

Sérgio Neves Drummond

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS
GENES *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1* E O
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA**

Belo Horizonte

2005

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Sérgio Neves Drummond

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES *CYP1A1*,
CYP2E1, *GSTM1*, *GSTT1* E O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
DE BOCA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2005

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luiz Armando De Marco. Agradeço pelos ensinamentos, pela oportunidade e receptividade.

Ao Prof. Ricardo Santiago Gomez, exemplo de profissional. Agradeço por me ensinar a ter entusiasmo pela pesquisa. Agradeço pela amizade e pelas portas abertas.

Ao meu pai, Marco Antônio e minha mãe Ivete, responsáveis pela minha educação e formação profissional.

À minha irmã Isabela.

À minha querida Tia Leila e meu Tio Alexandre pelo carinho, apoio e ajuda nos momentos difíceis. Aos meus queridos primos Cristiano, Érica e Vanessa. Amo vocês.

À Giordana, minha luz, pelo carinho e por me fazer muito feliz.

Ao amigo Júlio Noronha “Julinho” pela amizade e grande ajuda.

Aos colegas do Laboratório de Patologia, Alessandra, Júnia, Jeane, Eliza, Flávio, Luciano, André, Wagner Castro, Carolina.

À Profa. Isabela Pordeus pela ajuda, pelos ensinamentos e opiniões.

À Profa. Wolfanga Lentz Boson pelos ensinamentos.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia, Dr. Marco Aurélio Romano, Dr. Marco Antônio Prado e Dr. Marcus Vinícius Gomez.

Aos Professores Cássia, Dorinha, Ricardo Mesquita e Wagner Santos pela atenção, pelos ensinamentos e pela disponibilidade.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Inês, Cristiane, Márcio e Silvana.

Aos meus grandes amigos Zé, Rafael “Morcego”, Tibão, Cuca, Guilherme e Gustavo.

Aos pacientes que participaram deste estudo.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho,
os meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Representação esquemática dos polimorfismos da região promotora do gene <i>CYP2E1</i>	29
Figura 2 – Diagrama do desenho do estudo	40
Figura 3 – Representação esquemática da Reação em Cadeia da Polimerase	50
Figura 4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% - gene <i>CYP1A1</i>	55
Figura 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8,0% - gene <i>CYP2E1</i>	56
Figura 6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8,0% - gene <i>CYP2E1</i>	57
Figura 7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% - gene <i>GSTM1</i>	58
Figura 8 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% - gene <i>GSTT1</i>	59

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR	47
Tabela 2 – Protocolos das reações de PCR e análises de restrição	48
Tabela 3 – Protocolo para coloração do gel de poliacrilamida pela prata	50
Tabela 4 – Dados epidemiológicos dos grupos casos e controles	59
Tabela 5 – Frequência dos genótipos dos genes <i>CYP1A1</i> , <i>CYP2E1</i> , <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> nos casos e controles	60
Tabela 6 – Distribuição dos genótipos do <i>CYP1A1</i> em relação ao sexo dos indivíduos com CCEB e controles	61
Tabela 7 – Distribuição dos genótipos do <i>CYP2E1</i> em relação ao sexo dos indivíduos com CCEB e controles	62
Tabela 8 – Distribuição dos genótipos do <i>GSTM1</i> em relação ao sexo dos indivíduos com CCEB e controles	62
Tabela 9 – Distribuição dos genótipos do <i>GSTT1</i> em relação ao sexo dos indivíduos com CCEB e controles	63
Tabela 10 – Distribuição dos genótipos do <i>CYP1A1</i> em relação à localização do CCEB	64
Tabela 11 – Distribuição dos genótipos do <i>CYP2E1</i> em relação à localização do CCEB	65
Tabela 12 – Distribuição dos genótipos do <i>GSTM1</i> em relação à localização	

do CCEB	66
Tabela 13 – Distribuição dos genótipos do <i>GSTT1</i> em relação à localização do CCEB	67
Tabela 14 – Distribuição dos alelos do gene <i>CYP1A1</i> nos casos e controles	67
Tabela 15 – Distribuição dos alelos do gene <i>CYP2E1</i> nos casos e controles	68

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

A	Adenina
C	Citosina
°C	Graus Celsius
CCEB	Carcinoma de células escamosas de boca
CYP450	Citocromo P-450
<i>CYP1A1</i>	Gene citocromo P-450, subfamília 1A, polipeptídeo 1
<i>CYP2E1</i>	Gene citocromo P-450, subfamília 2E, polipeptídeo 1
DNA	cido desoxirribonucléico
dNTPs	Desxi-nucleotídeos trifosfato
EDTA	cido tetra etileno diamino
g	Gravidade
G	Guanina
GLB	Gel loading buffer
GST	Glutathiona S-transferase
<i>GSTM1</i>	Gene glutathiona S-transferase classe μ

<i>GSTT1</i>	Gene glutationa S-transferase classe μ
GuHCl	Hidrocloridrato de guanidina
HNF-1	Fator de transcrição hepático
Ile	Isoleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KD	Quilo Dalton
Km	Quilômetro
mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
n	número de indivíduos
nm	Nanômetro
NNK	4-(N-methyl-N ² -nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
NNN	N ² -nitrosornicotine
n.s.	Não significativo
O.R.	Odds ratio
P	Nível de significância
PAH	Hidrocarboneto policíclico aromático
pb	Pares de base

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RLFP	Reação em cadeia da polimerase – polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
pH	Potencial de hidrogenização
PstI	<i>Providencia stuartii</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RsaI	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
T	Timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimerase
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N',- tetrametiletilenodiamino
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
Taq	Thermus Aquaticus
UV	Ultra violeta
V	Voltz
Val	Valina
μl	Micro litro

TRADUÇÕES ÚTEIS PARA A DISSERTAÇÃO

Buffer	Tampão
DNA adducts	Complexos substâncias carcinogênicas-molécula de DNA
Gel loading buffer	Tampão de corrida do gel
Odds ratio	Razão de chances
Polymerase chain reaction	Reação em cadeia da polimerase
Primers	Iniciadores
Splicing	Processamento de mRNA

SUMÁRIO

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA	17
1.2. O METABOLISMO DE CARCINÓGENOS QUÍMICOS	19
1.3. POLIMORFISMOS GENÉTICOS	21
1.4. FAMÍLIA CITOCROMO P-450	22
1.4.1. GENE <i>CYP1A1</i>	25
1.4.2. GENE <i>CYP2E1</i>	27
1.5. GENE GST (GLUTATIONA S-TRANSFERASE)	29
1.5.1. GENE <i>GSTM1</i>	30
1.5.2. GENE <i>GSTT1</i>	32
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. DESENHO DO ESTUDO	39
3.2. ÁREA DE ESTUDO	41
3.3. POPULAÇÃO DE ESTUDO	41
3.3.1. FONTES E CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE – GRUPO CASO	41
3.3.2. FONTE E CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE – GRUPO CONTROLE	42
3.3.3. AMOSTRA	43
3.4. EXTRAÇÃO DO DNA	43

3.5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	44
3.5.1. ANÁLISE DO GENE <i>CYP1A1</i>	45
3.5.2. ANÁLISE DO GENE <i>CYP2E1</i>	45
3.5.3. ANÁLISE DOS GENES <i>GSTM1</i> E <i>GSTT1</i>	46
3.5.4. CONTROLES NEGATIVOS	47
3.6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E COLORAÇÃO PELA PRATA	51
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
3.8. ASPECTOS ÉTICOS	52
4. RESULTADOS	53
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
8. ANEXOS	94
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO CONFORME OS ARTIGOS 10 E 11 DA RESOLUÇÃO 196 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE DE 10 DE OUTUBRO DE 1996	95
ANEXO B – FICHA CLÍNICA – GRUPO CASO	98
ANEXO C – FICHA CLÍNICA – GRUPO CONTROLE	100
ANEXO D – SOLUÇÃO DE KREBS	101
ANEXO E – SOLUÇÕES UTILIZADAS NA EXTRAÇÃO DO DNA	102
ANEXO F – SOLUÇÕES UTILIZADAS NA ELETROFORESE EM GEL DE	

POLIACRILAMIDA A 6,5% E 8,0%	103
ANEXO G – SOLUÇÕES UTILIZADAS NA COLORAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA PELA PRATA	107
ANEXO H – SOLUÇÕES UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE PCR E ANÁLISE DE RESTRIÇÃO	108
ANEXO I – ARTIGOS PUBLICADOS	110

RESUMO

O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) está entre os dez tumores malignos mais frequentes no mundo. A susceptibilidade individual ao CCEB se relaciona a fatores genéticos e ambientais. O tabagismo e o etilismo crônico são os fatores ambientais mais significativos no desenvolvimento do CCEB. A susceptibilidade genética ao câncer é determinada, em parte, pelo grau de expressão e/ou atividade de enzimas envolvidas na ativação (enzimas de fase I) ou inativação (enzimas de fase II) de substâncias carcinogênicas. Os polimorfismos genéticos podem influenciar a capacidade metabólica e a susceptibilidade individual ao câncer. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre os polimorfismos dos genes *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1* e o risco para o desenvolvimento de CCEB numa determinada população brasileira. Foi realizado um estudo do tipo caso-controle. O DNA dos indivíduos foi extraído a partir de células obtidas de raspado de mucosa bucal clinicamente normal e a detecção dos genótipos relacionados aos genes avaliados foi realizada através de amplificação pela reação em cadeia da polimerase e análise de restrição. Os produtos da PCR e da análise de restrição foram avaliados através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% e 8,0% e coloração pela prata. Para a análise estatística utilizou-se os testes do Qui-quadrado e de Fisher. Este estudo mostrou associação significativa entre os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e o risco ao CCEB ($p < 0,05$).

Summary

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the ten most frequent cancers worldwide. In addition to genetic features, environmental factors also modulate individual susceptibility to it. Among environmental causes, it has been shown that tobacco and alcohol consumption are the most significant factors involved in OSCC development. Susceptibility to cancer is determined, at least in part, by the degree of expression and/or activity of enzymes involved in carcinogen activation (by phase I enzymes) or deactivation (by phase II enzymes). In a population level, cancer susceptibility can be influenced by the presence of polymorphisms in many genes. The aim of the present study was to investigate the association of *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1* polymorphisms and the risk for OSCC in a Brazilian population. A case-control study was performed. DNA samples were obtained from oral swabs collected from the subjects oral cavities and the genotyping assays were performed by PCR and restriction enzymes methods. We found association between *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms and the risk for OSCC.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA

O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB), também denominado carcinoma epidermóide bucal, é definido como uma neoplasia maligna que tem origem no epitélio escamoso estratificado da boca (NEVILLE & DAY, 2002). Geralmente o CCEB se inicia como uma displasia epitelial que progride atravessando a membrana basal e invadindo o tecido conjuntivo subjacente (NAGPAL & DAS, 2003).

O CCEB representa aproximadamente 3,0% de todas as neoplasias malignas nos Estados Unidos e é o tumor maligno mais comum na cavidade bucal, representando 95,0% dos cânceres dessa região (NEVILLE & DAY, 2002). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a incidência de CCEB no Brasil é de 10,99/100000 habitantes para homens e 4,18/100000 habitantes para mulheres, com uma estimativa de 9985 novos casos para o ano de 2005 (BRASIL, 2004).

O CCEB pode surgir em qualquer sítio anatômico da cavidade bucal, sendo mais frequente no lábio inferior, borda lateral de língua e assoalho bucal (SAPP *et al.*, 1997). A incidência do CCEB é maior no sexo masculino e após os 40 anos de idade (NEVILLE & DAY, 2002). A lesão geralmente é assintomática nos estágios iniciais, podendo apresentar-se clinicamente como uma placa branca e/ou vermelha, lesão tumoral exofítica ou ulceração (lesão endofítica). As formas leucoplásicas e eritroplásicas podem representar estágios iniciais da doença, ainda não se apresentando como tumor ou úlcera. A forma exofítica exhibe superfície irregular ou papilar e coloração normal da mucosa, vermelha ou branca,

dependendo da quantidade de queratina produzida. A superfície é frequentemente ulcerada e dura à palpação. Já a forma endofítica do CCEB tipicamente apresenta uma área central ulcerada com as bordas elevadas (bordas em rolete) (NEVILLE & DAY, 2002).

O CCEB pode invadir o osso subjacente, apresentando-se radiograficamente como uma lesão radiolúcida com margens irregulares. Espessamento do ligamento periodontal dos dentes adjacentes também pode ser observado (WOOD & GOAZ, 1997).

Os aspectos histopatológicos do CCEB são caracterizados pela presença de cordões e ilhas de células epiteliais neoplásicas invadindo o tecido conjuntivo subjacente. Os tumores mais bem diferenciados exibem uma morfologia escamosa e diversos graus de pleomorfismo celular e nuclear. As ilhas de epitélio escamoso produzem focos arredondados de queratina, chamados pérolas de queratina. Já os tumores mais indiferenciados apresentam alto grau de pleomorfismo celular e nuclear e pouca ou nenhuma produção de queratina (NEVILLE *et al.*, 1995).

A patogênese do CCEB está relacionada a fatores de risco como o consumo de tabaco e de álcool e a fatores genéticos, como alterações em oncogenes e genes supressores de tumor (NAGPAL & DAS, 2003). Fumantes têm risco aumentado de cinco a nove vezes para o desenvolvimento da doença. Este risco aumenta para aproximadamente quinze vezes se o indivíduo for tabagista e etilista. Outros fatores também podem contribuir para o CCEB, como infecção pelo vírus HPV e exposição à radiação UV (NEVILLE & DAY, 2002). Apesar da importância dos fatores causais, a incidência da doença entre pessoas expostas aos fatores de risco é relativamente baixa e o carcinoma frequentemente surge após anos de exposição. O CCEB também pode se desenvolver na ausência dos fatores de risco, sugerindo um papel

importante da susceptibilidade do hospedeiro (SCULLY *et al.*, 2000b). De acordo com os mesmos autores, o CCEB surge como consequência de múltiplos eventos genéticos moleculares em vários genes, com conseqüente distúrbio dos mecanismos de sinalização e regulação do ciclo de proliferação celular e/ou perturbações nos mecanismos de reparo do DNA e eliminação de células alteradas.

O uso habitual do tabaco em suas várias formas (cigarro, charuto, cachimbo, rapé, tabaco mascado) é o fator etiológico mais importante associado com a transformação neoplásica (SAPP *et al.*, 1997). O tabaco é uma mistura complexa, com pelo menos 50 compostos, incluindo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH), nitrosaminas, aldeídos e aminas aromáticas. Nitrosaminas específicas do tabaco, como a NNN (N[^]-nitrosonornicotine) e a NNK (N-methyl-N[^]-nitrosamino-1-3-pyridyl-1-butanone), e o benzopireno (PAH) podem produzir mutações específicas, especialmente a transversão de G para T (SCULLY *et al.*, 2000a). Um estudo realizado por MORENO-LÓPEZ *et al.* (2000) concluiu que indivíduos que consomem mais de vinte cigarros diários têm aproximadamente 12 vezes mais chance de desenvolver o CCEB em comparação com os não fumantes.

1.2. O METABOLISMO DE CARCINÓGENOS QUÍMICOS

As substâncias químicas exógenas (xenobióticos) são metabolizadas em múltiplas vias, gerando produtos que podem ser mais ou menos tóxicos que a substância original. Após o metabolismo, os produtos podem interagir com moléculas-alvo (proteínas, DNA, RNA), resultando em efeitos tóxicos. As substâncias xenobióticas são metabolizadas em duas etapas – as reações de fase I e de fase II. As reações de fase I compreendem hidrólise, redução e

oxidação e são realizadas principalmente pelo grupo enzimático citocromo P-450, produzindo frequentemente intermediários eletrofílicos reativos e tóxicos. Estes produtos podem ser diretamente eliminados ou podem participar das reações de fase II (glicuronidação, sulfatação, metilação e conjugação), cujos principais componentes enzimáticos são as enzimas da família das glutatona S-transferases, gerando metabólitos de conjugação hidrossolúveis e mais facilmente excretáveis (COTRAN *et al.*, 1999).

O tabaco contém mais de 50 substâncias carcinogênicas, das quais os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), as nitrosaminas específicas do tabaco e as aminas aromáticas exercem papel importante na carcinogênese dos tumores associados ao tabagismo. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são metabolizados por enzimas da família citocromo P-450 através das reações de fase I, gerando metabólitos altamente reativos (BARTSCH *et al.*, 2000). Estas substâncias podem interagir com o DNA formando complexos (“DNA adducts”), contribuindo assim para uma instabilidade genética com conseqüente iniciação do processo carcinogênico (KRIEK *et al.*, 1998).

