paciente com o tumor nos referidos hospitais.

Olivieri, EHR 39 Objetivos

Objetivos Gerais:

Este estudo teve como objetivo principal determinar o genótipo de pacientes portadores de CCECP e indivíduos controles (com ausência de neoplasia) para os genes CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 (Fase I) e, GSTM1 e GSTT1 (Fase II) envolvidos no metabolismo de agentes xenobióticos. Para tanto, quantificou-se pela razão de chances (odds ratio - OR), a suscetibilidade genética ao desenvolvimento destes tumores avaliando polimorfismos num estudo caso-controle de base hospitalar.

Objetivos Específicos:



Identificar as variantes alélicas do gene CYP1A1 (RFLP-MspI), CYP1A2 (RFLPs DdeI e NdeI) e CYP2E1 (RFLP RsaI), na tentativa de correlacionar estes polimorfismos à suscetibilidade ao câncer de cabeça e pescoço em comparação com um grupo controle;



Identificar pela PCR - Multiplex os genótipos dos genes GSTM1 e GSTT1 em casos e controles;



Comparar os genótipos encontrados entre os pacientes com CCECP de diferentes localizações anatômicas (cavidade oral, laringe e faringe) com controles;



Comparar os genótipos dos pacientes portadores de CCECP ao do grupo controle, de maneira isolada e agrupada, e correlacioná-los aos dados epidemiológicos, clínicos e de prognóstico, usando testes estatísticos apropriados.

Olivieri, EHR Resultados 63 Características epidemiológicas e clínicas dos pacientes e distribuição dos genótipos

Neste estudo foram genotipados 156 casos com CCECP (**Anexo 5**) e 145 controles (**Anexo 6**). Os resultados da genotipagem dos genes CYP1A1, CYP1A2 (A e B), CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 estão apresentados na **Tabela 10**. Os parâmetros em relação aos pacientes incluíram idade, sexo, raça, história familiar de câncer e consumo de tabaco e álcool; as variáveis do tumor compreenderam localização, dimensão e tipo histológico; os parâmetros relativos aos achados clínicos incluíram recorrência tumoral e metástase. Os portadores de CCECP apresentavam idade média de $58,4 \pm 11,0$ anos e os controles $58,8 \pm 12,0$ anos. O sexo masculino prevaleceu sobre o feminino em ambos os grupos, em 92% dos casos e 94% dos controles, na razão 11:1 em casos e 17:1 em controles.

Tabela 10. Resumo geral dos genótipos avaliados em casos e controles.

Gene	Controle	Caso	Faringe	Laringe	Cav. Oral
CYP1A1	145/145	156/156	78/78	20/20	58/58
CYP1A2/A	144/145	156 /156	77/78	20 /20	58/58
CYP1A2/B	140/145	151 /156	74/78	19 /20	57/58
CYP2E1	122/145	124/156	62/78	20/20	41/58
GSTM1	145/145	156/156	78/78	20/20	57/58
GSTT1	131/145	154/156	77/78	20/20	56/58

A **Tabela 11** apresenta a distribuição das variáveis idade, sexo, etnia, história familiar de câncer e consumo de álcool e tabaco nos grupos casos e controles.

Olivieri, EHR Resultados 64

Tabela 11. Características da população abordada no estudo.

Variáveis	Categorias	Controles n (%) ou (dp)	Casos n (%) ou (dp)	P
Idade	Variação	24-86	22-86	0,886
	Média (dp)		58,8(12,0)	58,4(11,0)
Sexo	Feminino	8(6%)	13(8%)	0,346
	Masculino		137(94%)	143(92%)

Etnia	Amarelo	1 (0,7%)	2 (1,5%)	0,203	
	Branco	107 (76,4%)	110 (81,5%)		
	Negro	7 (5%)	10 (7,5%)		
	Pardo	25 (17,9%)	13 (9,5%)		
História familiar de câncer	Não	77(60%)	78(58%)	0,745	
	Sim	52 (40%)	55(42%)		
Consumo de Tabaco	Não	Indivíduos (%)	58	17	
	Sim	Indivíduos (%)	76	133	< 0,001*
		Tempo médio em anos (dp)	32,3 (13,2)	38,9 (12,4)	< 0,01**
		Média Cigarros/dia (dp)	24,5 (13,4)	26 (16)	< 0,01**
Consumo de Álcool	Não	Indivíduos (%)	59 (44%)	25 (16%)	
	Sim	Indivíduos (%)	75 (56%)	125 (84%)	< 0,001*
		Destilado (%)	47 (69%)	94 (87%)	< 0,01*
		Tempo médio em anos (dp)	31 (15)	31,4 (13,6)	< 0,01**
		Quantidade média: ml/dia (dp)	345,4 (563)	752 (612)	< 0,01**
		Fermentado (%)	47 (70%)	61 (58%)	0,06
		Tempo médio em anos (dp)	31,7 (15)	30,4 (12,7)	0,125**
		Quantidade média: ml/dia (dp)	679,3 (797)	1324 (1837)	0,015**

Modelo de regressão logística; n: n° de indivíduos; *P-valor estatisticamente significativo ($P < 0,05$); ** Teste de Wilcoxon; dp: desvio padrão.

A etnia foi considerada segundo declaração dos indivíduos. Por esta abordagem, não houve diferença significativa entre os grupos étnicos em casos e controles ($p=0,203$), mas houve prevalência de indivíduos caucasianos (brancos) em ambas as amostras (**Tabela 11**). As análises estatísticas referentes a esta variável não

Olivieri, EHR Resultados 65
puderam ser devidamente conduzidas porque o grupo avaliado possuía poucos indivíduos representativos da classe dos asiáticos (dois casos e um controle), dos afro-descendentes (10 casos e sete controles) e dos pardos (13 casos e 25 controles). Apesar de não observado significância estatística, houve prevalência do alelo CYP1A2*1D ($p= 0,068$) em casos da etnia afro-descendente (**Tabela 12**).

Olivieri, EHR Resultados 66 Olivieri, EHR Resultados 67

Também foi avaliada a história familiar de câncer em casos e controles, e não foram observadas diferenças significativas ($p= 0,745$) para IC de 95%.

Para a análise estatística, os grupos foram pareados por idade e sexo, exceto na análise referente ao consumo de tabaco e álcool (**Gráfico 1**). Entre o grupo masculino, 88% dos casos e 48% dos controles e no grupo feminino, 29% dos casos e 20% dos controles consumiam álcool e tabaco simultaneamente. Entre os indivíduos que não possuíam hábitos tabagista ou etilista, foram observados 6% dos casos e 33% dos controles do sexo masculino, contra 14% dos casos e 80% dos controles das do sexo feminino (**Gráfico 2**).

Houve prevalência significativa em relação ao hábito tabagista em casos comparados aos controles, quanto ao número de indivíduos fumantes ($p < 0,001$), quanto ao tempo de uso do tabaco ($p < 0,01$), e quantidade consumida ($p < 0,01$), como apresentado na **Tabela 11**. O consumo de álcool teve maior prevalência em casos comparados aos controles ($p < 0,001$), principalmente quanto à classe de destilados ($p < 0,01$). O tempo de consumo de destilados ($p < 0,01$) e a sua quantidade consumida ($p < 0,01$) assim como a quantidade de consumo de fermentados ($p < 0,015$) também prevaleceram no grupo de casos (**Tabela 11**).

Olivieri, EHR Resultados 68

Gráfico 1. Distribuição de indivíduos com história de consumo de álcool e tabaco.

Gráfico 2. Amostras de casos e controles pareadas por idade e sexo e sua relação com consumo de álcool e tabaco.

0102030405060708090100TabacoÁlcoolSem hábitoFumam ebebem% indivíduosF: CASOSF: CONTROLESM: CASOSM: CONTROLES

A relação entre o consumo de tabaco e álcool com os dados de genotipagem dos genes CYP1A1, CYP1A2/A, CYP1A2/B, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 está apresentada na **tabela 13**. Não foram observadas diferenças significativas entre consumo de tabaco e álcool e os genótipos analisados.

0102030405060708090100TabacoÁlcoolSemhábitoFumam ebebem% dindivíduosCasosControles

Olivieri, EHR Resultados 69

Tabela 13. Distribuição dos genótipos CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 entre indivíduos fumantes e consumidores de álcool em casos e controles.

Genes	Genótipos	Tabaco	Álcool
-------	-----------	--------	--------

			Caso	Controle	P/OR	Caso	Controle	P/OR
CYP1A1	*1A/*1A *1A/*2A *2A/*2A 2(2%) N=133 59(78%) 94(70%) 37(28%)	1(1%) N=76 0.54/ 1.2	86(69%) 36(29%)	2(2%) N=124 56(75%) 17(23%)	2(2%) N = 75 0.562/ 1.154	CYP1A2/A		
*1A/*1C	*1C/*1C 61(82%) 104(78%) 13(17%) 25(19%) 1(1%) 3(2%) N=132	0.85/ 0.32 96(78%) 24(19%)	3(3%) N=123	59(80%) 14(19%) 1(1%) N = 74	0.86/ 0.29 CYP1A2/B	*1A/*1A *1A/*1D		
51(40%)	70(55%) 7(5%) N=128	31(43%) 38(52%) 4(5%) N=73	0.93/ 0.13 45(38%) 68(57%)	6(5%) N=119	30(42%) 38(53%) 4(5%) N = 72	0.84/ 0.34 CYP2E1	C1/C1 C1/C2	
85(79%)	21(20%) 1(1%) N=107	57(88%) 7(11%) 1(1%) N=65	0.3/ 2.4 79(78%) 21(21%)	1(1%) N=101	53(87%) 7(11%) 1(2%) N = 61	0.30/ 2.39 GSTM1	Positivo Nulo	
68(52%)	N=132 36(47%) 40(53%)	N=76 0.88/ 0.02	61(49%) 63(51%) N=124	40(53%) 35(47%)	N = 75 0.66/ 0.32	GSTT1	Positivo Nulo 78(59%)	
N=131	44(66%) 23(34%)	N=67 0.44/ 0.70	73(59%) 50(41%) N=123	43(66%) 22(34%)	N = 65 0.43/ 0.83	N: número de indivíduos; P significante: ≤ 0,05; OR = Odds ratio.		

***1A/*1A**

***1D/*1D**

C2/C2

64(48%)

53(41%)

Olivieri, EHR Resultados 70 D

istribuição dos genótipos segundo a faixa etária

Para avaliar a hipótese de associação entre a idade e os genótipos estudados no risco de desenvolvimento do carcinoma de cabeça e pescoço (Tabela 14) e em seus diferentes subtipos anatômicos (Tabela 15), os indivíduos deste estudo foram

agrupados segundo a idade, em duas classes: ≤ 50 anos e > 50 anos (Tabela 14). Não foi verificada uma associação significativa entre estas variáveis.