As nitrosaminas mais importantes do tabaco são a NNK e NNN, sendo geradas pela combustão do mesmo. Estas nitrosaminas requerem ativação metabólica para que possam exercer seu efeito carcinogênico através da formação de complexos com a molécula de DNA. Tal ativação é mediada por enzimas do grupo do citocromo P-450 e se caracteriza por reações de hidroxilação e oxidação. As aminas aromáticas sofrem reações de hidroxilação e acetilação mediadas pelas N-acetiltransferases, capazes de se complexar com o DNA e contribuir para a carcinogênese de alguns tipos de tumores. O tabaco contém também radicais livres (espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio), que geram estresse oxidativo nas mucosas dos tratos

respiratório e gastrointestinal, caracterizado por danos a bases nitrogenadas e peroxidação de lipídeos. As substâncias tóxicas geradas pelo metabolismo dos hidrocarbonetos, nitrosaminas, aminas aromáticas e radicais livres do tabaco são inativadas por enzimas da fase II. Estes metabólitos reativos são, portanto, substratos para as enzimas do grupo das glutatona S-transferases (BARTSCH *et al.*, 2000).

Variações individuais na capacidade metabólica relacionadas às enzimas de fase I e fase II podem estar associadas à susceptibilidade ao câncer. Os polimorfismos genéticos são fatores importantes na determinação desta variabilidade (LAZARUS & PARK, 2000).

1.3. POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Os polimorfismos genéticos são definidos como variações na sequência do DNA caracterizadas por substituições de nucleotídeos, deleções, inserções e duplicações que ocorrem numa frequência de pelo menos 1,0% da população estudada. Estas variações genéticas podem ou não causar alterações na expressão e/ou função do produto protéico. Uma troca de nucleotídeo localizada numa região codificadora de um gene pode provocar substituição de aminoácido com conseqüente alteração funcional da proteína codificada. Deleções em regiões codificadoras podem gerar produtos inativos ou ausência do produto protéico. Variações em regiões promotoras podem alterar as taxas de transcrição. Polimorfismos localizados em regiões intrônicas podem gerar produtos alterados ou inativos devido ao processamento “*splicing*” incorreto do RNA mensageiro. Amplificações gênicas resultam em aumento quantitativo do produto protéico (BARTSCH *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 2001). Os polimorfismos genéticos em genes que codificam enzimas envolvidas no

metabolismo de carcinógenos presentes no tabaco podem alterar o grau de expressão e/ou atividade destas enzimas, modificando a capacidade metabólica do indivíduo. A existência destes polimorfismos pode, portanto, influenciar na susceptibilidade individual ao câncer (LAZARUS & PARK, 2000).

1.4. FAMÍLIA CITOCROMO P-450

O citocromo P-450 (CYP450) foi inicialmente descrito por KLINGENBERG (1958) como um pigmento de natureza e função desconhecidas que apresentava um pico de absorção óptica de 450 nm. OMURA & SATO (1962) elucidaram a natureza protéica do pigmento descrito anteriormente e propuseram o uso do termo “citocromo P-450”. Posteriormente, ESTABROOK *et al.* (1963) demonstraram o envolvimento do citocromo P-450 em reações de hidroxilação e oxidação de várias substâncias.

A existência de aproximadamente 80 genes do grupo do citocromo P-450 (OMURA, 1999) e o número crescente de estudos demonstrando a existência de proteínas homólogas CYP-450 estimulou a proposição de uma classificação sistemática em “famílias” e “subfamílias” baseada no grau de similaridade da sua sequência de aminoácidos (POULOS *et al.*, 1987). Aquelas proteínas que apresentam até 40,0% de similaridade na sequência de aminoácidos são agrupadas na mesma família e aquelas com até 60% de similaridade são agrupadas na mesma subfamília (HASLER *et al.*, 1999).

O objetivo principal do metabolismo de drogas no organismo é gerar compostos hidrossolúveis e mais facilmente excretáveis pela bile ou urina. Uma das vias de metabolismo oxidativo de drogas e substâncias tóxicas envolve a alteração funcional de grupos específicos

da molécula original através de proteínas da superfamília citocromo P-450 (CUPP & TRACY, 1998). Essas proteínas atuam como enzimas intracitoplasmáticas e são classificadas como heme-proteínas intracelulares que atuam através da ativação do oxigênio molecular. A estrutura destas enzimas apresenta um grupo heme caracterizado pela presença de um anel porfirínico que funciona como centro eletrônico para a ativação do oxigênio e consequente realização do metabolismo oxidativo (HASLER *et al.*, 1999). As proteínas da superfamília citocromo P-450 são também essenciais à biossíntese e metabolismo de hormônios esteróides, eicosanóides e retinóides (OMURA, 1999). Várias isoformas enzimáticas CYP450 estão envolvidas no metabolismo de substâncias tóxicas presentes no tabaco e se relacionam, portanto, a doenças provocadas pelo tabagismo.

Diferentes genes do citocromo P-450 estão presentes em todos os organismos eucariotas e em alguns procariotas, sendo expressos em tecidos específicos e em estágios de desenvolvimento específicos (OMURA, 1999). Embora o principal sítio de ação das enzimas do sistema citocromo P-450 seja o fígado, outros tecidos também apresentam atividade significativa destas enzimas. Diferenças no padrão de expressão e atividade das enzimas CYP450 podem determinar os efeitos dos agentes carcinogênicos em diferentes tecidos (VONDRACEK *et al.*, 2001).

A mucosa bucal está constantemente exposta a numerosas substâncias químicas presentes em alimentos, tabaco e outras fontes (VONDRACEK *et al.*, 2001). Várias evidências têm reforçado a hipótese da biotransformação de xenobióticos pelas células epiteliais bucais: a carcinogênese bucal envolve a ativação, dependente do *CYP450*, de pró-carcinógenos como as N-nitrosaminas e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; a

exposição de animais de laboratório a tais agentes pode induzir o CCEB (RIVENSON *et al.*, 1988); células epiteliais bucais são capazes de metabolizar, *in vitro*, alguns hidrocarbonetos (AUTRUP *et al.*, 1985); algumas enzimas do sistema CYP450, incluindo CYP1A1 e CYP2E1, são expressas na mucosa bucal e apresentam atividade oxidativa neste tecido (VONDRACEK *et al.*, 2001).

A transformação enzimática da maioria dos carcinógenos químicos é essencial à formação de metabólitos genotóxicos e as enzimas da superfamília citocromo P-450 estão diretamente envolvidas em tais reações de ativação de carcinógenos. A carcinogênese química se baseia na ligação dos metabólitos tóxicos a macromoléculas celulares como o DNA, RNA e proteínas, gerando complexos denominados “*adducts*”. As enzimas CYP450 também geram estresse oxidativo através da produção de radicais livres e espécies reativas derivadas do oxigênio, o que contribui ainda mais para a carcinogênese química (HASLER *et al.*, 1999). A relação entre o citocromo P-450 e a carcinogênese se baseia em estudos experimentais em animais nos quais a susceptibilidade ao câncer induzido por substâncias químicas pode ser amplamente influenciada por diferenças individuais na atividade enzimática do *CYP450*. Estas variações individuais na capacidade metabólica relacionadas ao *CYP450* também acontecem nos humanos gerando, portanto, efeitos *in vivo* associados à sensibilidade e metabolismo de substâncias xenobióticas (GUENGERICH & SHIMADA, 1998). Os tipos e a prevalência das variantes alélicas polimórficas presentes em determinada população poderão gerar diferenças inter-étnicas e inter-individuais relacionadas à capacidade metabólica dos xenobióticos e influenciar os efeitos toxicológicos das substâncias carcinogênicas (KALOW & BERTILSSON, 1994).

1.4.1. GENE *CYP1A1*

O gene *CYP1A1* (citocromo P-450 subfamília 1A, polipeptídeo 1) se localiza no cromossomo 15, braço longo (15q22-q24) e codifica a enzima CYP1A1 (HILDEBRAND *et al.*, 1985). CYP1A1 é uma das principais enzimas de fase I envolvida na biotransformação de compostos presentes no tabaco, gerando metabólitos genotóxicos e carcinogênicos (LAZARUS & PARK, 2000; CASSON *et al.*, 2003). A atividade da enzima CYP1A1 está relacionada às primeiras reações oxidativas do metabolismo de vários substratos como o benzopireno, principal representante do grupo dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes no tabaco (TERRY *et al.*, 2003). O benzopireno sofre ação da enzima CYP1A1 através de sucessivas reações de oxidação, levando à formação de compostos altamente mutagênicos como o benzopireno diol epóxido, que apresenta alta reatividade e toxicidade em relação à molécula de DNA, especialmente em regiões importantes como o gene *TP53* (ALEXANDROV *et al.*, 2002). A expressão do gene *CYP1A1* foi demonstrada no epitélio da mucosa bucal (VONDRACEK *et al.*, 2001) e é induzida pela presença das substâncias xenobióticas (FURUKAWA *et al.*, 2004).

O gene *CYP1A1* apresenta um polimorfismo no nucleotídeo 2455, códon 462 do exon 7, caracterizado por substituição nucleotídica (A → G) resultando na troca do aminoácido no produto protéico (Isoleucina-Ile por Valina-Val) (HAYASHI *et al.*, 1991). As variantes polimórficas do *CYP1A1* apresentam diferenças funcionais demonstradas *in vitro*. A enzima CYP1A1 contendo valina na posição 462 (CYP1A1^{462Val}) apresenta aumento da atividade catalítica quando comparada à CYP1A1^{462Ile}, gerando assim, maior quantidade de compostos mutagênicos (KAWAJIRI *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1996). A variante polimórfica

CYP1A1^{462Val} apresenta maior taxa de transcrição e, conseqüentemente, maior atividade enzimática (LI *et al.*, 2004). Segundo MOONEY *et al.* (1997), indivíduos fumantes que apresentam a enzima *CYP1A1*^{462Val}, produzem mais compostos tóxicos. A atividade aumentada da *CYP1A1* gera estresse oxidativo intracelular com conseqüente produção excessiva de radicais livres e espécies reativas derivadas do oxigênio (ALEXANDROV *et al.*, 2002).

GARTE *et al.* (1998) estudaram as frequências do alelo polimórfico *CYP1A1*^{462Val} em diferentes grupos étnicos e observaram as maiores incidências em asiáticos (22,0%) e latinos (16,0%). A prevalência da forma mais ativa da enzima (*CYP1A1*^{462Val}) varia de 10,0% em populações caucasianas a 36,0% em asiáticos, seguindo uma variação relacionada a diferentes grupos étnicos (GARTE *et al.*, 2001).

O gene *CYP1A1* foi o primeiro componente da família citocromo P-450 a ser relacionado ao câncer em humanos (KELLERMAN *et al.*, 1973). A possível associação entre o polimorfismo do exon 7 do gene *CYP1A1* e o risco para o desenvolvimento de diversos tipos de tumores malignos tem sido amplamente estudada por diversos autores e os resultados e conclusões são conflitantes. A associação entre o genótipo *CYP1A1* Val/Val (indivíduos homozigotos para a variante *CYP1A1*^{462Val}) e a risco ao câncer de pulmão, mama, trato aéreo digestivo superior e esôfago foi confirmada em diversos estudos realizados em diferentes populações com odds ratio (O.R.) variando de 2,53 a 3,35 (HAYASHI *et al.*, 1992 ; AMBROSONE *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2004). Entretanto esta associação não foi demonstrada em estudos subsequentes com tumores do trato

aéreo digestivo superior, esôfago, ovário e mama (OUDE-OPHIUS *et al.*, 1998; MATTHIAS *et al.*, 1998; TERRY *et al.*, 2003; ABBAS *et al.*, 2004, LI *et al.*, 2004).

Em relação ao CCEB, os resultados também são controversos. Alguns estudos concluem que o genótipo *CYP1A1* Val/Val é um fator de risco para o CCEB (SREELEKHA *et al.*, 2001; SATO *et al.*, 2000; KAO *et al.*, 2002), enquanto outros não confirmam esta associação (HAHN *et al.*, 2002; KATOH *et al.*, 1999).

1.4.2. GENE *CYP2E1*

O gene *CYP2E1* humano (Citocromo P-450 subfamília 2E, polipeptídeo 1) se localiza no cromossomo 10q24.3, e codifica a enzima CYP2E1 de 57 KD (UMENO *et al.*, 1988) que catalisa a ativação metabólica de pró-carcinógenos como as nitrosaminas de baixo peso molecular presentes no tabaco (N^o-nitrosornicotina – NNN e N-methyl-N^o-nitrosamino-1-3-pyridyl-1-butanone - NNK) (HAYASHI *et al.*, 1991).

A regulação molecular da expressão do *CYP2E1* é complexa e envolve mecanismos transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais (LIEBER, 1997). A indução da enzima depende da dose, duração e via de ação do agente carcinogênico. O fumo, o etanol e outros agentes tóxicos induzem a atividade da CYP2E1, aumentando a produção de metabólitos tóxicos e incrementando os riscos a doenças relacionadas à ação de agentes ambientais como o câncer (VILLARD *et al.*, 1998).

Níveis aumentados de CYP2E1 geram estresse oxidativo com consequentes efeitos deletérios em nível de DNA e proliferação celular. Este estresse oxidativo induz uma resposta adaptativa através da repressão dos sistemas geradores de radicais livres e da indução de

sistemas anti-oxidantes como, por exemplo, a transcrição das glutatonas S-transferases (GSTs) (CARO & CEDERBAUM, 2004). A enzima CYP2E1 também atua na ativação de pró-carcinógenos como as nitrosaminas presentes no tabaco. Desta forma, a atividade da CYP2E1 está diretamente relacionada ao grau de injúria tecidual induzido pelos agentes xenobióticos (LIEBER, 1997).

O gene *CYP2E1* é caracterizado pela presença de dois polimorfismos genéticos localizados na região regulatória 5', detectáveis por digestão com as enzimas de restrição PstI e RsaI. O alelo mais frequente em diversas populações se caracteriza pela presença de um sítio de restrição reconhecido pela endonuclease RsaI no nucleotídeo -1019 (sequência GTAC) e pela ausência do sítio para a enzima PstI no nucleotídeo -1259 (sequência GTGCAG) – alelo RsaI+/PstI-. O alelo menos frequente não apresenta o sítio para a enzima RsaI devido a uma troca de base nitrogenada (GTAT) e possui o sítio para a enzima PstI, também atribuído a uma troca nucleotídica (CTGCAG) – alelo RsaI-/PstI+ (WATANABE *et al.*, 1990). A representação esquemática destes polimorfismos pode ser observada na FIGURA 1.

Os polimorfismos do gene *CYP2E1* não provocam mudanças na sequência de aminoácidos do produto protéico devido à localização em região não codificadora, porém podem alterar a atividade transcricional do gene (LAZARUS & PARK, 2000). HAYASHI *et al.* (1991) analisaram as estruturas moleculares das variantes polimórficas do *CYP2E1* e concluíram que os polimorfismos PstI e RsaI alteram a regulação transcricional do gene e consequentemente os níveis de RNA mensageiro da enzima CYP2E1. Segundo WATANABE *et al.* (1994), a presença do alelo raro RsaI(-) gera um incremento de duas vezes nos níveis de RNA mensageiro da enzima CYP2E1, aumentando-se assim a susceptibilidade aos efeitos

carcinogênicos promovidos pelos metabólitos das nitrosaminas específicas do tabaco. A troca nucleotídica -1019 C → T altera a interação entre o fator de transcrição hepático (HNF-1) e a sequência alvo deste fator na região promotora do gene *CYP2E1*, o que provoca um aumento na atividade transcricional de *CYP2E1* (HAYASHI *et al.*, 1991).

As frequências dos alelos polimórficos PstI e RsaI do *CYP2E1* variam em diferentes populações. WATANABE *et al.* (1990) relataram uma frequência de 19,3% para o genótipo raro (RsaI - / PstI +) numa população japonesa. A prevalência deste alelo é bem menor em populações caucasianas (3,0%) (LIU *et al.*, 2001).

A associação entre as variantes polimórficas do gene *CYP2E1* e o risco para tumores do trato aéreo digestivo superior é controversa. Indivíduos com o genótipo raro (RsaI - / PstI +) podem apresentar risco aumentado para cânceres de nasofaringe, pulmão, esôfago e boca (HILDESHEIN & LEVINE, 1993; WU *et al.*, 1997; HUNG *et al.*, 1997; LIN *et al.*, 1998). LIU *et al.* (2001) avaliaram o papel dos polimorfismos da região promotora do *CYP2E1* na susceptibilidade ao CCEB e não confirmaram tal associação.

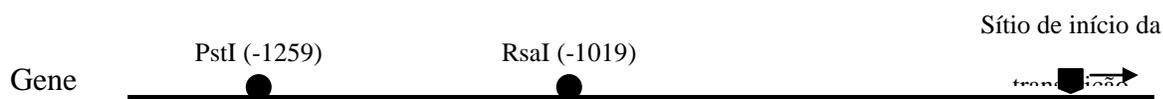


Figura 1 – Representação esquemática dos polimorfismos da região promotora do gene *CYP2E1*

1.5. GENE *GST* (GLUTATIONA S-TRANSFERASE)

As enzimas do grupo das glutationas S-transferases (GSTs) são codificadas por uma super-família com quatro principais classes de genes - α , π , θ e μ . As GSTs participam

das reações de fase II, caracterizadas pela conjugação da glutatona a compostos tóxicos presentes no tabaco ou gerados após as reações de fase I, incluindo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e as nitrosaminas. Os metabólitos conjugados se tornam hidrofílicos, atóxicos e facilmente excretáveis (LAZARUS & PARK *et al.*, 2000).