Tabela 14. Distribuição dos polimorfismos e sua associação com a idade na classe de indivíduos com ≤ 50 anos e > 50 anos.

Genes
Genótipos
Caso
Controle
P/OR

Caso	Controle		P/OR		≤ 50		≤ 50
			*1A/*1A	*1A/*2A			
11(31%)	0 N=36 23(66%) 11(31%) 1(3%)	N=35 0.8/ 1.18	84(70%) 34(28%) 2(2%) N=120	83(75%) 26(24%) 1(1%)	N=110 0.37/ 0.75	CYP1A2/A *1A/*1A *1A/*1C *1C/*1C	30(83%) 6(17%)
N=36	26(74%) 9(26%) 0 N=35 0.39/	1.7 94(78%) 23(19%) 3(3%)	N=120 87(80%) 21(19%) 1(1%)	N=109 0.8/	0.9 CYP1A2/B *1A/*1A	*1A/*1D *1D/*1D 15(43%) 17(49%)	3(8%) N=35
20(57%)	3(9%) N=35 0.62/	1.4 43(37%) 68(59%)	5(4%) N=116 44(42%) 58(55%)	3(3%) N=105 0.24/	0.60 CYP2E1	c1/ c1 c1/c2 c2/c2 19(73%)	7(17%) 0 N=26
4(14%)	1(4%) N=28 0.52/ 0.59	79(81%) 18(18%) 1(1%)	N=98 82(87%) 12(13%) 0	N=94 0.24/ 0.6	GSTM1 Positivo Nulo	17(47%) 19(53%) N=36 22(63%)	13(37%) N=35

0.52	61(51%) 59(49%)	N=120 49(45%) 61(55%)	N=110 0.35/ 1.2	GSTT1	Positivo Nulo 22(61%)	14(39%) N=36 20(62%)	12(38%) N=32
0.94	69(58%) 49(42%) N=118	64(65%) 35(35%) N=99	0.4/ 0.7	P significante: ≤ 0,05, N: número de individuos.			

25(69%)

0

12(34%)

23(82%)

0.23/

1.0/

> 50 > 50 CYP1A1*2A/*2A Olivieri, EHR Resultados 71 Olivieri, EHR Resultados 72

Distribuição dos genótipos segundo localização anatômica com e sem pareamento por idade e sexo

Os resultados da análise genotípica foram avaliados com e sem pareamento por idade e sexo. O resumo dos resultados da análise do polimorfismo detectado pelos RFLPs- MspI do gene CYP1A1, DdeI (CYP1A2/A) e NdeI (CYP1A2/B) do gene CYP1A2, RsaI do gene CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 em casos e controles **sem** pareamento por idade e sexo pode ser visualizado no **gráfico 3 e Tabela 16** e o resumo dos resultados **com** pareamento de casos e controles por idade e sexo encontra-se apresentado no **gráfico 4 e Tabela 17**.

Não houveram diferenças estatisticamente significativas quando comparados os genótipos CYP1A1, CYP1A2/A, CYP1A2/B, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 e a presença de tumores entre as três localizações anatômicas: faringe (gráfico 5), laringe (gráfico 6) e cavidade oral (gráfico 7) bem como quando os três subtipos anatômicos foram comparados aos controles (**gráficos 3-7 e tabelas 16-17**).

Gráfico 3. Distribuição dos genótipos em casos e controles, **sem** pareamento por idade e sexo, para os seis polimorfismos abordados neste estudo.

020406080100120140*1A/*1A*1A/*2A*2A/*2A*1A/*1A*1A/*1C*1C/*1C*1A/*1A*1A/*1D*1D/*1DC1/C1C1/C2C2/C2PositivoNuloPositivoNuloCYP1A1CYP1A2/ACYP1A2/BCYP2E1GSTM1GSTT1CasoControle

Olivieri, EHR Resultados 73

Tabela 16. Distribuição dos genótipos CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1, **sem** pareamento por idade e sexo, em casos e controles por subtipo anatômico: cavidade oral, faringe e laringe.

Genes
Genótipos
Casos
Controles
P/OR
Faringe
Laringe
Oral
P/OR
CYP1A1

*1A/*1A	*1A/*2A	*2A/*2A	109(70%)	45(29%)	2(1%)	N = 156	106(73%)
N = 145	0.82/ 0.38 57(73%) 19(24%) 2(3%)	N = 78 13(65%) 7(35%) 0	N = 20 39(67%) 19(33%) 0	N = 58 0.70/	3.76 CYP1A2/A *1A/*1A	*1A/*1C *1C/*1C 125(80%) 28(18%)	3(2%) N = 156 113(78%) 30(21%)

1.19	64(83%) 10 (13%) 3(4%) N = 77 17(85%)	3(15%) 0 N = 20 43(74%)	15(26%) 0 N = 58 0.17/	8.9	CYP1A2/B *1A/*1A *1A/*1D *1D/*1D	59(39%) 84(56%) 8(5%) N = 151	56(40%) 78(56%) 6(4%) N = 140
44(60%)	7(9%) N = 74 9(47%)	10(53%) 0 N = 19 26(46%)	30(53%) 1(1%) N = 57 0.24/	7.9	CYP2E1 C1/C1 C1/C2 C2/C2	99(80%) 24(19%) 1(1%) N = 124	105(86%) 16(13%) 1(1%) N = 122
11(18%)	0 N = 62 13(65%)	7(35%) 0 N = 20 34(83%)	6(15%) 1(2%) N = 41 0.23/	8.1	GSTM1 Positivo Nulo 75(48%)	81(52%) N = 156 71(49%) 74(51%)	N = 145 0.90/ 0.96 41(53%)
11(55%)	N = 20 25(44%) 32(56%)	N = 57 0.57/ 1.1	GSTT1 Positivo	Nulo 92(60%)	62(40%) N = 154 84(64%)	47(36%) N = 131 0.46/	0.83 48(62%) 29(38%)

N = 20	32(57%) 24(43%)	N = 56 0.83/ 0.36	P significante: ≤ 0,05; OR = Odds ratio.	Gráfico 4. Distribuição do 020406080100120*1A/*1A*1A
--------	--------------------	-------------------------	--	--

2(1%)
0.55/
23(31%)
51(82%)
9(45%)
8(40%)

Olivieri, EHR Resultados 74 Olivieri, EHR Resultados 75

Gráfico 5. Distribuição dos genótipos em carcinomas de **faringe** e controles, para os seis polimorfismos, com as amostras pareadas por idade e sexo.

010203040506070*1A/*1A*1A/*2A*2A/*2A*1A/*1A*1A/*1C*1C/*1C*1A/*1A*1A/*1D*1D/*1DC1/C1C1/C2C2/C2PositivoNuloPositivoNuloCYP1A1CYP1A2/ACYP1A2/BCYP2E1GSTM1G
STT1CasoControle

Gráfico 6. Distribuição dos genótipos em carcinomas de **laringe** pareados aos controles por idade e sexo.

024681012141618*1A/*1A*1A/*2A*2A/*2A*1A/*1A*1A/*1C*1C/*1C*1A/*1A*1A/*1D*1D/*1DC1/C1C1/C2C2/C2PositivoNuloPositivoNuloCYP1A1CYP1A2/ACYP1A2/BCYP2E1GSTM1G
STT1CasoControle

Olivieri, EHR Resultados 76

Gráfico 7. Distribuição dos genótipos dos casos com carcinomas de cavidade oral pareados por idade e sexo aos controles para os seis polimorfismos analisados.

05101520253035404550*1A/*1A*1A/*2A*2A/*2A*1A/*1A*1A/*1C*1C/*1C*1A/*1A*1A/*1D*1D/*1DC1/C1C1/C2C2/C2PositivoNuloPositivoNuloCYP1A1CYP1A2/ACYP1A2/BCYP2E1G
STM1GSTT1CasoControle

Quando avaliado os genótipos duplamente nulos entre os diferentes subtipos anatômicos também não encontramos associação significativa (Tabela 18).

Tabela 18 - Distribuição dos genótipos combinados dos genes GSTM1 e GSTT1 segundo faixa etária entre os diferentes sítios anatômicos.

Sítio

Genótipos

P/OR

GSTM1*Positivo

& GSTT1*Positivo

GSTM1*Positivo

& GSTT1*nulo

GSTM1*nulo

& GSTT1*positivo

GSTM1*nulo

& GSTT1*nulo

Faringe

27 (36%)	13 (17%)				20 (26%)
	Laringe	3 (15%) 6 (30%)	9 (45%) 2 (10%)	0.23/4.2	Cav. Oral
9 (16%)	17 (30%)	15 (27%)	0.63/1.7	Controles	
23 (17%)	44 (34%)	24 (18%)	-	P significante: ≤ 0,05; OR = Odds ratio.	

16 (21%)

15 (27%)

40 (31%)

istribuição dos genótipos segundo parâmetros clínicos e de prognóstico		Genes
Tabela 19. Distribuição dos genótipos segundo a extensão tumoral (T1/T2 versus T3/T4) e envolvimento de linfonodos (LN-: ausência e LN+: presença de envolvimento de linfonodos) em CCECP.		

Foi observada uma correlação entre o genótipo CYP2E1*c2 e a presença de tumores T3/T4 (Classificação TNM - AJCC, 1998) quando comparados aos tumores T1/T2 entre os pacientes com CCECP (P=0.009; OR= 9.95; IC: 1.2-79.5) (Tabela 19). Não foi detectada associação entre os genótipos avaliados (Tabela 19) e envolvimento de linfonodos (LN+).

P

Casos

P

T1/T2

T3/T4

LN-

LN+

CYP1A1	*1A/*1A	*1A/*2A		*2A/*2A	27(79%)		7(21%)	
		15(23%)	1(2%)		N= 64	0.71/	0.66	35(76%)
0	N= 46 41(76%) 12(22%) 1(2%) N= 54	0.64/ 0.88 CYP1A2/A	*1A/*1A *1A/*1C *1C/*1C 29(85%)	5(15%) 0	N= 34 47(73%) 16(25%) 1(2%)	N= 64 0.36/ 2.0 35(76%)	11(24%) 0	
43(79%)	10(19%) 1(2%) N= 54 0.53/ 1.2	CYP1A2/B *1A/*1A *1A/*1D	*1D/*1D 17(52%) 16(48%) 0	N= 33 27(42%)	35(55%) 2(3%) N= 64 0.44/	1.6 19(41%) 27(59%) 0	N= 46 26(49%)	

2(4%)	N= 53 0.26/ 2.6	CYP2E1 C1/C1 C1/C2	C2/C2 24(96%) 1(4%) 0	N= 25 41(71%)	17(29%) 0 N= 58 0.009/	9.95 29(76%) 9(24%)	0 N= 38
9(20%)	0 N= 46 0.79/	0.21 GSTM1 Positivo	Nulo 17(52%) 16(48%) N= 33	26(41%) 38(59%) N= 64	0.38/ 1.04 23(51%) 22(49%)	N= 45 21(39%) 33(61%) N= 54	0.23/ 1.48
GSTT1	Positivo Nulo 19(59%)	13(41%) N= 32 34(53%)	30(47%) N= 64 0.66/	0.33 27(61%)	17(39%) N= 44 27(51%)	26(49%) N= 53 0.31/	1.05

0

11(24%)

N= 46

25(47%)

37(80%)

P significante: $\leq 0,05$; OR = Odds ratio; N: número de individuos.