A classificação em diferentes classes se baseia em aspectos como especificidade a diferentes substratos, afinidade química, estrutura protéica e cinética da proteína (LANDI, 2000).

As proteínas da família das GSTs são encontradas em todos os sistemas eucariotas e procariotas (LAUGHLIN *et al.*, 1998), são proteínas solúveis e diméricas com aproximadamente 25KD (WHITTINGTON *et al.*, 1999).

Os padrões de expressão das GSTs nos tecidos e órgãos humanos apresentam diferenças quantitativas e qualitativas (PACIFICI *et al.*, 1986). Existem evidências que demonstram associação entre gênero e padrão de expressão das GSTs (HATAYAMA *et al.*, 1986). Estudos detectaram diferenças significativas entre os gêneros masculino e feminino na especificidade, estabilidade térmica e cinética das glutatonas (SINGHAL *et al.*, 1993).

1.5.1. GENE *GSTM1*

O gene *GST μ 1* (*GSTM1*) se localiza no cromossomo 1q13.3, codifica a enzima *GSTM1*. A enzima *GSTM1* apresenta baixos níveis de expressão imunistoquímica na mucosa bucal normal (CHEN *et al.*, 1995). De acordo com CORRIGALL & KIRSCH (1988) a enzima *GSTM1* apresenta níveis médios de expressão nas glândulas salivares.

O gene *GSTM1* apresenta um polimorfismo genético caracterizado pela deleção completa do gene (XU *et al.*, 1998). Indivíduos homozigotos para a deleção, ou seja, com o genótipo *GSTM1* nulo (*GSTM1* 0/0) não expressam a enzima *GSTM1* e, conseqüentemente, apresentam diminuição na capacidade metabólica (SREELEKHA *et al.*, 2001). A deficiência de *GSTM1* é considerada um dos fatores metabólicos de susceptibilidade ao câncer mais consistente. Existem várias evidências que comprovam esta afirmativa: a enzima *GSTM1* participa do metabolismo de compostos xenobióticos presentes no tabaco como o benzopireno e outros hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; a urina de indivíduos fumantes com a enzima *GSTM1* ativa apresenta níveis mais baixos de substâncias genotóxicas, quando comparados a indivíduos com genótipos *GSTM1* nulo (HIRVONEN *et al.*, 1994); a atividade de *GSTM1* previne danos cromossômicos *in vitro* (WIENCKE *et al.*, 1990); indivíduos com *GSTM1* ativa têm baixos níveis de substâncias complexadas com moléculas de DNA (“*DNA adducts*”) (KATO *et al.*, 1995; ROJAS *et al.*, 1998).

A variação étnica e geográfica relacionada à prevalência da deleção do *GSTM1* é evidente. As freqüências variam de 13,0% em populações caucasianas a 52,0% em populações asiáticas. AMORIN *et al.* (2002) e PINTO *et al.* (2003) relataram freqüências do genótipo *GSTM1* nulo de 40,2% e 38,2% , respectivamente, em populações brasileiras de mesma localização geográfica.

Estudos epidemiológicos sugerem que a deficiência de *GSTM1* predispõe ao desenvolvimento de vários tipos de tumores malignos humanos relacionados ao consumo de tabaco e álcool, como os cânceres de bexiga e pulmão (LAFUENTE *et al.*, 1993; QUIÑONES *et al.*, 2001; SOBBI *et al.*, 2004). A associação entre o polimorfismo do *GSTM1* e tumores da

região de cabeça e pescoço é controversa. Alguns trabalhos demonstram que a deleção do *GSTM1* é fator de risco para tumores de laringe, orofaringe e boca (MULDER *et al.*, 1995; NOMURA *et al.*, 2000; SREELEKHA *et al.*, 2001), entretanto esta hipótese não é confirmada em outros estudos (MATTHIAS *et al.*, 1998; OUDE-OPHIUS *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 1997; AMADOR *et al.*, 2002).

Segundo VAURY *et al.* (1995), ROJAS *et al.* (1998) e WARHOLM *et al.* (1998) existe uma associação entre a deficiência de *GSTM1* e um aumento dos níveis de transcrição do gene *CYP1A1*. VAURY *et al.* (1995) demonstraram que a presença de pelo menos um alelo do gene *GSTM1* está relacionada a uma diminuição da transcrição do *CYP1A1*. Os autores sugerem que, em determinados ambientes metabólicos, a presença da enzima *GSTM1* pode inibir a transcrição de *CYP1A1*, com consequente diminuição de metabólitos tóxicos. O benzopireno diol epóxido, principal metabólito resultante da atividade da *CYP1A1*, sofre ação da enzima *GSTM1*, que o conjuga com a glutatona e produz compostos atóxicos. Os níveis de atividade enzimática de *CYP1A1* e *GSTM1* são, portanto, críticos em relação às doses de metabólitos ativos e formadores de complexos com a molécula de DNA (ALEXANDROV *et al.*, 2002).

1.5.2. GENE *GSTT1*

As enzimas glutatonas S-transferases da classe Theta (θ - *GSTT*) foram inicialmente descritas, purificadas e caracterizadas estruturalmente por MEYER *et al.* (1991). O gene *GSTT1* se localiza no cromossomo 22q11.2 (WEBB *et al.*, 1996), tem 8,1 Kbases de extensão e codifica uma proteína de 25,3KDa (COGGAN *et al.*, 1998).

As GSTT apresentam diferenças estruturais importantes relacionadas à atividade catalítica quando comparadas às outras enzimas do grupo das glutatona (JEMTH & MANNERVIK, 1997). A enzima GSTT1 atua nas reações de conjugação da glutatona, especialmente com moléculas associadas a grupos epóxido. Os derivados do etileno epóxido e do butadieno gerados através de reações de oxidação mediadas por *CYP450* são substratos para *GSTT1* (LANDI, 2000). A GSTT1 também é capaz de processar substâncias como o diclorometano, cloreto de metila e cloreto de nitrobenzila, transformando-as em compostos mutagênicos (MEYER *et al.*, 1991).

A enzima GSTT1 apresenta padrão de expressão constitutivo, sendo expressa em baixos níveis na mucosa bucal normal (CHEN *et al.*, 1995) e em níveis elevados no fígado (WHITTINGTON *et al.* 1999). Entretanto, alguns agentes xenobióticos podem elevar os níveis de transcrição do gene (VAN LIESHOUT *et al.* 1998).

O gene *GSTT1* também apresenta um polimorfismo caracterizado pela deleção total do gene. Indivíduos homozigotos para a deleção (genótipo *GSTT1* nulo ou *GSTT1* 0/0) não geram o produto protéico do gene com conseqüente ausência de atividade da enzima GSTT1 (PEMBLE *et al.*, 1994).

A prevalência da deleção do *GSTT1* em populações controle varia, assim como no caso dos outros genes abordados neste trabalho, seguindo um padrão étnico e geográfico. As freqüências do genótipo *GSTT1* nulo em diferentes populações de origem caucasiana variam de 13,0 a 26,0%. Populações asiáticas apresentam freqüências de 35,0 a 52,0% (GARTE *et al.*, 2001). Estudos em populações brasileiras observaram valores de prevalência do genótipo *GSTT1* nulo em torno dos 25,0% (AMORIN *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2003).

A atividade da enzima GSTT1 modula os efeitos biológicos tóxicos de substâncias carcinogênicas e, portanto, o polimorfismo do *GSTT1* pode alterar o risco de desenvolvimento de doenças como o câncer em humanos (LANDI, 2000). Desta forma vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar a possível associação entre o genótipo *GSTT1* nulo e o risco para vários tipos de câncer. Indivíduos com genótipo *GSTT1* nulo apresentam maior risco para o desenvolvimento de carcinoma basocelular, carcinoma de boca, laringe, bexiga, pulmão, reto e próstata (HEAGERTY *et al.* 1996; HUNG *et al.*, 1997; ABDEL-RAHMAN *et al.* 1998; SOBBI *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2005; CACERES *et al.*, 2005).

A associação potencial entre a deleção do gene *GSTT1* e o risco para tumores do trato aéreo digestivo superior é amplamente estudada e as conclusões são conflitantes. Vários estudos epidemiológicos do tipo caso-controle avaliaram a associação entre o polimorfismo do *GSTT1* e cânceres do trato aéreo digestivo superior em diferentes populações e não encontraram resultados significativos (TRIZNA *et al.*, 1995; DEAKIN *et al.*, 1996; HUNG *et al.*, 1997; OUDE-OPHIUS *et al.*, 1998; MATTHIAS *et al.*, 1998; KATOH *et al.*, 1999). Outros autores, entretanto, demonstraram que indivíduos com o genótipo GSTT1 nulo têm maior risco para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas de laringe, orofaringe e boca (JOURENKOVA *et al.*, 1998; JOURENKOVA-MIRONOVA *et al.*, 1999; SREELEKHA *et al.*, 2001).

A associação entre o genótipo *GSTT1* nulo e o risco aos tumores malignos relacionados ao consumo de tabaco ainda não é evidente (ABBAS *et al.*, 2004). O significado biológico da ausência da enzima GSTT1 permanece ainda obscuro (LANDI, 2000).

A análise de grupos de indivíduos expostos a substâncias carcinogênicas através do estudo de polimorfismos genéticos em genes relacionados ao metabolismo de substâncias xenobióticas pode ser de fundamental importância na avaliação do grau individual de susceptibilidade ao câncer e talvez na prevenção de alguns tipos de tumores.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo avaliar a associação entre os polimorfismos dos genes *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTT1* e o risco para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas de boca em uma população brasileira definida, bem como analisar possíveis associações destes polimorfismos com fatores importantes como sexo e sítio de localização do tumor na cavidade bucal.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DESENHO DO ESTUDO

Para se avaliar a associação entre os polimorfismos dos genes *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTT1* e o risco para o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) foi realizado um estudo do tipo caso-controle. Os indivíduos incluídos no grupo caso apresentavam diagnóstico clínico e histopatológico de CCEB. Inicialmente, após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO A), os indivíduos responderam a uma ficha clínica (ANEXO B) contendo dados pessoais, dados relativos aos hábitos de tabagismo e etilismo (tipo, frequência e duração do hábito) e dados relativos à doença como localização da lesão, tempo de evolução, tratamento instituído, data e local da coleta. Em seguida, os indivíduos foram submetidos ao raspado de células da mucosa bucal clinicamente saudável. O grupo controle foi submetido aos mesmos procedimentos realizados com o grupo caso. Este raspado foi realizado com espátulas plásticas estéreis e armazenado em tubos Eppendorf de 1500µl contendo uma solução tampão de Krebs (ANEXO D) e, em seguida, congelados a – 20°C. Foram obtidos dois raspados de cada indivíduo.

Posteriormente foi extraído o DNA do raspado obtido e a região do gene a ser estudada foi amplificada através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os resultados foram visualizados e avaliados através de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida. A FIGURA 2 apresenta um esquema do desenho do estudo.

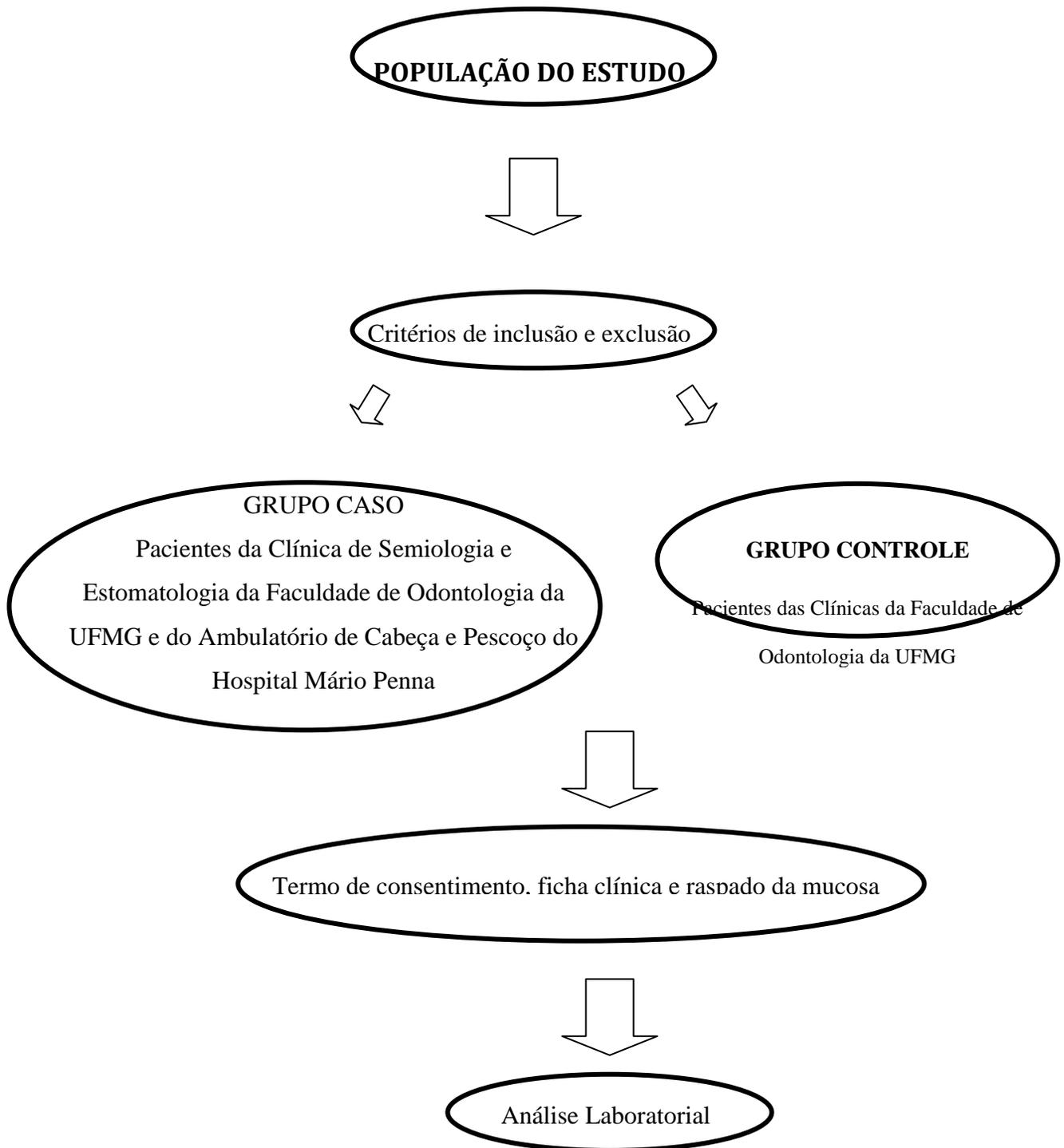


Figura 2. Diagrama do desenho do estudo

3.2. ÁREA DE ESTUDO

A Clínica de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da UFMG é centro de referência para doenças da boca no Estado de Minas Gerais e atende pacientes pelo Sistema Único de Saúde. O Ambulatório de Cabeça e Pescoço do Hospital Mário Penna é também centro de referência para o câncer de cabeça e pescoço e atende pacientes pelo Sistema Único de Saúde.

3.3. POPULAÇÃO DE ESTUDO

3.3.1. FONTES E CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE – GRUPO CASO

O grupo caso foi constituído por indivíduos com diagnóstico clínico e histopatológico de CCEB. A seleção dos participantes e coleta das amostras da pesquisa foram realizadas na Clínica de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais e no Ambulatório de Cabeça e Pescoço do Hospital Mário Penna.

Os critérios para a inclusão do indivíduo na pesquisa foram:

- A) Diagnóstico clínico e histopatológico de CCEB;
- B) Indivíduo ainda não submetido a tratamento ou submetido apenas à remoção cirúrgica do tumor.
- C) Indivíduo tabagista ou ex-tabagista (indivíduos que fumaram 20 cigarros por dia, por mais de 20 anos)

Os critérios para a exclusão do indivíduo desta pesquisa foram considerados nas seguintes situações:

- A) Indivíduo que não concordou em participar do estudo;
- B) Indivíduo muito debilitado fisicamente e/ou emocionalmente pela doença;
- C) Indivíduo submetido à radioterapia;
- D) Os indivíduos que apresentavam carcinoma de lábio foram excluídos em função

da sua etiologia e comportamento diferirem do carcinoma de células escamosas das outras regiões da boca.

3.3.2. FONTE E CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE – GRUPO CONTROLE

O grupo controle foi selecionado nas Clínicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais e incluídos no estudo de acordo com os seguintes critérios:

- A) Mucosa bucal saudável;
- B) Indivíduo tabagista.