48(75%) N= 34 Olivieri, EHR Resultados 78

O genótipo CYP1A1*2A mostrou-se estatisticamente significativo na associação com a recorrência tumoral (P = 0.02; OR= 6.2; IC: 1.3-28.7) em tumores de cavidade oral (**Tabela 20**) e houve maior frequência (P= 0.048; OR=2.9; IC: 1.1-8.0) de metástases em indivíduos portadores do genótipo GSTT1*nulo (**Tabela 21**). Além disso, todos os pacientes com ausência de metástase também tiveram ausência do genótipo homozigoto mutado para qualquer um dos genes CYPs.

Olivieri, EHR Resultados 79 Olivieri, EHR Resultados 80 Olivieri, EHR Resultados 81

Considerando o consumo de tabaco e álcool como fatores de risco para o CCECP e a associação demonstrada em literatura entre consumo de álcool e tumores T3/T4 (Strange et al, 2000), foi realizada uma análise de associação entre genótipos, extensão tumoral e presença de linfonodos (LN+: comprometimento de linfonodos e LN-: ausência do envolvimento de linfonodos), entre indivíduos fumantes e entre indivíduos consumidores de álcool. Não foi observado valor estatístico significativo para essas variáveis.

Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências alélicas dos polimorfismos nos genes abordados neste estudo encontram-se na **Tabela 22**.

Os resultados observados para as frequências alélicas e genotípicas dos genes CYP1A1, CYP1A2/A, CYP1A2/B, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1, em casos e controles, estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências alélicas observadas não diferiram significativamente no teste Exato de Fisher. Pode-se concluir que a amostra estudada foi obtida de uma população em equilíbrio genético.

Olivieri, EHR Resultados 82

Tabela 22. Distribuição das frequências alélicas dos genes CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 na população estudada.

Genes

Alelos

Casos

Controles

P

CYP1A1

CYP1A1*1A

CYP1A1*2A

0,84

0,16

0,86

0,14

P = 0.84; OR = 0.85

IC: 0.4-1.9

CYP1A2/A

CYP1A2*1A

CYP1A2*1C

0,89

0,11

0,89	0,11	P = 1.18; OR = 1.0		IC: 0.4-2.4
CYP1A2*1A	CYP1A2*1D 0,67	0,33 0,68	0,32 P = 1.0; OR = 0.95	IC: 0.53-1.7
CYP2E1*c1	CYP2E1*c2 0,89	0,11 0,93	0,07 P = 0.46; OR = 0.60	IC: 0.22-1.6
GSTM1*Positivo	GSTM1*Nulo 0,48	0,52 0,49	0,51 P = 1.0; OR = 0.96	IC: 0.55-1.7
GSTT1*Positivo	GSTT1*Nulo 0,60	0,40 0,64	0,36 P = 0.66; OR = 0.84	IC: 0.48-1.5
Identificação de classes genóticas de risco - programa NeoGene Analysis		A nomenclatura utilizada no programa NeoGene Analysis referente aos genes estudados foi: CYP1A1, CYP1A2(A e B) e CYP2E1, possuem genótipo selvagem (S : *1A/*1A; *1A/*1A e c1/c1, respectivamente), heterozigoto (H : CY1A1 - *1A/*2A; CY1A2/ A -*1A/*1C; CY1A2/B -*1A/*1D; CYP2E1 - c1/c2) ou mutado (M : CY1A1 - *2A/*2A; CY1A2/ A -*1C/*1C; CY1A2/B -*1D/*1D; CYP2E1 - c2/c2); o GSTM1 e o GSTT1 possuem genótipo nulo (N) ou positivo (P). O NeoGene Analysis ainda calcula a frequência das informações referentes aos dados genóticos e epidemiológicos dos		

CYP1A2/B

CYP2E1
 GSTM1
 GSTT1

P significante: $\leq 0,05$; OR = Odds ratio; IC: Intervalo de Confiança (95%)

Olivieri, EHR Resultados 83

<p>pacientes: classes genóticas em casos e controles, sexo, idade média, consumo de tabaco e álcool. As combinações genóticas que mostraram diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas na Tabela 23.</p>		<p>Tabela 23. Combinações genóticas que apresentaram valores significativos.</p>		
<p>Classes Genóticas Casos</p>	<p>Controles P/ OR</p>	<p>Combinações 2x2</p>	<p>1 - CYP2E1 + GSTM1</p>	<p>HN x SN 12 x 49</p>

Combinações de genes

5 x 62
 0.037/ 3.03

Combinações 3X3

2 - CYP1A2/B + CYP2E1 + GSTT1

HHP x HSP

10 x 27

2 x 38

0.008/ 7.03*

3 - CYP2E1+ GSTM1+ GSTT1	SNP x SPN	28 x 18	39 x 8
4 - CYP2E1+ GSTM1+ GSTT1			
8 x 28	2 x 39	0.026/ 5.57*	
5 - CYP1A2/A + CYP2E1 + GSTM1 + GSTT1			
8 x 25	2 x 33	0.033/ 5.28*	6 - CYP1A1 + CYP2E1 + GSTM1 + GSTT1
21 x 11	32 x 5	0.049/ 0.29	7 - CYP1A2/B + CYP2E1 + GSTM1 + GSTT1
12 x 14	22 x 6	0.014/ 0.23	
8 - CYP1A1+ CYP1A2/B + CYP2E1 + GSTM1 + GSTT1			
7 x 7	18 x 3	0.028/ 0.16	9 - CYP1A1 + CYP1A2/B + CYP2E1 + GSTM1 + GSTT1

4 x 7	0 x 18	0.013/ 22.2*	10 - CYP1A1 + CYP1A2/B + CYP2E1 + GSTM1+ /GSTT1
7 x 12	18 x 9	0.044/ 0.29	11 - CYP1A2/A + CYP1A2/B + CYP2E1 + GSTM1 + GSTT1
5 x 10 0 x 18			
12 - CYP1A1+ CYP1A2/A + CYP1A2/B + CYP2E1 + GSTM1	SSHHN x SSHSN	6 x 10	2 x 21
13 - CYP1A1 + CYP1A2/A + CYP1A2/B + CYP2E1 + GSTT1	SSHHP x SSHSP	7 x 16	2 x 24
Combinações 6X6	14 - CYP1A1 + CYP1A2/A + CYP1A2/B + CYP2E1 + GSTM1 + GSTT1	SSHHNP x SSHSNP	
0 x 17	0.012/ 24.2*	P significante: ≤ 0,05; OR = Odds ratio; S: selvagem; H: heterozigoto, M: mutado; N: nulo; P: positivo. * número amostral menor que três (baixo valor estatístico). Em vermelho destaca-se: o gene (combinações de genes) e seu respectivo genótipo (classes genóticas) que está diferenciado quando comparada duas classes genóticas.	

0.015/ 0.319

HNP x SNP

Combinações 4X4

SHNP x SSNP

SSNP x SSPN

H SNP x HSPN

Combinações 5X5

SHSNP x SHSPN

SHHNP x SHSNP

SHSNP x SHSPP

SHHNP x SHSNP

0.012/ 19.3*

0.037/ 6.3*

0.045/ 5.2*

4 x 6

Já a classe genotípica CYP2E1-selvagem/GSTM1*nulo/GSTT1*positivo, mostrou-se como “classe protetora”, pois está mais presente em controles comparada aos casos (combinações **3**, $p=0.015$; **6**, $p=0.049$; **7**, $p=0.014$; **8**, $p=0.028$; **10**, $p=0.044$).

Apesar de não serem observadas diferenças significativas entre os polimorfismos quando avaliados isoladamente, na análise combinada houve destaque para alguns genótipos. O alelo CYP2E1*c2, quando combinado a outras classes genotípicas, parece conferir maior risco para o CCECP quando comparado ao homocigoto selvagem, como observado em todas as combinações em que este gene esteve incluído e que foram predominantes entre os casos (combinações **1**, $p=0.037$; **2**, $p=0.08$; **4**, $p=0.026$; **5**, $p=0.033$; **9**, $p=0.013$; **11**, $p=0.012$; **12**, $p=0.037$; **13**, $p=0.045$; **14**, $p=0.012$), apesar do valor amostral ser reduzido pois foi subdividido na formação de classes genotípicas.

Olivieri, EHR Resumo Os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) abrangem um grupo heterogêneo de doenças do trato aerodigestivo superior. Aproximadamente 95% dos tumores se iniciam nas células escamosas. Os principais fatores etiológicos relacionados ao CCECP incluem o consumo isolado do tabaco ou em combinação ao consumo de álcool. A maioria das substâncias presentes no tabaco é convertida em metabólitos reativos capazes de interagir com o DNA pela ação das enzimas do complexo citocromo P450 e detoxificadas pelas glutatona-S-transferases e N-acetil-transferases. Muitos desses genes apresentam polimorfismos que modulam a atividade enzimática, como a variação na ativação ou detoxificação de carcinógenos. O objetivo dessa investigação foi avaliar a relação genótipo/fenótipo e a suscetibilidade ao carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) e a relação entre as informações clínicas e alterações genéticas. O grupo amostral compreendeu 156 pacientes portadores de CCECP e 145 indivíduos controles com ausência de neoplasia. A pesquisa das deleções dos genes GSTM1 e GSTT1 foi realizada pela PCR-multiplex e a genotipagem de SNPs (single nucleotide polymorphisms) dos genes CYP1A1, CYP1A2 e CYP2E1 foi realizada pela metodologia de PCR-RFLP. Foi observada uma diferença significativa entre casos e controles ($P=0,001$), quando comparado o consumo de tabaco e álcool, sugerindo que estes fatores são independentes do risco de desenvolvimento do CCECP. Quando foram considerados os parâmetros clínicos em relação aos cinco genes, foi observada uma associação entre o genótipo CYP1A1*2A e recorrência em tumores de cavidade oral ($P=0,02$), genótipo CYP2E1*c2 e tumores T3/T4 ($P=0,009$) e o genótipo GSTT1*nulo e a presença de metástases à distância ($P=0,048$). Os indivíduos portadores desses genótipos estariam relacionados a características de pior prognóstico. Esses

achados fortalecem a hipótese de que a predisposição genética é um fator importante na progressão tumoral. A análise de agrupamento por classes pelo Programa Neogene Analysis revelou que o genótipo CYP2E1*c2 quando combinado a outros genes parece conferir um maior risco para o desenvolvimento dos CCECP. Já a classe genotípica CYP2E1-selvagem/GSTM1*nulo/GSTT1*positivo estaria relacionada a um baixo risco de desenvolvimento de CCECP.

- Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 105 ABDEL-RAHMAN SZ, Anwar WA, Abdel-Aal WE, Mostafa HM, Au WW. GSTM1 and GSTT1 genes are potential risk modifiers for bladder cancer. **Cancer Detect Prev.** 22(2):129-38, 1998.
- ACAR H, Ozturk K, Muslumanoglu MH, Yildirim MS, Cora T, Cilingir O, Ozer B. Relation of glutathione S-transferase genotypes (GSTM1 and GSTT1) to laryngeal squamous cell carcinoma risk. **Cancer Genet Cytogenet.** 169(2):89-93, 2006.
- AGUNDEZ JA. Cytochrome P450 gene polymorphism and cancer. **Curr Drug Metab.** 5(3):211-24, 2004.
- ALBANO E, Tomasi A, Persson JO, Terelius Y, Gorla-Gatti L, Ingelman-Sundberg M, Dianzani MU. Role of ethanol-inducible cytochrome P450 (P450IIE1) in catalysing the free radical activation of aliphatic alcohols. **Biochem Pharmacol.** 41(12):1895-902, 1991.
- ALBERG AJ, Landrigan JA, Vu H, Helzlsouer KJ, Ford DE. Case-control study of Nat2, GSTM1, and GSTT1 genotypes in relation to head and neck cancer. **Am J Epidemiol.** 151(11): S.30, 2000.
- ALBERTINI RJ. Biomarker responses in human populations: towards a worldwide map. **Mutat Res.** 428:217-226, 1999.
- ALEXANDROV K, Cascorbi I, Rojas M, Bouvier G, Kriek E, Bartsch H. CYP1A1 and GSTM1 genotypes affect benzo[a]pyrene DNA adducts in smokers' lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation. **Carcinogenesis.** 23(12):1969-77, 2002.
- ALI S, El-Rayes BF, Heilbrun LK, Sarkar FH, Ensley JF, Kucuk O, Philip PA. Cytochrome p450 and glutathione transferase expression in squamous cell cancer. **Clin Cancer Res.** 10(13):4412-6, 2004.
- American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer Staging Handbook, AJCC cancer staging manual. 5th edn. GB Lippincott-Raven (ed), 1998.
- ANWAR WA, Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Mostafa HM, Au WW. Genetic polymorphism of GSTM1, CYP2E1 and CYP2D6 in Egyptian bladder cancer patients. **Carcinogenesis.** 17(9):1923-9, 1996.
- ARRUDA VR, Grignolli CE, Gonçalves 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.** 54:210-214, 1998.
- Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 106

- 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.** 9(1):3-28, 2000.
- BLONS H, Laurent-Puig P. TP53 and head and neck neoplasms. **Hum Mutat.** 21(3):252-7, 2003.
- BOLT HM, Roos PH, Thier R. The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine. **Int Arch Occup Environ Health.** 76(3):174-85, 2003.
- BOLT HM, Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. **Curr Drug Metab.** 7(6):613-28, 2006.
- BONASSI S, Hagmar L, Strömberg U, et al. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. **Cancer Res.** 60:1619-25, 2000.
- BOUCHARDY C, Hirvonen A, Coutelle C, Ward PJ, Dayer P, Benhamou S. Role of alcohol dehydrogenase 3 and cytochrome P-450E1 genotypes in susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract. **Int J Cancer.** 87:734-740, 2000.
- BRAAKHUIS BJ, Brakenhoff RH, Leemans CR. Head and neck cancer: molecular carcinogenesis. *Ann Oncol.* 16 Suppl 2:ii249-50, 2005.
- BRAAKHUIS BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Expanding fields of genetically altered cells in head and neck squamous carcinogenesis. **Semin Cancer Biol.** 15(2):113-20, 2005.
- BROOKS B, Johnson B, Heinzmann C, Mohandas T, Sparkes R, Jones S, Bennett P, Balacs T, Moore G, Conley L, Hankinson O. Localization of a gene required for the nuclear translocation of the dioxin receptor to human chromosome 1 and mouse chromosome 3 and human RFLP with MspI. **Am J Hum Genet.** 45:A 132(0513), 1989.
- BRUHN C, Brockmoller J, Kerb R, Roots I, Borchert HH. Concordance between enzyme activity and genotype of glutathione S-transferase theta (GSTT1). **Biochem Pharmacol.** 56(9):1189-93, 1998.
- CABELGUENNE A, Lorient MA, Stucker I, Blons H, Koum-Besson E, Brasnu D, Beaune P, Laccourreye O, Laurent-Puig P, De Waziers I. Glutathione-associated enzymes in head and neck squamous cell carcinoma and response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. **Int J Cancer.** 93(5):725-30, 2001.
- Cancer Information Service (CIS) – a program of the National Cancer Institute (NCI). <<http://cis.nci.nih.gov>>. Acesso em: outubro de 2006.
- Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 107
- CANEVARI RA, Rogatto SR. Câncer de Cabeça e Pescoço. Em: Ferreira CG, Rocha JC. **Oncologia Molecular.** São Paulo, Editora Atheneu, 2004.

- CAPOLUONGO E, Almadori G, Concolino P, Bussu F, Santonocito C, Vendittelli F, Galli J, Zuppi C, Ameglio F, Paludetti G, Giardina B. GSTT1 and GSTM1 allelic polymorphisms in head and neck cancer patients from Italian Lazio Region. **Clin Chim Acta**. [Epub ahead of print], 2006.
- CARLTON VE, Ireland JS, Useche F, Faham M. Functional single nucleotide polymorphism-based association studies. **Hum Genomics**. 2(6):391-402. 2006.
- CARLTON VE, Ireland JS, Useche F, Faham M. Functional single nucleotide polymorphism-based association studies. **Hum Genomics**. 2(6):391-402, 2006.
- CARRIÉRI G, Battaglia M, Martino P, Ditunno P, Tempesta A, Selvaggi FP. Role of color Doppler echography (ECD) in the diagnosis and follow-up of post-biopsy arteriovenous fistula in the transplanted kidney. **Arch Ital Urol Androl**. 68(5 Suppl):87-9, 1996.
- CHENG YJ, Chien YC, Hildesheim A, Hsu MM, Chen IH, Chuang J, Chang J, Ma YD, Luo CT, Hsu WL, Hsu HH, Huang H, Chang JF, Chen CJ, Yang CS. No association between genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, NAT2, and nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 12(2):179-80, 2003.
- CHEUNG YL, Kerr AC, Mcfadyen MC, Melvin WT, Murray GI. Differential expression of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 in human kidney tumors. **Cancer Letters**. 139(2):199-205, 1999.
- CONFORTI-FROES N, el-Zein R, Au W. Genetic polymorphism and their contribution to cancer susceptibility. **Cad Saude Publica**. 14 Suppl 3:7-13, 1998.
- CONFORTI-FROES, NDT. Suscetibilidade Genética ao Câncer. In: Ferreira, CG, Rocha, JC. Em: **Oncologia Molecular**. São Paulo, Editora Atheneu, 2004.
- DALY AK, Cholerton S, Armstrong M, Idle JR. Genotyping for polymorphisms in xenobiotic metabolism as a predictor of disease susceptibility. **Environ Health Perspect**. 102 Suppl 9:55-61, 1994.
- DAMM, N.; Bouquot, A. Patologia Epitelial. Em: **Patologia Oral e Maxilofacial**. 287-296, 1998.
- DESTEFANI E, Correa P, Oreggia F, Leiva J, Riveiro S, Fernandez G, Deneo-Pelegrine H, Zavala D, Fonthan E. Risk factors for laryngeal cancer. **Cancer**. 60, 3087-3091, 1987.
- Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 108
- DHOOGE IJ, De Vos M, Van Cauwenberge PB. Multiple primary malignant tumors in patients with head and neck cancer: results of a prospective study and future perspectives. **Laryngoscope**. 108(2):250-6, 1998.
- DOBROSSY L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer Metastasis Rev**. 24(1):9-17, 2005.

- EICHLER EE. Widening the spectrum of human genetic variation. **Nat Genet.** 38(1):9-11, 2006.
- EMERY AEH, Anand R, Danford N, Duncan W, Paton NL. Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility in patients with cancer. **Lancet.** 1:470-472, 1978.
- ENGEL LS, Taioli E, Pfeiffer R, Garcia-Closas M, Marcus PM, Lan Q, Boffetta P, Vineis P, Autrup H, Bell DA, Branch RA, Brockmoller J, Daly AK, Heckbert SR, Kalina I, Kang D, Katoh T, Lafuente A, Lin HJ, Romkes M, Taylor JA, Rothman N. Pooled analysis and meta-analysis of glutathione S-transferase M1 and blaDder cancer: a HuGE review. **Am J Epidemiol.** 156(2):95-109, 2002.
- ERIKSEN JG, Alsner J, Steiniche T, Overgaard J. The possible role of TP53 mutation status in the treatment of squamous cell carcinomas of the head and neck (HNSCC) with radiotherapy with different overall treatment times. **Radiother Oncol.** 76(2):135-42, 2005.
- EUBANKS M. Biomarkers: the clues to genetic susceptibility. **Environ Health Perspect.** 102:50-56, 1994.
- EVANS AJ, Henner WD, Eilers KM, Montalto MA, Wersinger EM, Andersen PE, Cohen JL, Everts EC, McWilliams JE, Beer TM. Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. **Head Neck.** 26(1):63-70, 2004.
- EVANS DAP. Arylhydrocarbon hydroxylase (cytochrome P450 1A1 and 1A2). In: **Genetic factors in drug therapy.** Ed. Cambridge University Press, p.19-34, 1993.
- FARKER K, Lehmann MH, Oelschlagel B, Haerting J, Hoffmann A, Janitzky V, Schubert J. Impact of CYP2E1 genotype in renal cell and urothelial cancer patients. **Exp Toxicol Pathol.** 50(4-6):425-31, 1998.
- FEARON ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell.** 61(5):759-67, 1990.
- FEIGELSON HS, Coetzee GA, Kolonel LN, Ross RK, Henderson BE. A polymorphism in the CYP17 gene increases the risk of breast cancer. **Cancer Res.** 57:1063-1065, 1997.
- FLOCKHART DA, Tanus-Santos JE. Implications of cytochrome P450 interactions when prescribing medication for hypertension. **Arch Intern Med.** 162:405-412, Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 109 2002.

- FOULKES WD, Brunet JS, Sieh W, Black MJ, Shenouda G, Narod SA. Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. **BMJ**. 313(7059):716-21. 1996.
- FRANCO EL, Kowalski LP, Oliveira BV. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int. J. Cancer**: 43(6):992-1000, 1989.
- GAHMBERG CG, Sekki A, Kosunen TU, Holsti LR, Makela O. Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity and pulmonary carcinoma. **Int J Cancer**. 23:302-305, 1979.
- 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**. 574(1-2):112-23, 2005.
- GAO C, Takezaki T, Wu J, Li Z, Wang J, Ding J, Liu Y, Hu X, Xu T, Tajima K, Sugimura H. Interaction between cytochrome P-450 2E1 polymorphisms and environmental factors with risk of esophageal and stomach cancers in Chinese. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 11(1):29-34, 2002.
- GARTE S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnett D, Strange RC, Stucker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC, Taioli E. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. **Cancer Epidemiol Biomarkers**. 10(12):1239-48, 2001.
- GATTÁS GJ, de 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**. 28(9):819-26, 2006.
- GATTÁS GJ, Soares-Vieira JA. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. **Occup Med (Lond)**. 50(7):508-11, 2000.
- GATTÁS, GJF. Associação de genes polimórficos de metabolização de xenobióticos e câncer de boca e de laringe. **Mutagênese**. supl.47, 2001. Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 110
- 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**. 27(3):232-42, 2005.

- GEISLER SA, Olshan AF. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE. **Am J Epidemiol.** 154(2):95-105, 2001.
- GEORGIADIS P, Demopoulos NA, Topinka J, Stephanou G, Stoikidou M, Bekyrou M, Katsouyianni K, Sram R, Autrup H, Kyrtopoulos SA. Impact of phase I or phase II enzyme polymorphisms on lymphocyte DNA adducts in subjects exposed to urban air pollution and environmental tobacco smoke. **Toxicol Lett.** 149(1-3):269-80, 2004.
- GEORGIADIS P, Topinka J, Vlachodimitropoulos D, Stoikidou M, Gioka M, Stephanou G, Autrup H, Demopoulos NA, Katsouyianni K, Sram R, Kyrtopoulos SA. Interactions between CYP1A1 polymorphisms and exposure to environmental tobacco smoke in the modulation of lymphocyte bulky DNA adducts and chromosomal aberrations. **Carcinogenesis.** 26(1):93-101, 2005.
- GOLDENBERG D, Lee J, Koch WM, Kim MM, Trink B, Sidransky D, Moon CS. Habitual risk factors for head and neck cancer. **Otolaryngol. Head Neck Surg.** 131(6):986-93, 2004.
- 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 Res.** 56:3725-3730, 1996.
- GREENLEE RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics. **CA Cancer J. Clin.** 51(1),15-36, 2001. Erratum in: **CA Cancer J. Clin.** 51(2):144, 2001.
- GREIDER CW, Blackburn EH. Telomeres, telomerase and cancer. **Sci. Am.** 274(2):92-7, 1996.
- 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.** 128(5):674-80, 2003a.
- GRONAU S, Koenig-Greger D, Jerg M, Riechelmann H. GSTM1 enzyme concentration and enzyme activity in correlation to the genotype of detoxification enzymes in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Oral Dis.** 9(2):62-7, 2003b.
- GUENGERICH FP, Kim DH, Iwasaki M. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. **Chem Res Toxicol.** 4(2):168-79, 1991.
- GUENGUERICH FP. Metabolism of chemical carcinogens. **Carcinogenesis.** 21:345-351, 2000.
- Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 111
- GUSTASON S, Proper JA, Bowie EJ, Sommer SS. Parameters affecting the yield of DNA from human blood. **Annal Biochem.** 165:294-299, 1987.
- HAHN M, Hagedorn G, Kuhlisch E, Schackert HK, Eckelt U. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity cancer. **Oral Oncol.** 38:486-490, 2002.

- HAIMAN CA, Hankinson SE, Spiegelman D, De Vivo I, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Hunter DJ. A tetranucleotide repeat polymorphism in CYP19 and breast cancer risk. **Int J Cancer**. 87:204-210, 2000.
- HASHIBE M, Brennan P, Strange RC, Bhisey R, Cascorbi I, Lazarus P, Oude Ophuis MB, Benhamou S, Foulkes WD, Katoh T, Coutelle C, Romkes M, Gaspari L, Taioli E, Boffetta P. Meta- and pooled analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 12(12):1509-17, 2003.
- HATAGIMA A, Guimarães MJK, Silva FP, Cabello, PH. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphism in two Brazilian populations. **Genet Mol Biol**. 23: 709-713, 2000.
- HAYASHI S, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. **J Biochem**. 110:407-11, 1991.
- HAYASHI SI, Watanabe J, Kawajiri K. High susceptibility to lung cancer analysed in terms of combined genotypes of P450IA1 and Mu-class glutathione S-transferase genes. **Jp J Can Res**. 83:866-870, 1992.
- HELMUT B, Nair U, Risch A, Rojas M, Wilkman H, Alexandrov K. Genetic polymorphisms of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 9:3-28, 2000.
- HILDEBRAND CE, Gonzalez FJ, McBride OW, Nebert DW. Assignment of the human 2,4,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible cytochrome P1-450 gene to chromosome 15. **Nucleic Acids Res**. 13:2009-2016, 1985.
- HILDESHEIM A, Anderson LM, Chen CJ, Cheng YJ, Brinton LA, Daly AK, Reed CD, Chen IH, Caporaso NE, Hsu MM, Chen JY, Idle JR, Hoover RN, Yang CS, Chhabra SK. CYP2E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. **J Natl Cancer Inst**. 89(16):1207-12, 1997.
- HIRVONEN A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Karjalainen A, Sorsa M, Vainio H. Metabolic cytochrome P450 genotypes and assessment of individual susceptibility to lung cancer. **Pharmacogenetics**. 2(6):259-63, 1992.
- Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 112

- HIRVONEN A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H. The human CYP2E1 gene and lung cancer: DraI and RsaI restriction fragment length polymorphisms in a Finnish study population. **Carcinogenesis**. 14(1):85-8, 1993.
- HOEIJMAKERS JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**. 411:366-374, 2001.
- Home page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. <<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>>. Acesso em: novembro de 2006.
- HOWELLS RE, Holland T, Dhar KK, Redman CW, Hand P, Hoban PR, Jones PW, Fryer AA, Strange RC. Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 genotypes in ovarian cancer: association with p53 expression and survival. **Int J Gynecol Cancer**. 11:107-112, 2001.
- HUNG HC, Chuang J, Chien YC, Chern HD, Chiang CP, Kuo YS, Hildesheim A, Chen CJ. Genetic polymorphisms of CYP2E1, GSTM1, and GSTT1; environmental factors and risk of oral cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 6(11):901-5, 1997.
- HUSSAIM SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. **Cancer Res**. 58:4023-4037, 1998.
- IIZASA T, Baba M, Saitoh Y, Suzuki M, Haga Y, Iyoda A, Chang H, Hiroshima K, Itoga S, Tomonaga T, Nomura F, Fujisawa T. A polymorphism in the 5'-flanking region of the CYP2E1 gene and elevated lung adenocarcinoma risk in a Japanese population. **Oncol Rep**. 14(4):919-23, 2005.
- INGELMAN-SUNDBERG M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. **Trends Pharmacol Sci**. 20(8):342-9, 1999.
- INGELMAN-SUNDBERG M, Ronis MJ, Lindros KO, Eliasson E, Zhukov A. Ethanol-inducible cytochrome P4502E1: regulation, enzymology and molecular biology. **Alcohol Suppl**. 2:131-9, 1994.
- INGELMAN-SUNDBERG M. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. 369(1):89-104, 2004b.
- INGELMAN-SUNDBERG M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. **Trends Pharmacol Sci**. 25(4):193-200, 2004a.
- INGELMAN-SUNDBERG M. The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. **Toxicol Appl Pharmacol**. 207(2 Suppl):52-6, 2005.
- Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 113

- INGELMAN-SUNDBERG M. The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. **Toxicol Appl Pharmacol.** 207(2 Suppl):52-6, 2005.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA) <www.inca.gov.br>. Acesso em: novembro 2006.
- JAHNKE V, Matthias C, Fryer A, Strange R. Glutathione S-transferase and cytochrome-P-450 polymorphism as risk factors for squamous cell carcinoma of the larynx. **Am J Surg.** 172(6):671-3, 1996.
- JEFFERIES S, Foulkes WD. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncol.** 37(2):115-26, 2001.
- JOURENKOVA N, Reinikainen M, Bouchardy C, Dayer P, Benhamou S, Hirvonen A. Larynx cancer risk in relation to glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes and tobacco smoking. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 7(1):19-23, 1998.
- JOURENKOVA-MIRONOVA N, Voho A, Bouchardy C, Wikman H, Dayer P, Benhamou 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.** 81(1):44-8, 1999.
- 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.** 31(9):505-11, 2002.
- KATO S, Onda M, Matsukura N, Tokunaga A, Tajiri T, Kim DY, Tsuruta H, Matsuda N, Yamashita K, Shields PG. Cytochrome P4502E1 (CYP2E1) genetic polymorphism in a case-control study of gastric cancer and liver disease. **Pharmacogenetics.** Spec No:S141-4, 1995.
- 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.** 52(23):6712-5, 1992.
- KATOH T, Kaneko S, Kohshi K, Munaka M, Kitagawa K, Kunugita N, Ikemura K, Kawamoto T. Genetic polymorphisms of tobacco- and alcohol-related metabolizing enzymes and oral cavity cancer. **Int J Cancer.** 83(5):606-9, 1999.
- KAWAJIRI K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J, Hayashi S. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. **Critical Rev Oncol Hematol.** 14:77-87, 1993.
- KAWAJIRI K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, Shinoda N, Watanabe J. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IAI gene. **FEBS Letters.** 263:131-133, 1990.
- KAWAJIRI K. CYP1A1. **IARC Sci Publ.** 148:159-72, 1999.