Os indivíduos que não concordaram em participar do estudo foram excluídos. Os indivíduos do grupo controle consumiam mais de 20 cigarros por dia, por mais de 20 anos. Os não fumantes foram excluídos do grupo controle intencionalmente porque no grupo caso todos os indivíduos são fumantes ou ex-fumantes.

O consumo de cigarro foi avaliado estabelecendo-se a seguinte equivalência: 20 cigarros industrializados = 04 cigarros de palha com fumo de rolo = 04 charutos = 05 cachimbos = 1 maço (FRANCO *et al.*, 1989; SCHLECHT *et al.*, 1999). Foram considerados ex-fumantes aqueles indivíduos que abandonaram o vício há mais de 2 anos (MORENO-LÓPEZ *et al.*, 2000).

Os indivíduos dos dois grupos foram questionados a respeito do consumo de álcool, entretanto, devido à dificuldade de obtenção de respostas exatas quanto à qualidade e quantidade, este hábito não foi considerado em nosso estudo.

3.3.3. AMOSTRA

Participaram do estudo 100 indivíduos com CCEB e 100 indivíduos controles pareados por sexo e faixa etária. Os participantes foram divididos em faixas etárias com intervalos de 10 anos (abaixo de 40 anos, 41 a 50 anos, 51 a 60 anos, 61 a 70 anos, acima de 71 anos).

Foram obtidos raspados de mucosa clinicamente saudável e, no caso dos indivíduos doentes, numa região mais afastada possível do tumor. O raspado foi realizado com espátulas plásticas devidamente embaladas e autoclavadas. As amostras foram armazenadas em solução tampão de Krebs e, posteriormente, congeladas a -20°C .

3.4. EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA foi realizada segundo técnica descrita por BOOM *et al.* (1990). O produto da raspagem da mucosa normal foi adicionado a 900 μl de tampão de lise (970mg/ml

GuHCl, 0,1 mol/l Tris-HCl pH 6.4, 0,2 mol/l EDTA pH 8.0, 26 mg/ml Triton X-100) e a 40µl de suspensão de sílica. A mistura foi agitada em vortex por alguns segundos, incubada em banho de areia a 56°C por 10 minutos e posteriormente centrifugada em microcentrífuga (13000g). Após o descarte do sobrenadante, o pellet de sílica foi lavado 2 vezes com tampão de lavagem (970mg/ml GuHCl, 0,1 mol/l Tris HCl pH 4.0), repetindo-se a centrifugação entre cada lavagem. Outras duas lavagens sucessivas foram realizadas com etanol 70% e uma última com acetona. O sobrenadante foi descartado e a sílica seca a 56°C (3 a 5 minutos). Posteriormente adicionou-se 100µl de tampão TE, agitou-se em vortex e incubou-se a 56°C por 10 minutos. Finalmente, a mistura foi centrifugada por 2 minutos e o sobrenadante contendo o DNA transferido para outro tubo.

3.5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A técnica consiste na replicação *in vitro* de fragmentos de DNA, através da utilização de uma DNA polimerase. A técnica utiliza pares de oligonucleotídeos que delimitam o segmento desejado e funcionam como iniciadores da reação (*primers*), uma solução de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) e uma DNA polimerase termoestável (*Thermus aquaticus* – *Taq* DNA polimerase), adicionados a uma alíquota do DNA a ser amplificada e a um tampão de incubação específico.

A amplificação pela PCR envolve ciclos repetidos de desnaturação a quente (94°C) do DNA, anelamento dos iniciadores às sequências complementares e extensão dos iniciadores anelados pela *Taq* DNA polimerase. A cada ciclo sucessivo duplica-se a quantidade de DNA

sintetizada no ciclo anterior. Isso resulta no acúmulo exponencial do fragmento específico, aproximadamente 2^n , onde n é o número de ciclos (SAIKI *et al.*, 1985) (FIGURA 3).

Os iniciadores utilizados nas reações de PCR estão descritos na TABELA 1 e os protocolos referentes a cada reação realizada podem ser observados na TABELA 2.

3.5.1. ANÁLISE DO GENE *CYP1A1*

A amplificação do fragmento correspondente ao exon 7 do gene *CYP1A1* foi realizada pela PCR. Foram utilizados 3 iniciadores (primers), denominados iniciadores A, G (iniciadores senso) e R (iniciador antisenso). Para cada amostra foi realizada uma reação com um par específico, ou seja, primer A e primer R para amplificar o alelo que codifica a enzima *CYP1A1* contendo isoleucina no códon 462 (*CYP1A1*^{462Ile}) e primer G e primer R para amplificar o alelo que codifica a enzima *CYP1A1* contendo valina no códon 462 (*CYP1A1*^{462Val}). O fragmento correspondente ao *CYP1A1*^{462Ile} possui 211 pares de base e o produto correspondente ao *CYP1A1*^{462Val} possui 208 pares de base.

3.5.2. ANÁLISE DO GENE *CYP2E1*

A amplificação da região promotora 5' do gene *CYP2E1* foi realizada pela PCR e a análise dos polimorfismos localizados nesta região foi realizada através de digestão dos produtos da PCR com as enzimas de restrição *RsaI* e *PstI*. O produto da reação de PCR possui 412 pares de base.

A análise de restrição consiste na utilização de endonucleases capazes de reconhecer certas sequências de nucleotídeos e clivar a molécula de DNA nestas regiões. Estas

endonucleases são denominadas enzimas de restrição e as sequências reconhecidas são os sítios de restrição. A digestão de fragmentos de DNA com enzimas de restrição é utilizada na identificação de mutações capazes de promover alterações em sítios específicos (WATSON et al., 1997). O protocolo utilizado para a identificação dos polimorfismos do gene *CYP2E1* através da incubação com as enzimas *RsaI* e *PstI* está descrito na TABELA 2. A presença do sítio de restrição para a enzima *RsaI* determina a presença de uma banda de 351 pares de base e outra de 61 pares de base. No caso da enzima *PstI*, as bandas observadas são de 294 e 118 pares de base. A presença da banda de 412 pares de base referente à amplificação da região promotora do gene *CYP2E1* juntamente com os produtos das digestões indica indivíduo heterozigoto.

3.5.3. ANÁLISE DOS GENES *GSTM1* E *GSTT1*

A identificação das deleções dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foi realizada através da reação em cadeia da polimerase. O produto de PCR do indivíduo homozigoto para a presença do gene *GSTM1* ou heterozigoto possui 220 pares de base. O produto relativo à presença de pelo menos um alelo gene *GSTT1* possui 450 pares de base. Aqueles indivíduos com os dois alelos deletados (*GSTM1* 0/0 ou *GSTT1* 0/0) não apresentaram produto da reação em cadeia da polimerase.

Para a análise das frequências dos genótipos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, os indivíduos homozigotos para a presença do gene (+/+) e os indivíduos heterozigotos (+/0) foram considerados do mesmo grupo (*GSTM1* ou *GSTT1* positivos). As amostras também foram submetidas à amplificação pela PCR do gene *β -globina* para confirmar a presença de DNA.

3.5.4. CONTROLES NEGATIVOS

Para cada reação de PCR realizada foi feito um controle negativo contendo todos os reagentes necessários, com exceção da amostra de DNA. Os controles negativos indicam a ausência de contaminação nos componentes da reação.

TABELA 1

SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR	
GENE	SEQUÊNCIA DO INICIADOR
CYP1A1	<i>CYP1A1 A</i> - 5`GAAGTGTATCGGTGAGACCA3`
	<i>CYP1A1 G</i> - 5`GTGTATCGGTGAGACCG3`
	<i>CYP1A1 R</i> - 5`GTAGACAGAGTCTAGGCCTCA3`
CYP2E1	Senso 5`CCAGTCGAGTCTACATTGTCA3`
	Antisenso 5`TTCATTCTGTCTTCTAACTGG3`
GSTM1	Senso 5`GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC3`
	Antisenso 5`GTTGGGCTCAAATATACGGTGG3`
GSTT1	Senso 5`TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC3`
	Antisenso 5`TCACCGGATCATGGCCAGCA3`

TABELA 2

Protocolos das reações de PCR e análises de restrição

GENES	PROTOCOLOS
<i>CYP1A1</i>	<p>- A PCR foi realizada utilizando-se 5,0µL de DNA, 13,75µL de H₂O, 2,5µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), 2,5µL de tampão, 0,5µL de cada <i>primer</i> e 0,25µL da enzima Taq DNA polimerase.</p> <p>- A reação foi realizada de acordo com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 5', 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30'', anelamento a 58°C por 1' e extensão a 72°C por 1', seguida de extensão final a 72°C por 10'.</p>
<i>CYP2E1</i>	<p>- A PCR foi realizada utilizando-se 5,0µL de DNA, 11,356µL de H₂O, 5,0µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), 2,5µL de tampão, 0,446µL do <i>primer</i> 5', 0,448µL do <i>primer</i> 3' e 0,25µL da enzima Taq DNA polimerase.</p> <p>- A reação foi realizada de acordo com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 2', 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30'', anelamento a 58°C por 30'' e extensão a 72°C por 45'', seguida de extensão final a 72°C por 10'.</p> <p>- Enzima RsaI (10U/µL) – digestão com 5 unidades (0,5µL), tampão <i>Buffer C</i> (1,0µL), H₂O (3,5µL). Incubação a 37°C por 4h. Inativação enzimática a 65°C por 15'.</p> <p>- Enzima PstI (10U/µL) – digestão com 3 unidades (0,3µL), tampão <i>Buffer H</i> (1,4µL), H₂O (3,3µL). Incubação a 37°C por 4h. Inativação enzimática a 65°C por 15'.</p>
<i>GSTM1</i>	<p>- A PCR foi realizada utilizando-se 5,0µL de DNA, 11,4µL de H₂O, 5,0µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), 2,5µL de tampão, 0,425µL de cada <i>primer</i> e 0,25µL da enzima Taq DNA polimerase.</p> <p>- A reação foi realizada de acordo com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 5', 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30'', anelamento a 64°C por 1' e extensão a 72°C</p>

por 1`, seguida de extensão final a 72°C por 5`.

GSTT1 - A PCR foi realizada utilizando-se 5,0µL de DNA, 11,112µL de H₂O, 5,0µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), 2,5µL de tampão, 0,604µL do *primer* 5`, 0,534µL do *primer* 3` e 0,25µL da enzima Taq DNA polimerase.

- A reação foi realizada de acordo com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 5`, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30`, anelamento a 64°C por 1` e extensão a 72°C por 1`, seguida de extensão final a 72°C por 5`.

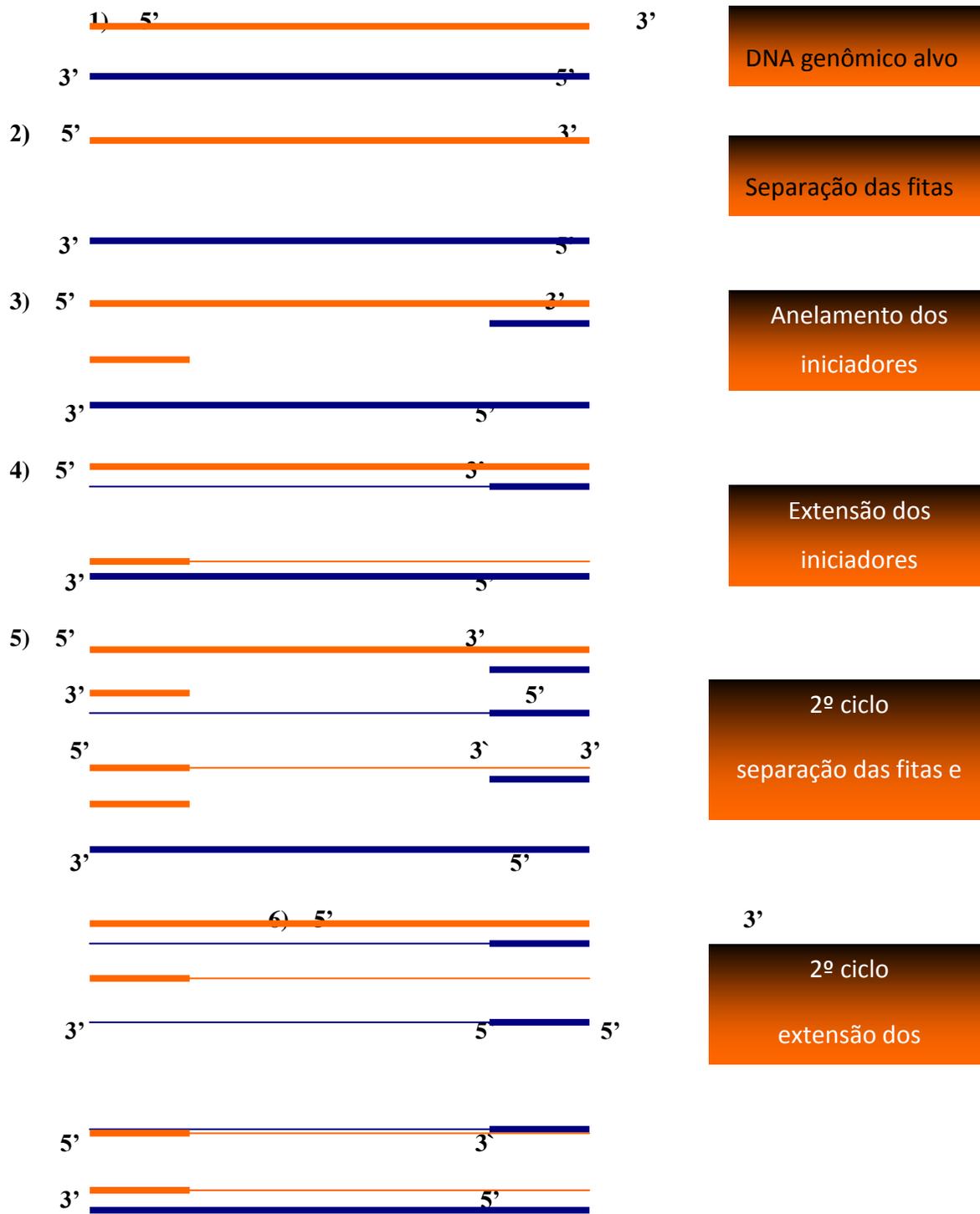


Figura.3 – Representação esquemática da Reação em Cadeia da Polimerase

3.6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E COLORAÇÃO PELA PRATA

Os produtos da PCR foram verificados através da eletroforese em gel de poliacrilamida (MANIATIS *et al.*, 1982). Foram aplicados 3,0µl de cada produto juntamente com 1,0µl de *gel loading buffer* (GLB) no gel a 6,5%. A corrida foi realizada em tampão TBE 1x, a 160V, durante aproximadamente 30 minutos, utilizando-se cuba específica (*mini vertical gel electrophoresis unit, Sigma*). Os produtos da análise de restrição foram aplicados em gel de poliacrilamida a 8,0%. A corrida foi realizada em tampão TBE 1x, a 300V, durante aproximadamente 60 minutos. Posteriormente, cada gel foi corado pela prata para verificação e análise do material amplificado, seguindo-se uma adaptação do método descrito por BASSAM *et al.* (1991), que consiste na imersão de cada gel em uma série de soluções específicas, numa ordem definida (TABELA3). Após o término do processo, os géis foram secos em papel celofane.

Tabela 3

Soluções	Tempo Regular
Ácido acético 10%	10 minutos
Água destilada	3 minutos
Solução de prata (ANEXO G)	8 a 10 minutos
Água destilada	30 segundos (2 lavagens)
Solução reveladora (ANEXO G)	O suficiente
Ácido acético 10%	Paralização da reação

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação das frequências dos genótipos dos genes estudados entre os dois grupos foi realizada através de análise univariada, utilizando-se o teste do Qui-quadrado e o teste exato de Fisher. O teste do Qui-quadrado pode ser utilizado para se determinar a significância das diferenças entre dois ou mais grupos independentes. A aplicação do teste Qui-quadrado requer que as frequências esperadas em cada célula sejam significativas, sendo que nenhum valor esperado pode ser igual a zero e pelo menos 20% das células devem ter valor esperado maior ou igual a 5. Quando qualquer um desses pressupostos foi quebrado utilizou-se o teste de Fisher. Para se medir o risco para cada um dos parâmetros analisados foi utilizado o *Odds Ratio* (OR) que calcula a vantagem de um dos eventos avaliados em relação ao outro (SIEGEL & CASTELLAN JR, 1988). O nível de significância adotado foi 5,0%.

3.8. ASPECTOS ÉTICOS

A realização deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG), conforme parecer no. ETIC 058/01.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os resultados das reações realizadas para cada gene estudado estão representados nas FIG. 4 a 8. As figuras mostram os géis de poliacrilamida contendo as bandas relacionadas aos produtos de amplificação por PCR e de digestão com endonucleases de restrição.

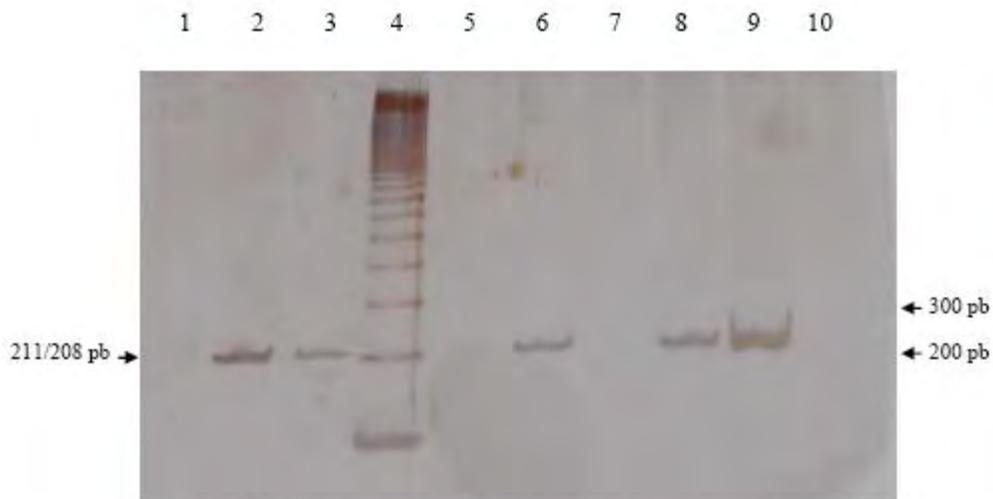


FIGURA 4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6.5% representando produtos de PCR para o gene *CYP11A1*. Canaletas 1 e 2: indivíduo homocigoto G/G (Val/Val); canaletas 3 e 5: indivíduo homocigoto A/A (Ile/Ile); canaleta 4: padrão de peso molecular de 100pb; canaletas 6 e 7: indivíduo homocigoto A/A; canaletas 8 e 9: indivíduo heterocigoto A/G (Ile/Val); canaleta 10: controle negativo. PCR – 35 ciclos

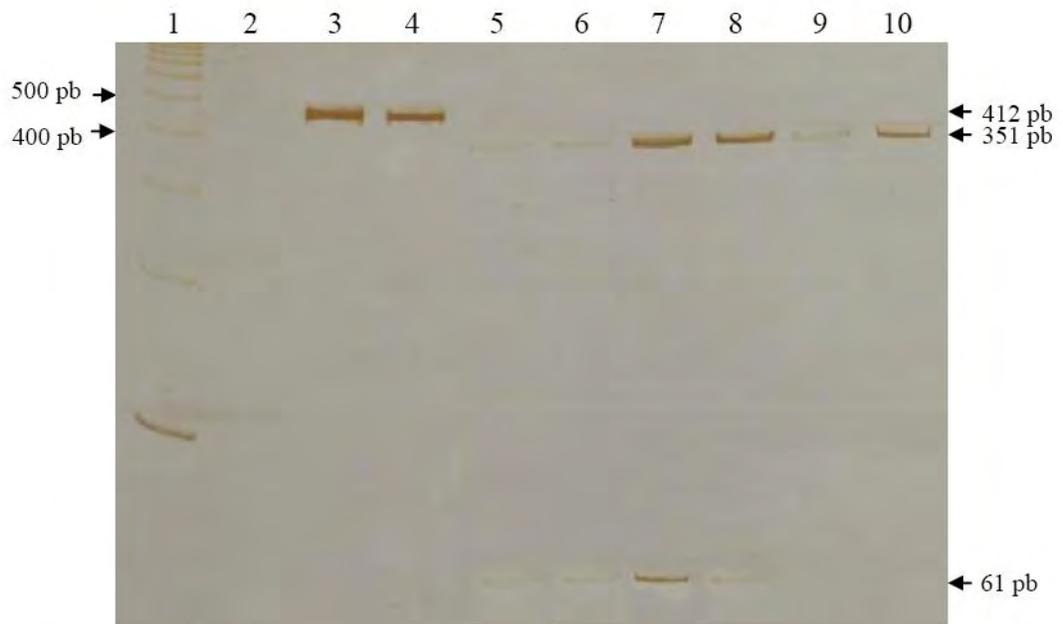


Figura 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% representando a análise de restrição do polimorfismo RsaI do gene *CYP2E1*. Canaleta 1: padrão de peso molecular de 100 pares de base; Canaleta 2: controle negativo; Canaletas 3 e 4: ausência do sítio para RsaI; Canaletas 5 a 10: presença do sítio RsaI.

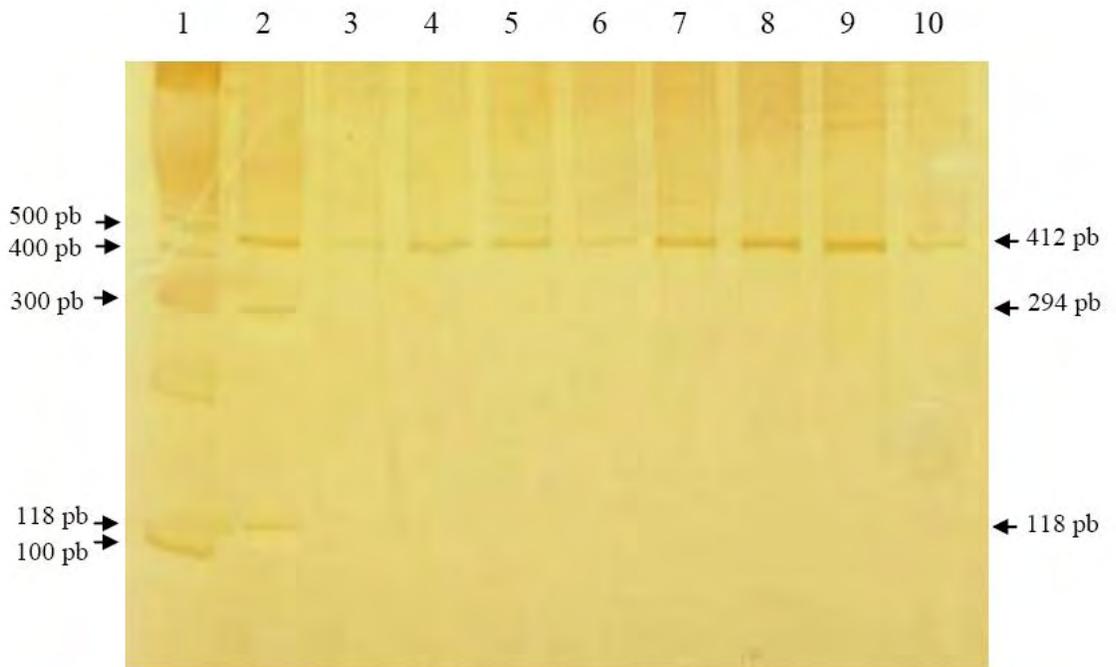


Figura 6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% representando a análise de restrição do polimorfismo PstI do gene *CYP2E1*. Canaleta 1: padrão de peso molecular de 100 pares de base; canaleta 2: controle positivo heterozigoto; canaletas 3 a 10: ausência do sítio para PstI.

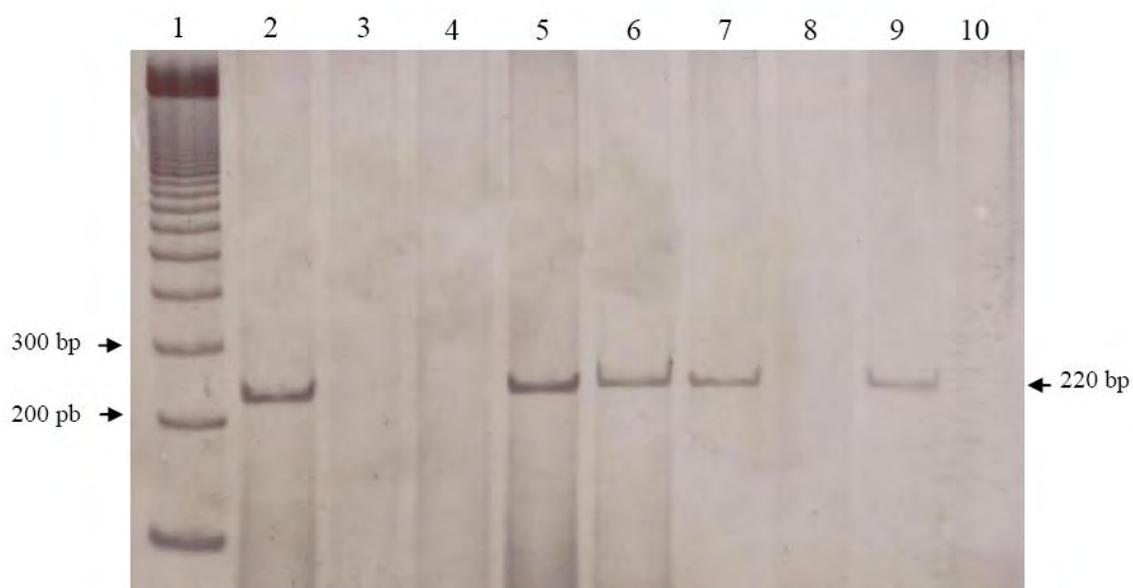
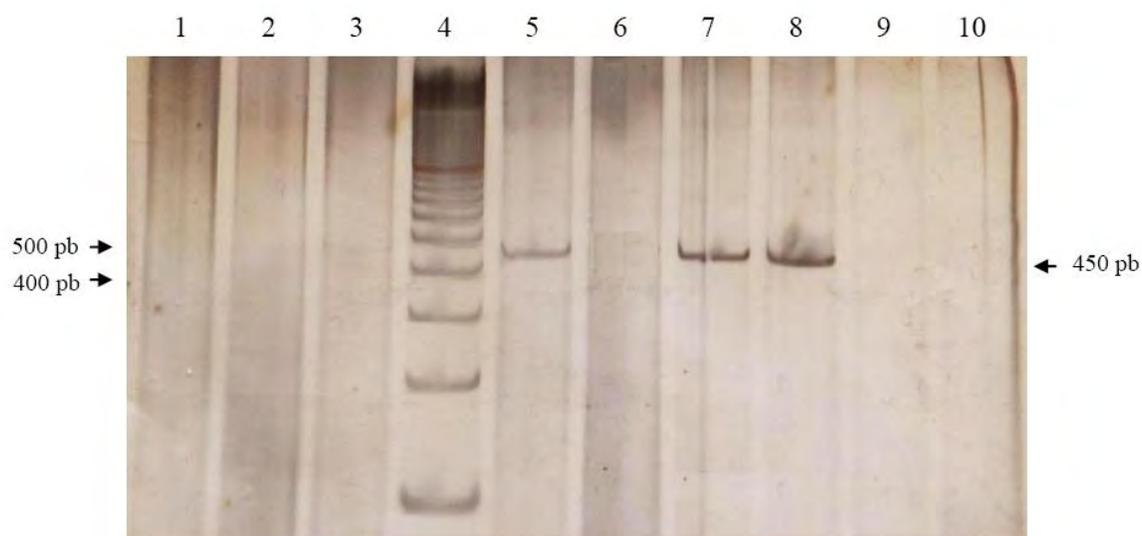


FIGURA 7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6.5% representando produtos de PCR para o gene *GSTM1*. Canaleta 1: padrão de peso molecular de 100pb; canaletas 2, 5, 6, 7 e 9: indivíduos positivos para o *GSTM1*; canaleta 3: controle negativo; canaletas 4, 8 e 10: indivíduos com deleção do *GSTM1*.
PCR – 35 ciclos



**FIGURA 8 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6.5% representando produtos de PCR para o gene *GSTT1*. Canaletas 1, 2, 3, 6 e 10: indivíduos com deleção do *GSTT1*; canaleta 4: padrão de peso molecular de 100pb; canaletas 5, 7 e 8: indivíduos positivos para o *GSTT1*; canaleta 9: controle negativo.
PCR – 35 ciclos**

Os grupos casos e controles estão descritos na TAB. 4. As frequências dos genótipos relacionados aos polimorfismos dos genes CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 foram analisadas separadamente nos indivíduos dos grupos casos e controles e podem ser observadas na TAB. 5. Os resultados demonstram que não houve relação entre os polimorfismos dos genes CYP1A1 e CYP2E1 e o carcinoma epidermóide de boca, uma vez que as diferenças entre os

genótipos nos diferentes grupos não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Os polimorfismos nos genes estudados da superfamília citocromo P-450 não seriam, portanto, fatores de risco isolados para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide de boca.

As diferenças entre as variantes polimórficas dos genes GSTM1 e GSTT1 nos grupos casos e controles foram estatisticamente significativas, demonstrando que indivíduos com deficiência da enzima GSTM1 (genótipo GSTM1 nulo) têm maior risco para o câncer bucal ($p = 0,022$; Odds ratio O.R.=2,00) e que indivíduos com ausência de atividade da enzima GSTT1 (genótipo GSTT1) também têm maior susceptibilidade ao câncer de boca ($p = 0,0000$; Odds ratio O.R.=5,41).

TABELA 4

	CASOS (N=100)	CONTROLES (N=100)
Sexo Masculino	80	75
Sexo Feminino	20	25
Média de idade	56,5 anos (40 – 84 anos)	51,2 anos (34 – 86 anos)
Faixa etária		
< 40 anos	3	6
41 a 50 anos	32	36
51 a 60 anos	32	40
61 a 70 anos	18	12
> 71 anos	8	4

TABELA 5

FREQUÊNCIAS DOS GENÓTIPOS DOS GENES CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 E GSTT1 NOS CASOS E CONTROLES

	Casos	CONTROLES	P	ODDS RATIO
	N=100	N=100		(O.R.)
Gene CYP1A1				
Ile/Ile	42	30		
Ile/Val	53	63	$P>0,05$ (Val/Val versus Ile/Ile e Ile/Val)	n.s.
Val/Val	5	7		
Gene CYP2E1				
RsaI +/+	85	54		
RsaI +/-	15	45		
RsaI -/-	0	1	$P>0,05$ (+/+ versus +/-)	n.s.
PstI +/+	0	0		
PstI +/-	9	8	$P>0,05$ (+/- versus -/-)	n.s.
PstI -/-	91	92		
Gene GSTM1				
0/0	64	47	$P=0,022$	O.R.=2,00
0/+ ou +/+	36	53		
Gene GSTT1				
0/0	79	41	$P=0,0000$	O.R.=5,41
0/+ ou +/+	21	59		

N – nº de indivíduos / Ile/Ile – homozigoto isoleucina / Ile/Val – heterozigoto / Val/Val – homozigoto valina / 0/0 – homozigoto GSTM1 ou GSTT1 nulo / 0/+ - heterozigoto / +/+ - homozigoto para a presença dos genes GSTM1 ou GSTT1 / P – nível de significância / n.s. – não significativo

As freqüências das variantes polimórficas dos genes estudados também foram analisadas de acordo com o sexo dos indivíduos. Os resultados estão representados nas TAB. 6, 7, 8 e 9. As freqüências genóticas não diferem em valores estatisticamente significativos para os polimorfismos dos genes CYP2E1 e CYP1A1, não havendo, portanto maior risco para homens ou mulheres. Os resultados mostraram, entretanto, diferenças significativas em relação à deleção dos genes GSTM1 e GSTT1. Indivíduos do sexo masculino com genótipo GSTM1 nulo apresentam risco maior para o desenvolvimento de câncer bucal (O.R.=2,53). Com relação à deficiência do gene GSTT1, homens com genótipo GSTT1 nulo têm risco aumentado em 6 vezes (O.R.=6,22) e mulheres em 13 vezes (O.R.=13,5).