- KELLERMANN G, Jett JR, Luyten-Kellermann M, Moses HL, Fontana RS. Variation of microsomal mixed function oxidase(s) and human lung cancer. **Cancer**. 45(6):1438-42, 1980.
- KELLERMANN G, Luyten-Kellermann M, Shaw CR. Genetic variation of aryl hydrocarbon hydroxylase in human lymphocytes. **Am J Hum Genet**. 25:327-331, 1973.
- KIM JW, Lee CG, Park YG, Kim KS, Kim IK, Sohn YW, Min HK, Lee JM, Namkoong SE. Combined analysis of germline polymorphisms of p53, GSTM1, GSTT1, CYP1A1, and CYP2E1: relation to the incidence rate of cervical carcinoma. **Cancer**. 88(9):2082-91, 2000.
- KISS I, Sandor J, Pajkos G, Bogner B, Hegedus G, Ember I. Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2E1, and glutathione-S-transferase M1 enzymes. **Anticancer Res**. 20(1B):519-22, 2000.
- KNUDSON AG. Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. **Cancer Res**. 45:1437-43, 1985.
- KNUDSON AG. Overview: genes that predispose to cancer. **Mutat. Res**. 247:185-190, 1991.
- KO Y, Abel J, Harth V, Brode P, Antony C, Donat S, Fischer HP, Ortiz-Pallardo ME, Thier R, Sachinidis A, Vetter H, Bolt HM, Herberhold C, Bruning T. Association of CYP1B1 codon 432 mutant allele in head and neck squamous cell cancer is reflected by somatic mutations of p53 in tumor tissue. **Cancer Res**. 61(11):4398-404, 2001.
- 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**. 130(6):718-25, 2004.
- KORSGAAD R, Trell E, Simonsson BG, Stiksa G, Jazon L, Hood B, Oldbring J. Aryl hydrocarbon hydroxylase induction levels in patients with malignant tumours associated with smoking. **J Cancer Res**. 108:286-289, 1984.
- KOURI RE, Mckinney CE, Slomiany DJ, Snodgrass DR, Wray NP, Mclemore TL. Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analysed in cryopreserved lymphocytes. **Cancer Res**. 42:5030-5037, 1982.

- LADERO JM, Agundez JA, Rodriguez-Lescure A, Diaz-Rubio M, Benitez J. RsaI polymorphism at the cytochrome P4502E1 locus and risk of hepatocellular carcinoma. **Gut.** 39(2):330-3, 1996.
- Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 115
- LANDI MT, Bertazzi PA, Shields PG, Clark G, Lucier GW, Garte SJ, Cosma G, Caporaso NE. Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in humans. **Pharmacogenetics.** 4(5):242-6, 1994.
- LANDI MT, Sinha R, Lang NP, Kadlubar FF. Human cytochrome P4501A2. In: RYDER, W. (eds). **Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer.** IARC Scientific Publications no. 148. Lyon, IARC, p.173-195, 1999.
- LANG NP, Butler MA, Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Hauer-Jansen M, Kadlubar FF. Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer of polyps. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 3:675-682, 1994.
- LAZARUS P, Park JY. Metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer. **Oral Oncol.** 36(5):421-31, 2000.
- LÊ MARCHAND L, Silvaraman L, Pierce L, Seifried A, Lum A, Wilkens LR, Lau AF. Association of CYP1A1, GSTM1, and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. **Cancer Res.** 58:4858-4863, 1998.
- LEE SW, Jang IJ, Shin SG, Lee KH, Yim DS, Kim SW, Oh SJ, Lee SH. CYP1A2 activity as a risk factor for bladder cancer. **J Korean Med Sci.** 9:482-489, 1994.
- LENGAUER C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature.** 396(6712):643-9, 1998.
- LI D, Dandara C, Parker MI. Association of cytochrome P450 2E1 genetic polymorphisms with squamous cell carcinoma of the oesophagus. **Clin Chem Lab Med.** 43(4):370-5, 2005.
- LI D, Jiao L, Li Y, Doll MA, Hein DW, Bondy ML, Evans DB, Wolff RA, Lenzi R, Pisters PW, Abbruzzese JL, Hassan MM. Polymorphisms of cytochrome P4501A2 and N-acetyltransferase genes, smoking, and risk of pancreatic cancer. **Carcinogenesis.** 27(1):103-11, 2006.
- LIN JH, Lu AYH. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. **Clin Pharmacokinet.** 35:361-390, 1998.
- LIN JH. CYP induction-mediated drug interactions: in vitro assessment and clinical implications. **Pharm Res.** 23(6):1089-116, 2006.
- LIU S, Park JY, Schantz SP, Stern JC, Lazarus P. Elucidation of CYP2E1 5' regulatory RsaI/PstI allelic variants and their role in risk for oral cancer. **Oral Oncol.** 37(5):437-45, 2001.
- LOFT S, Poulsen HE, Vistisen K, Prieme H, Autrup H, Knudsen LE. CYP1A2 and

Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 116

exposure to harmful chemicals. **Pharmacol Toxicol Suppl.** 89(I):14, 2001.

LOKTIONOV A. Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. **Cancer Lett.** 10;208(1):1-33, 2004.

LONDON SJ, Daly AK, Cooper J, Carpenter CL, Navidi WC, Ding L, Idle JR. Lung cancer risk in relation to the CYP2E1 Rsa I genetic polymorphism among African-Americans and Caucasians in Los Angeles County. **Pharmacogenetics.** 6(2):151-8, 1996.

LONG JR, Kataoka N, Shu XO, Wen W, Gao YT, Cai Q, Zheng W. Genetic Polymorphisms of the CYP19A1 Gene and Breast Cancer Survival. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** [Epub ahead of print], 2006.

LUCAS D, Menez C, Floch F, Gourlaouen Y, Sparfel O, Joannet I, Bodenez P, Jezequel J, Gouerou H, Berthou F, Bardou LG, Menez JF. Cytochromes P4502E1 and P4501A1 genotypes and susceptibility to cirrhosis or upper aerodigestive tract cancer in alcoholic caucasians. **Alcohol Clin Exp Res.** 20(6):1033-7, 1996.

LUDWIG JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. **Nat Rev Cancer.** 5(11):845-56, 2005.

MAIER H, Gewlke V, Dietz A. Risk factors of cancer of the larynx: results of the Heidelberg case-control study. **Otolaryngol. Clin. North. Am.** 107:577-582, 1992.

MARCHAND LL, Wilkinson GR, Wilkens LR. Genetic and dietary predictors of CYP2E1 activity: a phenotyping study in Hawaii Japanese using chlorzoxazone. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 8(6):495-500, 1999.

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 Oncol.** 42(6):632-7, 2006.

MATTHIAS C, Bockmuhl U, Jahnke V, Jones PW, Hayes JD, Aldersea J, Gilford J, Bailey L, Bath J, Worrall SF, Hand P, Fryer AA, Strange RC. Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers. **Pharmacogenetics.** 8(2):91-100, 1998.

MATTHIAS C, Harreus U, Strange R. Influential factors on tumor recurrence in head and neck cancer patients. **Eur Arch Otorhinolaryngol.** 263(1):37-42, 2006.

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.** 81(6):406-12, 2002.

Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 117

MATTHIAS C, Jahnke V, Jones PW, Hoban PR, Aldersea JE, Worrall SF, Fryer AA, Strange RC. Cyclin D1, glutathione S-transferase, and cytochrome P450

- genotypes and outcome in patients with upper aerodigestive tract cancers: assessment of the importance of individual genes using multivariate analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 8(9):815-23, 1999.
- MCBRIDE OW, Umeno M, Gelboin HV, Gonzalez FJ. A Taq I polymorphism in the human P450IIIE1 gene on chromosome 10 (CYP2E). **Nucleic Acids Res.** 15(23):10071, 1987.
- MCILWAIN CC, Townsend DM, Tew KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. **Oncogene.** 25:1639-1648, 2006.
- MCMAHON S, Chen AY. Head and neck cancer. **Cancer and Metastasis Reviews.** 22:21-4, 2003.
- MCWILLIAMS JE, Evans AJ, Beer TM, ANdersen PE, Cohen JI, Everts EC, Henner WD. Genetic polymorphisms in head and neck cancer risk. **Head Neck.** 22(6):609-17, 2000.
- MILLER MC 3rd, Mohrenweiser HW, Bell DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. **Toxicol Lett.** 120(1-3):269-80, 2001.
- Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. **Instituto Nacional do Câncer.** Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil 2000. Rio de Janeiro, 2000.
- MORITA S, Yano M, Shiozaki H, Tsujinaka T, Ebisui C, Morimoto T, Kishibuti M, Fujita J, Ogawa A, Taniguchi M, Inoue M, Tamura S, Yamazaki K, Kikkawa N, Mizunoya S, Monden M. CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 polymorphisms are not associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. **Int J Cancer.** 71(2):192-5, 1997.
- MORITA S, Yano M, Tsujinaka T, Akiyama Y, Taniguchi M, Kaneko K, Miki H, Fujii T, Yoshino K, Kusuoka H, MoNden M. Genetic Polymorphism and susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Câncer.** 80:685-688, 1999.
- MULDER TP, Manni JJ, Roelofs HM, Peters WH, Wiersma A. Glutathione S-transferases and glutathione in human head and neck cancer. **Carcinogenesis.** 16(3):619-24, 1995.
- MURATA M, Watanabe M, Yamanaka M, Kubota Y, Ito H, Nagao M, Katoh T, Kamataki T, Kawamura J, Yatani R, Shiraishi T. Genetic polymorphisms in cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP1A2, CYP2E1, glutathione S-transferase (GST) M1 and GSTT1 and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population. **Cancer Lett.** 165(2):171-7, 2001.
- Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 118
- NAIR UJ, Nair J, Mathew B, Bartsch H. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for oral leukoplakia in ethnic Indian betel quid/tobacco chewers. **Carcinogenesis.** 20(5):743-8, 1999.