TABELA 6
DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO CYP1A1 EM RELAÇÃO AO SEXO DOS INDIVÍDUOS

	SEXO	GENÓTIPO CYP1A1		
		Ile/Ile (A/A)	Ile/Val (A/G)	Val/Val (G/G)
Casos (N=100)	M (N=80)	28 (35,0%)	47 (58,8%)	5 (6,2%)
	F (N=20)	16 (80,0%)	4 (20,0%)	0
Controles (N=100)	M (N=75)	24 (32,0%)	46 (61,3%)	5 (6,7%)
	F (N=25)	4 (16,0%)	19 (76,0%)	2 (8,0%)

N – nº de indivíduos / Ile/Ile – homozigoto isoleucina / Ile/Val – heterozigoto / Val/Val – homozigoto valina /

M – sexo masculino / F – sexo feminino

TABELA 7

DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO GENE CYP2E1 EM RELAÇÃO AO SEXO DOS INDIVÍDUOS

SEXO		GENÓTIPO CYP2E1					
		RsaI +/+	RsaI +/-	RsaI -/-	PstI +/+	PstI +/-	PstI -/-
Casos	M (N=80)	63	17	0	0	4	76
	(N=100)	(78,8%)	(21,2%)	(0%)	(0%)	(5,0%)	(95,0%)
	F (N=20)	12	8	0	0	4	16
		(60,0%)	(40,0%)	(0%)	(0%)	(20,0%)	(80,0%)
Controles	M (N=75)	32	42	1	0	4	71
	(N=100)	(42,7%)	(56%)	(1,3%)	(0%)	(5,3%)	(94,7%)
	F (N=25)	9	16	0	0	4	21
		(36,0%)	(64,0%)	(0%)	(0%)	(16,0%)	(84,0%)

	SEXO	TABELA 8	
		0/0	0/+ ou +/+
Casos (N=100)	M (N=80)	53 (66,3%)	27 (33,7%)
	F (n=20)	8 (40,0%)	12 (60,0%)
Controles (N=100)	M (n=75)	38 (50,7%)	37 (49,3%)
	F (n=25)	10 (40,0%)	15 (60,0%)

N – n° de indivíduos / 0/0 – homozigoto GSTM1 nulo / 0/+ - heterozigoto / +/+ - homozigoto para a presença do gene GSTM1 / M – sexo masculino / F – sexo feminino

Sexo masculino – $\chi^2=6,408$ / $p=0,018$ / odds ratio O.R.=2,53

TABELA 9**DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO GSTT1 EM RELAÇÃO AO SEXO DOS INDIVÍDUOS**

	SEXO	GENÓTIPO GSTT1	
		0/0	0/+ ou +/+
Casos (N=100)	M (N=80)	66 (82,5%)	14 (17,5%)
	F (N=20)	14 (70,0%)	6 (30,0%)
Controles (N=100)	M (N=75)	32 (42,7%)	43 (57,3%)
	F (N=25)	7 (28,0%)	18 (72,0%)

N – n° de indivíduos / 0/0 – homozigoto GSTT1 nulo / 0/+ - heterozigoto / +/+ - homozigoto para a presença do gene GSTT1 / M – sexo masculino / F – sexo feminino; Sexo masculino – $\chi^2=22,834$ / $p=0,0000$ / odds ratio O.R.=6,22

As TAB. 9, 10, 11 e 12 mostram a prevalência dos genótipos relativos aos polimorfismos dos genes estudados após estratificação dos indivíduos do grupo caso segundo a localização do tumor. Não houve relação entre os polimorfismos dos genes CYP1A1 e CYP2E1 e susceptibilidade ao câncer bucal em qualquer localização na cavidade bucal. Em relação às deleções dos genes GSTM1 e GSTT1, os resultados foram estatisticamente significativos. Indivíduos com o genótipo GSTM1 nulo têm maior risco para desenvolver carcinoma epidermóide de assoalho bucal (O.R.=3.67) e aqueles com genótipo GSTT1 nulo também têm maior susceptibilidade para câncer de assoalho bucal (O.R.=13,82).

TABELA 10

DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO CYP1A1 EM RELAÇÃO À LOCALIZAÇÃO DO TUMOR

	GENÓTIPO CYP1A1		
	Ile/Ile (A/A)	Ile/Val (A/G)	Val/Val (G/G)
Controles (N=100)	30	63	7
Casos (N=100)			
Assoalho (N=32)	14 (43,7%)	14 (43,7%)	4 (12,6%)
Língua (N=31)	11 (35,5%)	20 (64,5%)	0 (0%)
Rebordo alveolar (N=12)	5 (41,7%)	7 (58,3%)	0 (0%)
Palato (N=10)	5 (50,0%)	4 (40,0%)	1 (10,0%)
Trígono Retromolar (N=12)	5 (41,7%)	7 (58,3%)	0 (0,0%)
Mucosa Jugal (N=3)	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0 (0,0%)

N – nº de indivíduos / Ile/Ile – homozigoto isoleucina / Ile/Val – heterozigoto / Val/Val – homozigoto valina

TABELA 11

	GENÓTIPOS GSTM1		ODDS RATIO (OR)
	0/0	0/+ ou +/+	
Controles (N=82)	40 (48,7%)	42 (51,3%)	-
Casos (N=70)			-
Assoalho (N=18)	14 (77,8%)	4 (22,2%)	3,67
Língua (N=23)	14 (61,0%)	9 (39,0%)	n.s.
Gengiva (N=11)	5 (45,5%)	6 (54,5%)	n.s.
Palato (N=8)	5 (62,5%)	3 (37,5%)	n.s.
Trígono Retromolar (N=7)	6 (85,7%)	1 (14,3%)	n.s.
Mucosa Jugal (N=3)	2 (66,6%)	1 (33,4%)	n.s.

N – n° de indivíduos / 0/0 – homozigoto GSTM1 nulo / 0/+ - heterozigoto / +/+ - homozigoto para a presença do gene GSTM1 / n.s. – não significativo

Assoalho – $\chi^2=4,996$ / $p=0,04$

TABELA 12

DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO GSTT1 EM RELAÇÃO À LOCALIZAÇÃO DO TUMOR

	GENÓTIPOS GSTT1		ODDS RATIO
	0/0	0/+ ou +/+	
Controles (N=100)	47	53	-
Casos (N=100)			-
Assoalho (N=32)	22 (68,7%)	10 (31,3%)	2,48
Língua (N=31)	19 (61,3%)	12 (38,7%)	n.s.
Gengiva (N=11)	9 (81,8%)	2 (18,1%)	6,22
Palato (N=10)	7 (70,0%)	3 (30,0%)	n.s.
Trígono Retromolar (N=12)	10 (83,3%)	2 (16,7%)	6,91
Mucosa Jugal (N=3)	3 (100,0%)	0 (0,0%)	n.s.

N – nº de indivíduos / 0/0 – homozigoto GSTT1 nulo / 0/+ - heterozigoto / +/+ - homozigoto para a presença dos genes GSTT1 / n.s. – não significativo

Assoalho – $\chi^2=16,610$ / $p=0,0000$

Língua - $\chi^2=14,250$ / $p=0,0002$

Este trabalho também comparou os grupos de indivíduos estudados em relação aos diversos genótipos de maneira combinada, ou seja, considerando-se dois ou mais genes diferentes. Os resultados nos mostram valores estatisticamente significativos, nos quais indivíduos com genótipo GSTT1 e GSTM1 nulos têm risco 15 (quinze) vezes maior (O.R.=15,23) para o carcinoma epidermóide de boca, comparando-se com indivíduos que não apresentam a deleção em GSTT1 e GSTM1 (positivos para os genes) (TAB.13). Naqueles com

genótipo GSTT1 nulo e GSTM1 positivo o risco é aproximadamente 6 vezes maior (O.R.=6,18) (TAB. 14). Não houve resultados estatisticamente significativos quando comparamos indivíduos GSTT1 positivos e GSTM1 nulos com indivíduos positivos para os dois genes (TAB.15)

TABELA 13

FREQUÊNCIAS DOS GENÓTIPOS COMBINADOS DOS GENES GSTM1 E GSTT1

	GENÓTIPO GSTT1/GSTM1	
	nulo/nulo	positivo/positivo
Casos (N=72)	44	4
Controles (N=71)	13	18

N – nº de indivíduos

$\chi^2=23,184 / p=0,0000 / O.R.=15,23$

TABELA 14

GENÓTIPO GSTT1/GSTM1

	nulo/positivo	positivo/positivo
	Casos (N=72)	22
Controles (N=71)	16	18

N – nº de indivíduos

TABELA 15

	GENÓTIPO GSTT1/GSTM1	
	positivo/nulo	positivo/positivo
Casos (N=72)	2	4
Controles (N=71)	24	18

N – n° de indivíduos

Resultados não significativos – $p > 0.05$

Foram realizadas também análises combinadas dos polimorfismos dos genes GSTM1 versus CYP1A1, GSTM1 versus CYP2E1, GSTT1 versus CYP1A1 e GSTT1 versus CYP2E1.

Os resultados não foram estatisticamente significativos.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O consumo de tabaco é um fator de risco importante para o carcinoma de células escamosas de boca (CCEB), uma vez que contem vários compostos carcinogênicos ou pré-carcinogênicos. Estas substâncias ditas xenobióticas são metabolizadas por vários grupos enzimáticos e a susceptibilidade genética ao câncer pode ser avaliada por variações individuais no grau de expressão e atividade destas enzimas, devido a existência de polimorfismos nos genes que codificam tais enzimas (OUDE-OPHUIS *et al.*, 1998). A identificação desses polimorfismos em estudos de epidemiologia molecular do tipo caso-controle permite a formulação de hipóteses que procuram explicar o alto grau de variabilidade individual na susceptibilidade ao câncer (GARTE *et al.*, 2001). Os polimorfismos genéticos relacionados às enzimas responsáveis pelo metabolismo dos agentes químicos exógenos podem ser considerados fatores de risco importantes ao desenvolvimento do câncer, particularmente quando os estudos analisam polimorfismos em vários genes funcionalmente associados (KNUDSEN *et al.*, 2001).

Alguns autores questionam o poder estatístico de trabalhos que descrevem os genótipos relacionados a polimorfismos genéticos sem os relacionar com a avaliação da atividade enzimática (KRONIG-GREGER *et al.*, 2004). TAIOLI *et al.* (2004) afirmam que os estudos do tipo caso-controle têm poder estatístico suficiente para determinar se existe associação entre um polimorfismo genético e uma determinada doença.

O padrão de expressão das enzimas dos sistemas CYP450 e GST nos diferentes tecidos humanos é variável (PACIFICI *et al.*, 1986) e pode ser influenciado pela presença dos respectivos substratos (CARO & CEDERBAUM *et al.*, 2004). Embora o principal sítio de

expressão e atividade das enzimas de fase I e fase II abordadas neste estudo seja o fígado, tecidos extra-hepáticos também apresentam expressão e atividade significativas destas enzimas (VONDRACEK *et al.*, 2001). As células da mucosa bucal apresentam expressão e atividade das enzimas CYP1A1 e CYP2E1 (VONDRACEK *et al.*, 2001) e, em relação às glutatonas S-transferases GSTM1 e GSTT1, os estudos demonstram níveis baixos de expressão na mucosa bucal normal (CHEN *et al.*, 1995) e níveis mais elevados nas glândulas salivares (CORRIGAL & KIRSCH, 1988). Os metabólitos gerados pelas enzimas CYP450 no fígado e que não sofreram a atividade das glutatonas S-transferases podem ser transportados, via circulação sistêmica, aos diversos tecidos do organismo (ALEXANDROV *et al.*, 2002).

Neste trabalho investigamos a associação entre os polimorfismos dos genes *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTT1* e o risco para o desenvolvimento do CCEB em uma população brasileira.

A determinação dos polimorfismos dos genes estudados foi realizada através da reação de PCR e por digestão com enzimas de restrição. A técnica de PCR está sujeita a contaminação e consequente resultado falso-positivo (CLEWLEY, 1995). Uma fonte comum de contaminação são os produtos de reações de amplificações anteriores. Uma mistura da reação de PCR completa pode conter até 10^{13} fragmentos amplificados, sendo que qualquer volume, como o de gotículas de aerosol de uma ponteira de pipeta, pode conter um grande número de moléculas amplificáveis. Em qualquer experimento com PCR é essencial a utilização sistemática dos os controles negativos (WATSON *et al.*, 1997).

A eficiência das reações com endonucleases de restrição depende de algumas condições da reação como temperatura, pH, concentração de sais e pureza do DNA utilizado.

A atividade da enzima pode ser inibida pela presença de contaminantes na amostra de DNA (proteínas, etanol, EDTA, entre outros) (SMITH *et al.*, 1976). Visando minimizar este problema, nossas reações de digestão foram realizadas utilizando tampões adequados fornecidos pelo fabricante e o tempo de incubação foi de quatro horas para permitir maior atividade enzimática.

O DNA genômico dos indivíduos foi extraído a partir de células de mucosa clinicamente normal. TONG *et al.* (2000) e MARSHALL *et al.* (2000) contestaram o uso de DNA extraído a partir de amostras do tumor para análise de polimorfismos, sugerindo que os resultados podem ser incorretos. Uma fonte de desvio importante seria a análise de DNA derivado de espécime tumoral, uma vez que a possível presença de mutações somáticas mascararia o genótipo correto do indivíduo. É importante salientar que a mucosa clinicamente normal pode apresentar alterações moleculares precoces e que o raspado desta mucosa pode eventualmente coletar células neoplásicas descamadas do tumor. LE MARCHAND *et al.* (2001) concluíram que protocolos de purificação de células bucais através de bochechos são eficientes na obtenção de DNA genômico em quantidade e qualidade suficientes para avaliações envolvendo reações de PCR e PCR-RLFP.

Os resultados obtidos em relação ao polimorfismo do gene *CYP1A1* revelaram não haver diferenças estatisticamente significativas nas frequências das variantes polimórficas, sobretudo a *CYP1A1*^{462Val}, entre os grupos caso e controle. O estudo das frequências alélicas para este gene também não demonstrou resultados significativos. A possível relação entre o polimorfismo no exon 7 do *CYP1A1* e o risco ao CCEB também não foi confirmada por KATOH *et al.* (1999) e HAHN *et al.* (2002). Já SATO *et al.* (2000), SREELEKHA *et al.*

(2001) e KAO *et al.* (2002) concluíram que o genótipo *CYP1A1* Val/Val constitui um fator de risco para o CCEB. Alguns autores defendem a hipótese na qual a enzima *CYP1A1* contendo valina na posição 462 (*CYP1A1*^{462Val}) apresenta aumento da atividade enzimática, gerando maior quantidade de compostos tóxicos e, conseqüentemente, aumentando o risco ao desenvolvimento de tumores relacionados ao consumo de tabaco (KAWAJIRI *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1996; MOONEY *et al.*, 1997). Entretanto, PERSSON *et al.* (1997) estudaram as propriedades catalíticas das variantes polimórficas do *CYP1A1* (Ile/Val) e concluíram que as duas formas enzimáticas não diferem nas suas propriedades conformacionais e funcionais. Segundo os autores, os aminoácidos valina e isoleucina são altamente hidrofóbicos e estruturalmente similares. A comprovação da associação entre o polimorfismo no exon 7 do gene *CYP1A1* e a susceptibilidade ao câncer depende ainda da elucidação das conseqüências funcionais deste polimorfismo.

O nosso estudo também avaliou a frequência dos genótipos do gene *CYP2E1* e a frequência alélica deste gene. Os resultados mostraram que não houve associação entre os polimorfismos do gene *CYP2E1* e o desenvolvimento do CCEB. LIU *et al.* (2001) avaliaram o papel destes polimorfismos no risco ao CCEB e também não confirmaram tal associação. Entretanto, HUNG *et al.* (1997) observaram que indivíduos com o genótipo RsaI- / PstI+ podem apresentar risco aumentado para o CCEB. Em nosso estudo, nenhum indivíduo do grupo caso apresentou o genótipo raro RsaI- / PstI + ao qual alguns autores atribuem maior risco para o câncer. Nossos resultados demonstraram também que o alelo RsaI- foi mais frequente no grupo controle, contrariando a hipótese da possível relação entre a presença deste alelo com o risco aos tumores relacionados ao tabagismo (WATANABE *et al.*, 1994). A

discrepância entre os resultados obtidos neste estudo com relação aos genes *CYP1A1* e *CYP2E1* e as conclusões obtidas por outros autores como HUNG *et al.*, 1997, SATO *et al.*, 2000 e SREELEKHA *et al.*, 2001) podem estar relacionadas a vários fatores como níveis de exposição ao tabaco, tamanho da amostra, critérios utilizados na seleção dos controles e diferenças étnicas.

Os resultados dos estudos que relacionam os genótipos *GSTM1* com a susceptibilidade ao câncer são conflitantes. A associação entre o polimorfismo do gene *GSTM1* e a susceptibilidade ao CCEB é sugerida por alguns estudos (SREELEKHA *et al.*, 2001; NOMURA *et al.*, 2000) e foi confirmada por nossos resultados nos quais indivíduos fumantes com genótipo *GSTM1* nulo têm maior chance de desenvolver o CCEB. Outros autores, no entanto, não confirmaram esta hipótese (MATTHIAS *et al.*, 1998; OUDE-OPHUIS *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 1997; AMADOR *et al.*, 2002).

VAURY *et al.* (1995), ROJAS *et al.* (1998) e WARHOLM *et al.* (1998) hipotetizaram uma possível associação entre o genótipo *GSTM1* nulo e uma maior atividade transcricional para o gene *CYP1A1*. Indivíduos com genótipo *GSTM1* nulo e *CYP1A1*^{462Val} teriam maior susceptibilidade ao câncer. SATO *et al.*, (2000) afirmaram que o genótipo combinado *GSTM1* nulo e *CYP1A1*^{462Val} acentua o risco ao CCEB. Nosso estudo não avaliou tal associação. Para a análise combinada de polimorfismos envolvendo dois ou mais genes, seria necessário aumentar o número de amostras.

Em relação à análise dos genótipos *GSTM1* realizada neste estudo, os indivíduos homocigotos para a presença do gene *GSTM1* (+/+) e os indivíduos heterocigotos (+/0) foram considerados do mesmo grupo. A atividade enzimática da *GSTM1* no sangue não se associa

com a concentração da enzima e não é maior em indivíduos *GSTMI*^{+/+} em comparação com indivíduos *GSTMI* +/-, o que justifica a colocação de indivíduos *GSTMI* ^{+/+} e +/- no mesmo grupo (KRONIG-GREGER, 2004).

Os resultados relativos ao polimorfismo do gene *GSTT1* sugerem que a deficiência de *GSTT1* pode ser fator de risco para o CCEB na população estudada. Esta relação é comprovada por alguns estudos (TRIZNA *et al.*, 1995; JOURENKOVA-MIRONOVA *et al.*, 1999; SREELEKHA *et al.*, 2001; AMADOR *et al.*, 2002) e contestada por outros (OUDE-OPHUIS *et al.*, 1998; GRONAU *et al.*, 2003a; GRONAU *et al.*, 2003b).

Em nosso estudo, quando estratificamos os grupos por sexo, observamos que não houve associação entre os polimorfismos dos genes *CYP1A1*, *CYP2E1* e *GSTMI* com o CCEB. Com relação ao gene *GSTT1*, os homens e as mulheres com genótipo nulo, quando analisados separadamente, apresentaram risco aumentado. EVANS *et al.* (2004) também observaram risco elevado para as mulheres com genótipo *GSTT1* nulo. A incidência do CCEB em populações brasileiras é maior no sexo masculino (SOUZA *et al.*, 1996; ARAÚJO FILHO *et al.*, 1998; GERVÁSIO *et al.*, 2001), entretanto as frequências dos genótipos dos genes *GSTT1* e *GSTMI* não seguem um padrão relacionado ao gênero dos indivíduos (ROSSINI *et al.*, 2002; GASPAR *et al.*, 2004).

Neste estudo, quando o grupo caso foi estratificado de acordo com a localização do tumor, observamos associação significativa entre o genótipo *GSTMI* nulo e o risco para o desenvolvimento de CCEB, sobretudo naqueles indivíduos com tumores localizados no assoalho bucal. Esta mesma associação também foi observada para o genótipo *GSTT1* nulo nos casos localizados principalmente em assoalho bucal e trígono retromolar. NOMURA *et al.*

(2000) observaram associação entre o polimorfismo do *GSTM1* e o sítio do tumor e concluíram que a deficiência da enzima *GSTM1* se relaciona ao risco de desenvolvimento do CCEB nos indivíduos com tais lesões em assoalho bucal, gengiva e língua. O assoalho de boca e a língua estão entre os sítios de maior incidência do CCEB (SAPP *et al.*, 1997).

A prevalência das variantes polimórficas dos genes estudados na nossa população controle seguiram frequências semelhantes às encontradas em diferentes populações. Para os genes *CYP1A1* e *CYP2E1* os valores foram semelhantes aos encontrados em populações caucasianas. A incidência da deleção envolvendo *GSTM1* encontrada neste estudo (47,0%) foi semelhante àquelas encontradas em outros estudos envolvendo populações brasileiras (40, 2% e 42,0%) (ROSSINI *et al.*, 2002; AMORIN *et al.*, 2002). Em relação ao gene *GSTT1*, os padrões encontrados neste estudo (41,0% dos controles com genótipo *GSTT1* nulo) foram similares aos asiáticos (35,0 a 52,0%). Em populações brasileiras, os valores variam entre 19,0 e 25,0% (ROSSINI *et al.*, 2002; AMORIN *et al.*, 2002). A população brasileira apresenta alto grau de heterogeneidade devido a ampla miscigenação entre populações européias, africanas e indígenas (PARRA *et al.*, 2003).

A interpretação dos resultados obtidos em estudos envolvendo epidemiologia molecular é desafiadora e envolve a elucidação de duas questões básicas: “a associação é real?”, “os resultados serão úteis?”. Resultados estatisticamente significativos são considerados reais, embora não sejam facilmente repetidos em outros estudos (MCCARTHY & HILFIKER, 2000).

A confiabilidade dos estudos em epidemiologia molecular depende de alguns pontos críticos como a definição correta da população a ser estudada, dos dados a serem coletados, a

utilização de critérios corretos na escolha do grupo controle, o tamanho da amostra e os fatores relacionados à etnia. A ausência de resultados positivos para alguns dos polimorfismos estudados em nossa pesquisa pode ser explicada por fatores relacionados ao tamanho da amostra, localização geográfica e etnia. Vale ressaltar também que nossos resultados referem-se a um tipo específico de câncer originado num tecido específico e em determinada população. Portanto, o fato de não termos encontrado resultados estatisticamente significativos para alguns dos parâmetros avaliados não exclui totalmente a existência das associações propostas pela literatura.

Concluindo, o nosso estudo demonstra que polimorfismos de genes da fase II de metabolização de carcinógenos, como o *GSTM1* e o *GSTT1*, estão associados a um maior risco para o desenvolvimento do CCEB na população brasileira. Estes dados podem ser úteis no futuro para a identificação de grupos de indivíduos susceptíveis à doença e poderão servir de base para novas abordagens de prevenção do CCEB.

6. CONCLUSÕES

Com base em nossos resultados podemos concluir que, na população estudada:

- Não foi observada associação entre os polimorfismos dos genes *CYP1A1* e *CYP2E1* e o risco para o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas de boca (CCEB);
- Existe associação entre os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e o CCEB, ou seja, a deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* constituem fatores de risco para o CCEB;
- Quando se considerou o sexo dos indivíduos na avaliação da associação entre os polimorfismos do gene *GSTT1* e o CCEB, os resultados mostraram maior risco isolado para ambos os sexos;
- A associação entre os genótipos nulos para os genes *GSTM1* e *GSTT1* e o risco para o desenvolvimento do CCEB foi mais significativo para os tumores localizados em assoalho bucal e trígono retromolar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, A. *et al.* GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a french population: different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.*, v. 10, n. 23, p. 3389-93, 2004.
2. ABDEL-RAHMAN, W. A. *et al.* GSTM1 and GSTT1 genes are potential risk modifiers for bladder cancer. *Cancer Detect. Prev.*, v. 22, p. 129-38, 1998.
3. ALEXANDROV, K. *et al.* CYP1A1 and GSTM1 genotypes affect benzo[a]pyrene DNA adducts in smokers' lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation. *Carcinogenesis*, v. 23, n. 12, p. 1969-77, 2002.
4. AMADOR, A. G. *et al.* Polymorphisms of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod.*, v.93, p. 440-445, 2002.
5. AMBROSONE, C. B. *et al.* Cigarette smoking, N-acetyltransferase -2genetic polymorphisms, and breast cancer risk. *J. Am. Med. Assoc.*, v. 276, p. 1494-1501, 1995.
6. AMORIN, L. M. F. *et al.* CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer Lett.*, v. 181, p. 179-186, 2002.
7. ARAÚJO FILHO, V. J. *et al.* Incidence of oral cancer profile at a general hospital in São Paulo. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, v. 53, p. 110-113, 1998.
8. AUTRUP, H. *et al.* Metabolism of benzopyrene by cultured rat and human buccal mucosa cells. *Carcinogenesis*, v. 6, p. 1761-65, 1985.

9. BARTSCH, H. *et al.* Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.*, v. 9, p. 3-28, 2000.
10. BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.*, v. 196, p. 80-83, 1991.
11. BELO HORIZONTE. Prefeitura Municipal, 2000 < http://www.pbh.gov.br/cidadebh/dados_gerais.htm.
12. BOOM, R. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, v. 28, p. 495-503, 1990.
13. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância, Est. 2005: Incidência de Câncer no Brasil. R. Rio de Janeiro: INCA. 2004. 94p.
14. CACERES, D. D. *et al.* Relationship among metabolizing genes, smoking and alcohol used as modifier factors on prostate cancer risk: exploring some gene-gene and gene-environment interactions. *Eur. J. Epidemiol.*, v. 20, p. 79-88, 2005.
15. CARO, A. A.; CEDERBAUM, A. I. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 44, p. 27-42, 2004.
16. CASSON, A. G. *et al.* Associations between genetic polymorphisms of phase I and II metabolizing enzymes, p53 and susceptibility to esophageal adenocarcinoma. *Cancer Detect. Prev.*, v. 27, p. 139-146, 2003.

17. CHEN, K.; JIANG, Q. T.; HE, H. Q. Relationship between metabolic enzyme polymorphism and colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.*, v. 11, p. 331-5, 2005.
18. CHEN, Y. K.; LIN, L. M. Immunohistochemical demonstration of epithelial glutathione S-transferase isoenzymes in normal, benign premalignant and malignant human oral mucosa. *J. Oral Pathol. Med.*, v. 24, p. 316-21, 1995.
19. CLEWLEY, J. P. The polymerase chain reaction (PCR) for human viral diagnosis. Boca Raton: CRC Press, 1995. 224 p.
20. COGGAN, M. *et al.* Structure and organization of the human theta-class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex. *Biochem. J.*, v. 334, p. 617-23, 1998.
21. CORRIGALL, A. V.; KIRSCH, R. E. Glutathione S-transferase distribution and concentration in human organs. *Biochem. Int.*, v. 16, p. 443-48, 1988.
22. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Pathologic bases of disease. 6ed. Philadelphia: Saunders, 1999. 1425p.
23. CUPP, M. J.; TRACY, T. S. Cytochrome P-450: new nomenclature and clinical implications. *Am. Fam. Physician*, v. 57, p. 107-116, 1998.
24. DEAKIN, M. *et al.* Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis*, v. 17, p. 881-884, 1996.
25. ESTABROOK, R. W.; COOPER, D. Y.; ROSENTHAL, O. The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem. Z.*, v. 338, p. 741-755, 1963.

26. EVANS, A. J. *et al.* Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck*, v. 26, p. 63-70, 2004.
27. FRANCO, E. L. *et al.* Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int. J. Cancer*, v. 43, n. 6, p. 992-1000, 1989.
28. FURUKAWA, M. *et al.* Cytochrome P450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with liver. *Cancer Sci.*, v. 95, n. 6, p. 520-29, 2004.
29. GARTE, S. The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis*, v. 19, p. 1329-32, 1998.
30. GARTE, S. *et al.* Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.*, v. 10, p. 1239-1248, 2001.
31. GASPAR, J. *et al.* Combined effects of glutathione S-transferase polymorphisms and thyroid cancer risk. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 151, p. 60-67, 2004.
32. GERVÁSIO, O. L. A. S. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. *Braz. Dent. J.*, v. 12, p. 57-61, 2001.
33. GRONAU, S.; KOENIG-GREGER, D.; RIECHELMANN, H. Gene polymorphisms in detoxification enzymes as susceptibility factor for head and neck cancer? *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, v. 128, p. 674-680, 2003b.
34. GRONAU, S.; KOENIG-GREGER, D.; RIECHELMANN, H. GSTM1 enzyme concentration and enzyme activity in correlation to the genotype of detoxification enzymes in squamous cells carcinoma of the oral cavity. *Oral Diseases*, v. 9, p. 62-67, 2003a.
35. GUENGERICH, F. P.; SHIMADA, T. Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mut. Res.*, v. 400, p. 201-213, 1998.

36. HAHN, M. *et al.* Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity cancer. *Oral Oncol.*, v. 38, p. 486-490, 2002.
37. HASLER, J. A. *et al.* Human cytochromes P450. *Molec. Aspects Med.*, v. 20, p. 1-137, 1999.
38. HATAYAMA, I.; SATOH, K.; SATO, K. Developmental and hormonal regulation of the major form of hepatic glutathione S-transferase in male mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 140, p. 581-88, 1986.
39. HAYASHI, S.; WATANABE, J.; KAWAJIRI, K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human Cytochrome P450IIIE1 gene. *J. Biochem.*, v. 110, p. 559-565, 1991.
40. HAYASHI, S.; WATANABE, J.; KAWAJIRI, K. High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P4501A1 and Mu-class glutathione S-transferase genes. *Jpn. J. Cancer Res.*, v. 83, p. 866-870, 1992.
41. HAYASHI, S.; WATANABE, J.; NAKACHI, K.; KAWAJIRI, K. PCR detection of an A/G exon 7 of the CYP1A1 gene. *Nucleic Acid Res.*, v. 19, p. 4797, 1991.
42. HEAGERTY, A. *et al.* Susceptibility to multiple cutaneous basal cell carcinomas: significant interaction between glutathione S-transferase GSTM1 genotypes, skin type and male gender. *Br. J. Cancer*, v. 73, p. 44-48, 1996.
43. HILDEBRAND, C. E. *et al.* Regional linkage analysis of the dioxin-inducible P-450 gene family on mouse chromosome 9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 130, p. 396-406, 1985.

44. HILDESHEIN, A.; LEVINE, P. H. Etiology of nasopharyngeal carcinoma: a review. *Epidemiol. Rev.*, v. 15, p. 466-485, 1993.
45. HIRVONEN, A. *et al.* Modulation of urinary mutagenicity by genetically determined carcinogen metabolism in smokers. *Carcinogenesis*, v.15, p. 813-815, 1994.
46. HUNG, H. C. *et al.* Genetic polymorphisms of CYP2E1, GSTM1 and GSTT1; environmental factors and risk of oral cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.*, v. 6, p. 901-905, 1997.
47. JEMTH, P.; MANNERVIK B. Kinetic characterization of recombinant human glutathione transferase T-T1, a polymorphic detoxication enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 348, p. 247-54, 1997.
48. JOURENKOVA, N. *et al.* Larinx cancer risk in relation to glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes and tobacco smoking. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.*, v. 7, p. 19-23, 1998.
49. JOURENKOVA-MIRONOVA, N. *et al.* Glutathione S-transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 genotypes and the risk of smoking related oral and pharyngeal cancers. *Int. J. Cancer*, v. 81, p. 44-48, 1999.
50. KALOW, W, BERTILSSON, L. Interethnic factor affecting drug response. *Adv. Drug Rev.*, v. 25, p. 1-53, 1994.
51. KAO, S. *et al.* 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.*, v. 31, p. 505-511, 2002.

52. KATO, S. *et al.* Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 87, p. 902-907, 1995.
53. KATOH, T. *et al.* Genetic polymorphisms of tobacco- and alcohol-related metabolizing enzymes and oral cavity cancer. *Int. J. Cancer*, v. 83, p. 606-609, 1999.
54. KAWAJIRI, K. *et al.* The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, v. 14, p. 77-87, 1993.
55. KELLERMAN, G.; SHAW, C. R.; LUYTEN-KELLERMAN, M. Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and bronchogenic carcinoma. *New Engl. J. Med.*, v. 298, p. 934-937, 1973.
56. KLINGENBERG, M. Pigments of rat microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 75, p. 376-386, 1958.
57. KNUDSEN, L. E.; STEFFEN, H. L.; AUTRU, H. Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man. *Mut. Res.*, v. 482, p. 83-88, 2001.
58. KRIEK, E. *et al.* polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk. *Mut. Res.*, v. 400, p. 215-231, 1998.
59. KRONIG-GREGER, D. *et al.* Genotype and phenotype of glutathione S-transferase in patients with head and neck carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, v. 130, p. 718-25, 2004.
60. LAFUENTE, A. *et al.* Human glutathione S-transferase μ (GST μ) deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. *Cancer Lett.*, v. 68, p. 49-54, 1993.

61. LANDI S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mut. Res.*, v. 463, p. 247-83, 2000.
62. LAUGHLIN L. T.; BERNAT, B. A.; ARMSTRONG R. N. Mechanistic imperative for the evolution of a metallo glutathione transferase of the vicinal oxygen chelate superfamily. *Chem. Biol. Interact.*, v. 111-112, p. 41-50, 1998.
63. LAZARUS, P.; PARK, J. Y. metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol.*, v. 36, p. 421-431, 2000.
64. LE MARCHAND, L. *et al.* Feasibility of collecting buccal cell DNA by mail in a cohort study. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev.*, v. 10, p. 701-703, 2001.
65. LI, Y. *et al.* Cigarette smokin, cytochrome P4501A1 polymorphisms, and breast cancer among African-American and white women. *Breast Cancer Res.*, v. 6, p. 460-73, 2004.
66. LIEBER, C. S. Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role. *Physiol. Rev.*, v. 77, p. 517-544, 1997.
67. LIN, D. X. *et al.* Susceptibility to esophageal câncer and genetic polymorphisms in glutathione S-transferases T1, P1, and M1 and cytochrome P450 2E1. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, v. 7, p. 1013-1018, 1998
68. LIU, S. *et al.* Elucidation of CYP2E1 5' regulatory RsaI/PstI allelic variants and their role in risk for oral cancer. *Oral Oncol.*, v. 37, p. 437-445, 2001.
69. MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. Molecular cloning – a laboratory manual. 1 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. cap. 5, p. 173-178.
70. MARSHALL, S. E. *et al.* p53 codon 72 polymorphism and susceptibility to skin cancer after renal transplantation. *Transplantation*, v. 69, n. 5, p. 994-996, 2000.