- NAKACHI K, Imai K, Hayashi K. Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. **Cancer Res.** 53:2994-2999, 1993.
- NAKAJIMA M, Yokoi T, Mizutani M, Kinoshita M, Funayama M, Kamataki T. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. **J Biochem (Tokyo).** 125(4):803-8, 1999.
- NAKAJIMA M, Yokoi T, Mizutani M, Shin S, Kadlubar FF, Kamataki T. Phenotyping of CYP1A2 in Japanese population by analysis of caffeine urinary metabolites: absence of mutation prescribing the phenotype in the CYP1A2 gene. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 3(5):413-21, 1994.
- NAKAZATO H, Suzuki K, Ohtake N, Nakata S, Yamanaka H. Role of genetic polymorphisms of the RNASEL gene on familial prostate cancer risk in a Japanese population. **Br J Cancer.** 89(4):691-6, 2003.
- National Research Council, Committee on Biological Markers. **Environ. Health Perspect.** 74:3-9, 1987.
- NEBERT DW, Dalton TP. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. **Nat Rev Cancer.** 6(12):947-60, 2006.
- NEBERT DW, McKinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. **DNA Cell Biol.** 15:273-280, 1996.
- NEBERT DW. Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. **Mutat Res.** 247:267-281, 1991.
- NELSON HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, Spitz M R. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. **Carcinogenesis.** 1243-1245, 1995.
- NEUHAUS T, Ko YD, Lorenzen K, Fronhoffs S, Harth V, Brode P, Vetter H, Bolt HM, Pesch B, Bruning T. Association of cytochrome P450 2E1 polymorphisms and head and neck squamous cell cancer. **Toxicol Lett.** 151(1):273-82, 2004.
- NEVILLE BW, Damm DD, Allen CM, BOUQUOT JE. Oral & maxillofacial pathology. 2nd ed. Saunders. Philadelphia, 337-369, 2002.
- NEVILLE, B.W.; Day, T.A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J Clin.** 52:195-215, 2002.
- Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 119
- NISHIMOTO IN, Pintos J, Schlecht NF, Torloni H, Carvalho AL, Kowalski LP, Franco EL. Assessment of control selection bias in a hospital-based case-control

- study of upper aero-digestive tract cancers. **J Cancer Epidemiol Prev.** (3):131-41, 2002.
- NORDGARD SH, Ritchie MD, Jensrud SD, Motsinger AA, Alnaes GI, Lemmon G, Berg M, Geisler S, Moore JH, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Kristensen VN. ABCB1 and GST polymorphisms associated with TP53 status in breast cancer. **Pharmacogenet Genomics.** 17(2):127-136, 2007.
- OLIVIER M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. **Hum Mutat.** 19(6):607-14, 2002.
- 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.** 9:185-191, 2000.
- OMURA T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, Purification, and properties. **J Biol Chem.** 239:2379-85, 1964.
- O'NEILL IK, Fishbein L. An IARC Manual series aimed at assisting cancer epidemiology and prevention. "Environmental carcinogens: selected methods of analysis". **Int. J. Environ. Anal. Chem.** 26(3-4):229-40, 1986.
- OUDE-OPHUIS MB, Van Lieshout EM, Roelofs HM, Peters WH, Mani JJ. Glutathione S-transferase M1 and T1 and cytochrome P450A1 polymorphisms in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. **Cancer.** 82:936-943, 1998.
- PARK JY, Muscat JE, Ren Q, Schantz SP, Harwick RD, Stern JC, Pike V, Richie JP Jr, Lazarus P. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 6(10):791-7, 1997.
- 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.** 10(2):123-31, 2000.
- PARTRIDGE M, Gaballah K, Huang X. Molecular markers for diagnosis and prognosis. **Cancer Metastasis Rev.** 24(1):71-85, 2005.
- PAVANELLO S, Simioli P, Lupi S, Gregorio P, Clonfero E. Exposure levels and cytochrome P450A2 activity, but not N-acetyltransferase, glutathione S-transferase (GST)M1 and T1, influence urinary mutagen excretion in smokers. **Cancer Epidemiol Biomark Prev.** 11:998-1003, 2002.
- Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 120
- PEMBLE S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. **Biochem J.** 300:271-6, 1994.
- PERERA FP. Environment and cancer: who are susceptible? **Science.** 278:1068-1073, 1997.

- PERSSON I, Johansson I, Bergling H, Dahl ML, Seidegard J, Rylander R, Rannug A, Hogberg J, Sundberg MI. Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. **FEBS Lett.** 319(3):207-11, 1993.
- PERSSON T, Johansson T, Bergling H, Marja-liisa D, Seidegad J, et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1: regulation and toxicological significance. **J O E M.** 7:25-36, 1995.
- PHAROAH PD, Dunning AM, Ponder BA, Easton DF. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. **Nat Rev Cancer.** 4(11):850-60, 2004.
- POWELL H, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Smith DA, Park BK. Expression of cytochrome P4502E1 in human liver: assessment by mRNA, genotype and phenotype. **Pharmacogenetics.** 8(5):411-21, 1998.
- RADEMAKER M. Do women have more adverse drug reaction? **Am J Clin Dermatol.** 2(6): 349-51, 2001.
- RAMACHANDRAN S, Lear JT, Ramsay H, Smith AG, Bowers B, Hutchinson PE, Jones PW, Fryer AA, Strange RC. Presentation with multiple cutaneous basal cell carcinomas: association of glutathione S-transferase and cytochrome P450 genotypes with clinical phenotype. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 8(1):61-7, 1999.
- RANNUG A, Alexandrie AK, Persson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 A1, 2D6, and 2E1: Regulation and toxicological significance. **J.O.E.M.** 37:25-36, 1995.
- RAPOPORT A. The importance of metastatic cervical lymph nodes on the prognosis and therapy of malignant neoplasias of the head and neck. **Tumori.** 62(5):473-84, 1976.
- REIS PP, Rogatto SR, Kowalski LP, Nishimoto IN, Montovani JC, Corpus G, Squire JA, Kamel-Reid S. Quantitative real-time PCR identifies a critical region of deletion on 22q13 related to prognosis in oral cancer. **Oncogene.** 21(42):6480-7, 2002.
- REMMER H, Merker HJ. Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmic reticulum and drug-metabolizing enzymes. **Ann N Y Acad Sci.** 123:79-97, 1965.
- Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 121
- ROBERT J, Morvan VL, Smith D, Pourquier P, Bonnet J. Predicting drug response and toxicity based on gene polymorphisms. **Crit Rev Oncol Hematol.** 54(3):171-96, 2005.

- ROGERS AS. The role of cytochrome P450 in developmental pharmacology. **J Adolescent Health**. 15:635-640, 1994.
- ROSSIT A, Conforti-Froes N. Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer. **Rev. Soc. Bras. Cancerol**. 10:22-30, 2000.
- ROSSIT ARB, Cabral IR, Conforti-Froes NDT. Avaliação das frequências alélicas de genes do biometabolismo em uma população brasileira. **Genet Mol Biol**. 22:23, 1999.
- ROSSIT ARB, Conforti-Froes NDT. Epidemiologia Molecular - Xenobióticos e Suscetibilidade Genética na Etiologia do Câncer. In: Louro, ID, Llerena Jr JC, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Conforti-Froes N. **Genética Molecular do Câncer**. São Paulo, MGS Produção Editorial, 2002.
- ROUNTREE MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. **Oncogene**. 20(24):3156-65, 2001.
- SACHSE C, Bhambra U, Smith G, Lightfoot TJ, Barrett JH, Scollay J, Garner RC, Boobis AR, Wolf CR, Gooderham NJ; Colorectal Cancer Study Group. Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. **Br J Clin Pharmacol**. 55(1):68-76, 2003.
- SATO M, Sato T, Izumo T, Amagasa T. Genetically high susceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined genotyping of CYP1A1 and GSTM1 genes. **Oral Oncol**. 36(3):267-71, 2000.
- SCHANTZ SP, Harrison LB, Kihong W. Cancer of the head and neck. In: **Cancer: Principles and Practice of Oncology**, Philadelphia J. B. Lippincott Co., p. 574-672, 1993.
- SCHANTZ SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**. 128(3):268-74, 2002.
- SCULLY C, Porter S. Oral cancer. **West. J. Med**. 174(5):348-51, 2000.
- SEIDEGARD J, Pero RW. The genetic variation and the expression of human glutathione transferase mu. **Klin Wochenschr**. 11:125-6, 1988.
- SEOW A, Zhao B, Lee EJ, Poh WT, Teh M, Eng P, Wang YT, Tan WC, Lee HP. Cytochrome P450A2 (CYP1A2) activity and lung cancer risk: a preliminary study among Chinese women in Singapore. **Carcinogenesis**. 22(4):673-7, 2001.
- Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 122
- SHARMA A, Mishra A, Das BC, Sardana S, Sharma JK. Genetic polymorphism at GSTM1 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer. **Neoplasma**. 53(4):309-15, 2006.
- SHIELDS PG, Ambrosone CB, Graham S, Bowman ED, Harrington AM, Gillenwater KA, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R, Nemoto T, Freudenheim JL.

- A cytochrome P4502E1 genetic polymorphism and tobacco smoking in breast cancer. **Mol Carcinog.** 17(3):144-50, 1996.
- SHIMADA T, Fujii-Kuriyama Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. **Cancer Sci.** 95(1):1-6, 2004.
- SPRENGER R, Schalagenhauser R, Kerb R, Bruhn C, Brockmoller J, Roots I, Brinkmann U. Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. **Pharmacogenetics.** 10(6):557-566, 2000.
- SPURR NK, Gough AC, Stevenson K, Wolf CR. Msp-1 polymorphism detected with a cDNA probe for the P-450 I family on chromosome 15. **Nucleic Acids Res.** 15(14):5901, 1987.
- SREELEKHA TT, Ramadas SK, Pandey M, Thomas G, Nalinakumari MR, Pillai MR. Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. **Oral Oncol.** 37:593-98, 2002.
- STEPHENS EA, Taylor JA, Kaplan N, Yang CH, Hsieh LL, Lucier GW, Bell DA. Ethnic variation in the CYP2E1 gene: polymorphism analysis of 695 African-Americans, European-Americans and Taiwanese. **Pharmacogenetics.** 4(4):185-92, 1994.
- STEWART BW, Kleihues P. World Cancer Report, WHO International Agency for Research on Cancer, **IARC Press**, Lyon, 2003.
- STRANGE RC, Aldersea J, Hoban PR, Fryer AA, Matthias C, Jahnke V, Jones PW. Genetic polymorphism and clinical outcome: identification of individuals at risk of a poor clinical outcome. **Allergy.** 55 Suppl 61:10-4, 2000a.
- STRANGE RC, Fryer AA. Chapter 19. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. **IARC.** 148:231-249, 1999.
- STRANGE RC, Jones PW, Fryer AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. **Toxicol Lett.** 112-113:357-63, 2000b.
- STURGIS EM, Wei Q, Spitz MR. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. **Semin Oncol.** 31(6):726-33, 2004.
- Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 123
- STURGIS EM, Wei Q. Genetic susceptibility-molecular epidemiology of head and neck cancer. **Curr Opin Oncol.** 14:310-317, 2002.
- SUAREZ-KURTZ G. Farmacogenética/ Farmacogenômica. Em: Ferreira CG, Rocha JC. **Oncologia Molecular.** São Paulo, Editora Atheneu, 2004.
- SUGERMAN PB, Shillitoe EJ. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: Evidence for and against a causal relationship. **Oral Dis.** 3:130-147, 1997.

- SUGIMURA H, Hamada GS, Suzuki I, Iwase T, Kiyokawa E, Kino I, Tsugane S. CYP1A1 and CYP2E1 polymorphism and lung cancer, case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. **Pharmacogenetics**. Spec No:S145-8, 1995.
- 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**. 35(1):11-8, 2006.
- SUGIMURA T. Nutrition and dietary carcinogenesis. **Carcinogenesis**. 21:387-395, 2000.
- TAIOLI E, Bradlow HL, Garbers SV, Sepkovic KW, Osborne MP, Trachman L, Ganguly S, Garte SJ. Role of estradiol metabolism and CYP1A1 polymorphisms in breast cancer. **Cancer Detec Prev**. 23:232-237, 1999.
- TAKES RP, Baatenburg De Jong RJ, Alles MJ, Meeuwis CA, Marres HA, Knecht PP, De La Riviere GB, De Wilde PC, Mooi WJ, Hermans J, Van Krieken JH. Markers for nodal metastasis in head and neck squamous cell cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**. 128(5):512-8, 2002.
- TAKES RP. Staging of the neck in patients with head and neck squamous cell cancer: imaging techniques and biomarkers. **Oral Oncol**. 40(7):656-67, 2004.
- TAN W, Song N, Wang GQ, Liu Q, Tang HJ, Kadlubar FF, Lin DX. Impact of genetic polymorphisms in cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferases M1, T1, and P1 on susceptibility to esophageal cancer among high-risk individuals in China. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 9(6):551-6, 2000.
- TANIMOTO K, Hayashi S, Yoshiga K, Ichikawa T. Polymorphisms of the CYP1A1 and GSTM1 gene involved in oral squamous cell carcinoma in association with a cigarette dose. **Oral Oncol**. 35:191-196, 1999.
- TANINGHER M, Malacarne D, Izzoti A, Ugolini D, Parodi S. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. **Mutat Res**. 436:227-261, 1999.
- TEMAM S, Janot F. Molecular markers of head and neck cancer. *Rev Prat*. 56(15):1658-61, 2006.
- Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 124
- THIER R, Golka K, Bruning T, Ko Y, Bolt HM. Genetic susceptibility to environmental toxicants: the interface between human and experimental studies in the development of new toxicological concepts. **Toxicol Lett**. 127(1-3):321-7, 2002.
- TOPIC E, Stefanovic M, Ivanisevic AM, Petrinovic R, Curcic I. The cytochrome P4502D6 (CYP2D6) gene polymorphism among breast and head neck cancer patients. **Clin Chim ACTA**. 296(1-2):101-109, 2000.
- UEMATSU F, Ikawa S, Kikuchi H, Sagami I, Kanamaru R, Abe T, Satoh K, Motomiya M, Watanabe M. Restriction fragment length polymorphism of the

- human CYP2E1 (cytochrome P450IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: possible relevance to low smoking exposure. **Pharmacogenetics**. 4(2):58-63, 1994.
- UICC - **Manual de Oncologia Clínica** - 2o edição brasileira. Springer-Verlag. Fundação Oncocentro, 1999.
- UMENO M, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. **Biochemistry**. 27(25):9006-13, 1988.
- VARZIM MGM. Estudo de genes polimórficos codificadores de enzimas metabolizadoras de xenobióticos associados ao cancro da laringe. Mestrado em oncologia, **Universidade do Porto**, 2000.
- VAUGHAN TL, Shapiro JA, Burt RD, Swanson GM, Berwick M, Lynch CF, Lyon JL. Nasopharyngeal cancer in a low-risk population: defining risk factors by histological type. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 5(8):587-93, 1996.
- VINEIS P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, Gupta PC, Hackshaw A, Matos E, Samet J, Sitas F, Smith J, Stayner L, Straif K, Thun MJ, Wichmann HE, Wu AH, Zaridze D, Peto R, Doll R. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. **J Natl Cancer Inst**. 96(2):99-106, 2004.
- VINEIS P, Malats N, Lang M, d'Errico A, Caporaso N, Cuzick J, Boffetta P. Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. **IARC. Scientific Publication No. 148**, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1999.
- VISTISEN K, Loft S, Olsen JH, Vallentin S, Ottesen S, Hirsch FR, Poulsen HE. Low CYP1A2 activity associated with testicular cancer. **Carcinogenesis**. 25(6):923-9, 2004.
- VISWANATHAN H, Wilson JA. Alcohol--the neglected risk factor in head and neck cancer. **Clin Otolaryngol Allied Sci**. 29(4):295-300, 2004.
- VOSO MT, D'Alo F, Putzulu R, Mele L, Scardocci A, Chiusolo P, Latagliata R, Lococo F, Rutella S, Pagano L, Hohaus S, Leone G. Negative prognostic value of Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 125
glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) deletions in adult acute myeloid leukemia. **Blood**. 100:2703-2707, 2002.
- VOSO MT, D'Alo F, Gumiero D, Guidi F, Hohaus S, Leone G. The CYP1A1*2a allele is an independent prognostic factor for acute myeloid leukemia. **Haematologica**. 90(7):982-4, 2005.
- WANG XL, Greco M, Sim AS, Duarte N, Wang J, Wilcken DE. Effect of CYP1A1 MspI polymorphism on cigarette smoking related coronary artery disease and diabetes. **Atherosclerosis**. 162(2):391-397, 2002.

- WATANABE J, Hayashi S, Nakachi K, Imai K, Suda Y, Sekine T, Kawajiri K. PstI and RsaI RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E gene. **Nucleic Acids Res.** 18(23):7194, 1990.
- WATANABE J, Yang JP, Eguchi H, Hayashi S, Imai K, Nakachi K, Kawajiri K. An Rsa I polymorphism in the CYP2E1 gene does not affect lung cancer risk in a Japanese population. **Jpn J Cancer Res.** 86(3):245-8, 1995.
- WEINBERG RA. Tumor suppressor genes. **Science.** 254(5035):1138-46, 1991.
- WEINBERG, RA. The integrations of molecular genetics into cancer management. **Cancer.** 70:1653-1658, 1992.
- WONG NA, Rae F, Simpson KJ, Murray GD, Harrison DJ. Genetic polymorphisms of cytochrome p4502E1 and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a white population: a study and literature review, including meta-analysis. **Mol Pathol.** 53(2):88-93, 2000.
- World Health Organization (WHO). International classification of diseases for oncology. 2nd edn. Geneva: **World Health Organization**, 1990.
- WORMHOUDT LW, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. **Crit Rev Toxicol.** 29:59-124, 1999.
- WORRALL SF, Corrigan M, High A, Starr D, Matthias C, Wolf CR, Jones PW, Hand P, Gilford J, Farrell WE, Hoban P, Fryer AA, Strange RC. Susceptibility and outcome in oral cancer: preliminary data showing an association with polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6. **Pharmacogenetics.** 8(5):433-9, 1998.
- WU MT, Lee JM, Wu DC, Ho CK, Wang YT, Lee YC, Hsu HK, Kao EL. Genetic polymorphisms of cytochrome P4501A1 and oesophageal squamous-cell carcinoma in Taiwan. **Br J Cancer.** 87(5):529-532, 2002.
- WYNDER EL, Stellman SD. Comparative epidemiology of tobacco-related cancers. **Cancer Res.** 37:4608-4622, 1977.

Olivieri, EHR Referências Bibliográficas 126

- XIE MQ, Huang YL, Xiao JY, Zhao SP, Chen ZH, Wang CL. Detection of chromosomal aberrations in nasopharyngeal carcinoma by rapid primed in situ labeling. **Ai Zheng**. 23(1):104-7, 2004.
- YANG CS, Yoo JS, Ishizaki H, Hong JY. Cytochrome P450IIE1: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. **Drug Metab Rev**. 22(2-3):147-59, 1990.
- YANG CX, Matsuo K, Wang ZM, Tajima K. Phase I/II enzyme gene polymorphisms and esophageal cancer risk: a meta-analysis of the literature. **World J Gastroenterol**. 11(17):2531-8, 2005.
- YU MW, Gladek-Yarborough A, Chiamprasert S, Santella RM, Liaw YF, Chen CJ. Cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms and susceptibility to hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**. 109(4):1266-73, 1995.
- ZAKRZEWSKA, J.M. Fortnightly review: Oral cancer. **B M J**. 318:1051-1054, 1999.
- ZHENG T, Holford TR, Zahm SH, Owens PH, Boyle P, Zhang Y, Wise JP Sr, Stephenson LP, Ali-Osman F. Cigarette smoking, glutathione-s-transferase M1 and t1 genetic polymorphisms, and breast cancer risk (United States). **Cancer Causes Control**. 13(7):637-45, 2002.
- ZHONG S, Howie AF, Ketterer B, Taylor J, Hayes JD, Beckett GJ, Wathen CG, Wolf CR, Spurr NK. Glutathione S-transferase mu locus: use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility. **Carcinogenesis**. 12(9):1533-7, 1991.

Olivieri, EHR Abstract Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are a heterogeneous group of the aerodigestive tract illness. Around 95% of these neoplasms consists of squamous cell carcinomas. These tumors are causally associated with tobacco usage alone or in combination with alcohol consumption. Most of the carcinogens present in tobacco smoke are converted into DNA-reactive metabolites by cytochrome P450 enzymes and detoxification of these metabolites is performed by glutathione S-transferases and N-acetyl-transferases in humans. Several genes of these groups display polymorphisms that could modulate enzymatic activities like carcinogens activation and detoxification. The purpose of the study was to correlate the genotype/phenotype and HNSCC development risk and the impact of the analysed clinical and genetical factors. The patients comprised 156 individuals with HNSCC and 145 without current or previous diagnosis of cancer. The GSTM1 and GSTT1 deletions were analysed by PCR-multiplex and the SNPs (single nucleotide polymorphisms) genotyping of the CYP1A1, CYP1A2 and CYP2E1 genes was performed by PCR-RFLP. The statistical analysis shows significant difference for tobacco and alcohol consumption between

cases and controls ($P=0.001$), suggesting that these factors are independent risks to HNSCC. It was detected an association between the genotype CYP1A1*2A and tumor recurrence in oral carcinomas ($P=0.02$), genotype CYP2E1*c2 and T3/T4 carcinomas ($P=0.009$) and genotype GSTT1*null and presence of metastases ($P=0.048$). These findings are compatible with the view that genetic predisposition is important in determining parameters related to tumor progression in head and neck cancer. In addition, it was observed that CYP2E1*c2 grouped to others genes could confer increased risk to HNSCC development and the genotype class CYP2E1*wild-type/GSTM1*null/GSTT1*positive represents low risk to HNSCC.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)