71. MATTHIAS, C. *et al.* 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*, v. 8, p. 91-100, 1998.
72. McCARTHY, J. J.; HILFIKER, R. The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics. *Nature Biotechnol.*, v. 18, p. 505-508, 2000.
73. MEYER, D. J. *et al.* Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem, J.*, v. 274, p. 409-414, 1991.
74. MILLER, M. C.; MOHRENWEISER, H. W.; BELL, D. A. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol. Lett.*, v. 120, p. 269-280, 2001.
75. MOONEY, L. A. *et al.* Contribution of genetic and nutritional factors to DNA damage in heavy smokers. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 503-509, 1997.
76. MORENO-LÓPEZ, L. A. *et al.* Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol.*, v. 36, p. 170-174, 2000.
77. MULDER, T. J. P. *et al.* Glutathione S-transferase and glutathione in human head and neck cancer. *Carcinogenesis*, v. 16, p. 619-624, 1995.
78. NAGPAL, J. K.; DAS, B. R. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol.*, v. 39, p. 213-221, 2003.
79. NEVILLE, B. W. *et al.* Oral and maxillofacial pathology. 1. ed. Philadelphia: Saunders, 1995. 711 p.

80. NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. *Cancer J. Clin.*, v. 52, p. 195-215, 2002.
81. NOMURA, T. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 2 and glutathione S-transferase M 1 polymorphisms in relation to the risk for oral cancer in Japanese drinkers. *Oral Oncol.*, v. 36, p. 42-46, 2000.
82. OMURA, T. Forty years of Cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 266, p. 690-698, 1999.
83. OMURA, T.; SATO, R. A new cytochrome of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, v. 237, p. 1375, 1962.
84. OUDE-OPHUIS, M. B. *et al.* Glutathione S-transferase M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphism in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. *Cancer*, v. 82, p. 936-943, 1998.
85. PACIFICI, G. M. *et al.* Organ distribution of glutathione transferase isoenzymes in the human fetus: differences between liver and extrahepatic tissues. *Biochem. Pharmacol.*, v. 35, p. 1616-19, 1986.
86. PARK, J. Y. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.*, v. 6, p. 791-797, 1997.
87. PARRA, F. C. *et al.* Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 100, p. 177-182, 2003.
88. PEMBLE, S. *et al.* Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.*, v. 300, p. 271-276, 1994.

89. PERSSON, I.; JOHANSSON, I.; INGELMAN-SUNDBERG, M. In vitro kinetics of two human CYP1A1 variant enzymes suggested to be associated with interindividual differences in cancer susceptibility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 231, p. 227-230, 1997.
90. PINTO, L. F. R. *et al.* Mechanisms of esophageal cancer development in Brazilians. *Mut. Res.*, v. 544, p. 365-373, 2003.
91. POULOS, T. L.; FINZEL, B. Z.; HOWARD, A. J. High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J. Mol. Biol.*, v. 192, p. 687-700, 1987.
92. QUIÑONES, L. *et al.* CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 genetic polymorphisms. The effect of single and combined genotypes on lung cancer susceptibility in Chilean people. *Cancer Lett.*, v. 174, p. 35-44, 2001.
93. RIVENSON, A. *et al.* Induction of lung and exocrine pancreas tumors in F344 rats by tobacco-specific and areca-derived N-nitrosamines. *Cancer Res.*, v. 48, p. 6912-17, 1988.
94. ROJAS, M. *et al.* High Benzo[a]pyrene diol-epoxide DNA adduct levels in lung and blood cells from subjects with combined CYP1A1 MspI/MspI-GSTM1*0/0 genotypes. *Pharmacogenetics*, v. 8, p. 109-118, 1998.
95. ROSSINI, A. *et al.* Frequencies of GSTm1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet. Mol. Res.*, v. 1, n. 3, p. 233-40, 2002.
96. SAIKI, K. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction sites analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

97. SAPP, J. P.; EVERSOLE, L. R.; WYSOCKI, G. P. Contemporary oral and maxillofacial pathology. 1. ed. St. Louis: Mosby, 1997. 433 p.
98. SATO, M. *et al.* Genetically high susceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined genotyping of CYP1A1 and GSTM1 genes. *Oral Oncol.*, v. 36, p. 267-271, 2000.
99. SCHLECHT, N. F. *et al.* Interaction between tobacco and alcohol consumption and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Brazil. *Am. J. Epidemiol.*, v. 150, n. 11, p. 1129-1137, 1999.
100. SCULLY, C.; FIELD, J. K., TANZAWA H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.*, v. 36, p. 256-263, 2000a.
101. SCULLY, C.; FIELD, J. K., TANZAWA H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 2. Chromosomal aberrations. *Oral Oncol.*, v. 36, p. 311-327, 2000b.
102. SIEGEL, S.; CASTELLAN JR, N. J. Nonparametric Statistics: for the behavioral sciences. 2. ed. Singapore: McGraw-Hill International Editions, 1988. 399 p.
103. SINGHAL, S. S. *et al.* Glutathione S-transferases of human skin: qualitative and quantitative differences in men and women. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1163, p. 266-72, 1993.
104. SMITH, H. O. *et al.* A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acid Res.*, v. 3, p. 2387-98, 1976.

105. SOBBI, R. L. *et al.* Genetic polymorphisms of the CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer susceptibility in a north Indian population. *Mol. Cell Biochem.*, v. 266, p. 1-9, 2004.
106. SOUZA, A. *et al.* Epidemiologia do carcinoma epidermóide da mucosa bucal – contribuição ao estudo sobre três variáveis: sexo, faixa etária e raça. *Rev. Odontol. UNICID*, v. 8, p. 127-134, 1996.
107. SREELEKHA, T. T. *et al.* Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol.*, v. 37, p. 593-598, 2001.
108. TAIOLI, E.; PEDOTTI, P.; GARTE, S. Importance of allele frequency estimates in epidemiological studies. *Mut. Res.*, v. 567, p. 63-70, 2004.
109. TERRY, K. L. *et al.* Interaction between CYP1A1 polymorphic variants and dietary exposures influencing ovarian cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v. 12, p. 187-90, 2003.
110. TONG, D. *et al.* Detection of p53 polymorphism at codon 72 by PCR and allele-specific oligonucleotide hybridization on microtiter plates. *Clin. Chem.*, v. 46, n. 1, p. 124-126, 2000.
111. TRIZNA, Z. *et al.* Glutathione S-transferase genotypes as risk factors for head and neck cancer. *Am. J. Surg.*, v. 170, p. 499-501, 1995.
112. UMENO M. *et al.* Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry*, v. 27, p. 9006-13, 1988.

113. VAN LIESHOUT, E. M. M. *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs enhance glutathione S-transferase theta levels in rat colon. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1381, p. 305-11, 1998.
114. VAURY, C. *et al.* Human glutathione S-transferase M1 null genotype is associated with a high inducibility of cytochrome P450 1A1 gene transcription. *Cancer Res.*, v.55, p. 5520-5523, 1995.
115. VILLARD, P. H. *et al.* Effects of tobacco smoke on the gene expression of the CYP1A, CYP2B, CYP2E and CYP3A subfamilies in mouse liver and lung: relation to single strand breaks of DNA. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 148, p. 195-204, 1998.
116. VONDRACEK, M. *et al.* Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa. *Carcinogenesis*, v. 22, n. 3, p. 481-88, 2001.
117. XU, S. *et al.* Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and GSTM1 deletion. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 3517-3527, 1998.
118. WANG, L. *et al.* CYP1A1, GSTs and mEH polymorphisms and susceptibility to esophageal carcinoma: study of population from a high-incidence area in north China. *World J. Gastroenterol.*, v. 9, n. 7, 1394-97, 2003.
119. WARHOLM, M.; ALEXANDRIE, A. K.; CARSTENSEN, U. Biomarkers in relation to PAH exposure in aluminium smelter workers. *Toxicol. Lett.*, v. 95, p. 187, 1998.
120. WATANABE, J. *et al.* PstI and RsaI RLFPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E gene. *Nucleic Acid Res.*, v. 18, p. 7194, 1990.

121. WATANABE, J.; HAYASHI, S.; KAWAJIRI, K. Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to the RsaI polymorphism in the 5'-flanking region. *J. Biochem.*, v. 116, p. 321-326, 1994.
122. WATSON, J. D. *et al.* O DNA Recombinante. 2. ed. Ouro Preto: Editora UFOP, 1997. 624 p.
123. WEBB, G. *et al.* Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (GSTT1). *Genomics*, v. 33, p. 121-123, 1996.
124. WHITTINGTON, A. *et al.* Gene structure, expression and chromosomal of murine theta class glutathione transferase mGSTT1-1. *Biochem. J.*, v. 337, p. 141-51, 1999.
125. WIENCKE, J. K. *et al.* Human glutathione S-transferase deficiency as a marker of susceptibility to epoxide-induced cytogenetic damage. *Cancer Res.*, v. 50, p. 1585-1590, 1990.
126. WOOD, N. K.; GOAZ, P. W. Differential diagnosis of oral and maxillofacial lesions. 5. ed. St. Louis: Mosby, 1997. 656 p.
127. WU, X. *et al.* Association between cytochrome P4502E1 genotype, mutagen sensitivity, cigarette smoking and susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 967-973, 1997.
128. YANG, X. R. *et al.* CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms in relation to lung cancer risk in Chinese women. *Cancer Lett.*, v. 214, p. 197-204, 2004.
129. ZHANG, Z. Y. *et al.* Characterization of purified human recombinant cytochrome P4501A1-Ile462 and -Val462: assessment of a role for the rare allele in carcinogenesis. *Cancer Res.*, v. 56, p. 3926-3933, 1996.

8. Anexos

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS INFORMAÇÃO, CONFORME OS ARTIGOS 10 E 11 DA RESOLUÇÃO 196 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE DE 10 DE OUTUBRO DE 1996

INFORMAÇÕES AO PACIENTE

Meu nome é Sérgio Neves Drummond, Cirurgião-Dentista, CRO-MG 21706. Sou aluno do curso de Doutorado em Farmacologia Bioquímica e Molecular – ICB UFMG, orientado pelo Prof. Luiz Armando De Marco e sou responsável pela pesquisa intitulada “Associação entre os polimorfismos dos genes *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1* e o carcinoma de células escamosas de boca”.

O objetivo deste trabalho é aumentar os conhecimentos a respeito do carcinoma de boca, especialmente alterações relacionadas ao seu DNA. Estas alterações podem o tornar mais susceptível a desenvolver a doença.

O DNA está presente dentro das células. As células são uma das menores partes do nosso corpo. O DNA é responsável pela formação e desenvolvimento de todas as estruturas do nosso corpo (por exemplo, dentes, pele, cabelo, ossos, etc).

Para que então possamos estudar seu DNA, necessitaremos raspar seu tecido bucal (lábio ou bochecha) para se obter células e, a partir daí, obter seu DNA. Esta raspagem será

realizada com uma espátula plástica devidamente esterilizada, não causará dor, não causará agravamento das suas lesões nem faz parte do tratamento desta doença.

Você terá o direito de desistir de participar desta pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo a você.

Os resultados obtidos após a conclusão deste trabalho serão publicados em veículos científicos, respeitando sempre seu direito de não identificação.

Se houver alguma dúvida a respeito deste trabalho, você poderá se comunicar comigo pelo telefone (31) 32823779, a qualquer momento, mesmo após a conclusão da pesquisa.

Você poderá também ligar para o COEP (Tel. 31- 32489364), para obter os esclarecimentos necessários.

Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, _____, declaro que concordo em participar desta pesquisa, não sendo responsável por nenhum tipo de despesa relacionada ao desenvolvimento deste trabalho, e que não receberei qualquer pagamento pela participação neste estudo.

Declaro também que não houve nenhum tipo de pressão para eu contribuir com esta pesquisa, que fui suficientemente informado a respeito dos objetivos deste trabalho e da maneira pela qual será realizada a coleta do material.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____

Assinatura do paciente ou responsável: _____

Identidade: _____

Assinatura do responsável pela pesquisa: _____

ANEXO B

FICHA CLÍNICA – GRUPO CASO

1. Nome: _____ Código: _____

2. Data de nascimento: __/__/____ Cor: _____ Sexo: _____

3. Filiação: _____

4. Endereço: _____

5. Profissão: _____

6. Hábitos:

Tabagismo

- Tipo: _____
- Frequência diária: _____
- Duração: _____

Etilismo

- Tipo: _____
- Frequência diária: _____
- Duração: _____

7. Localização da lesão: _____

8. Tempo de evolução: _____

9. Diagnóstico histopatológico: _____

10. Tratamento instituído: _____

11. Local da coleta: _____

12. Prontuário nº: _____

13. Data: _____

Anexo C

FICHA CLÍNICA – GRUPO CONTROLE

Nome: _____ Sexo: _____ Código: _____

Data nasc.: ___/___/___ Cor: _____

Hábitos

Fumo:

Tipo: _____

Quantidade diária: _____

Duração do hábito: _____

Bebida alcoólica

Tipo: _____

Quantidade diária: _____

Duração do hábito: _____

Local da coleta: _____

Data: _____

Anexo D

Solução de Krebs

– Utilizada no armazenamento das células obtidas do raspado da mucosa bucal dos pacientes.

- NaCl 20%	3,50ml
- KCl 2%	1,70ml
- CaCl ₂ ·2H ₂ O 2%	1,76ml
- MgSO ₄ ·7H ₂ O 2%	1,45ml
- KH ₂ PO ₄ 2%	1,00ml
- NaHCO ₃ 2%	10,00ml
- C ₆ H ₁₂ O ₆	0,20g
- Eserina 10 ⁻³ M	1ml

Anexo E

SOLUÇÕES UTILIZADAS NA EXTRAÇÃO DO DNA

SÍLICA

- SiO ₂	60g
- H ₂ O q.s.p.	500ml

Preparo da sílica

- Ressuspender em cilindro graduado $\Phi=5\text{cm}$; $H=27,5\text{cm}$ (col. H₂O);
- Sedimentar por 24hs;
- Descartar o sobrenadante e adicionar H₂O q.s.p. 500ml. Ressuspender o sedimento;
- Deixar a temperatura ambiente por 5 hs. Em seguida descartar o sobrenadante;
- Adicionar à suspensão 600 μl de HCL para ajustar o pH para 2.0;
- Aliquotar e autoclavar. A suspensão é estável por no mínimo 6 meses.

TAMPÃO DE LISE (L6)

- GuHCl	97g
- Tris HCl 0,1M pH 6.4	100ml
- EDTA 0,2M pH 8.0	22ml

- Triton X-100 2,45ml

TAMPÃO DE LAVAGEM (L2)

- GuHCl 97g
- Tris HCl 0,1M pH 6.4 100ml

Os tampões de lise e lavagem devem ser estocados ao abrigo da luz, por no máximo 15 dias.

Etanol 70%

- Medir o volume de etanol absoluto de acordo com o volume final;
- Completar com água destilada;
- Homogeneizar;
- Conservar à temperatura ambiente, 4°C ou 20°C, dependendo da utilização.

Acetona 100%

- Qualidade compatível com os processos de Biologia Molecular

Tampão TE

- Preparar as seguintes soluções:

- Tris HCl 1M pH 8.0
- EDTA 0,5M pH 8.0
- Unir em um único recipiente as soluções preparadas, nas seguintes concentrações, de acordo com o volume final a ser preparado:
 - Tris HCL 10mM pH 8.0
 - EDTA 1mM pH 8.0
- Completar o volume final com água milli-Q;
- Homogeneizar;
- Autoclavar;
- Conservar a temperatura ambiente.

Anexo F

Soluções utilizadas na eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% e 8,0%

Acrilamida 30%

Para cada 100mL de solução:

- Acrilamida 29g
- Bis-acrilamida 1g
- H₂O q.s.p. 100ml

TBE 20X

- Tris 121g
- Ácido bórico 61,7g
- EDTA 7,44g
- H₂O q.s.p. 1000ml

TBE 10X

- TBE 20X 500ml
- H₂O q.s.p. 1000ml

ANEXO G

Soluções utilizadas na coloração do gel de poliacrilamida pela Prata

Solução de Prata

- NITRATO DE PRATA 40% 4,00ML
- FORMALDEÍDO 37% 75 μ L
- ÁGUA DESTILADA Q.S.P. 50ML

Solução Reveladora

- CARBONATO DE SÓDIO 1,5G
- FORMALDEÍDO 37% 75 μ L
- Tiosulfato de Sódio 20 μ l
- Água destilada q.s.p. 50ml

Ácido Acético 10%

Para cada 5l de solução

- Ácido acético glacial 500ml
- H₂O destilada q.s.p. 5l

Anexo H

Soluções utilizadas na reação de PCR

- Água para PCR
- Desoxinucleotídeos tri-fosfato
- Tampão Taq
 - $MgCl_2$ 1,5mM
 - NaCl 40mM
 - Tris HCl 10mM pH 8.4
 - Triton X-100 0,1%
- Enzima Taq polimerase
- Iniciadores

Soluções utilizadas na análise de restrição

- Água (a mesma utilizada nas reações de PCR)
- Tampão *Buffer C*
 - Tris HCl 100mM
 - NaCl 500mM
 - DTT 10mM

- Tampão Buffer H
 - Tris HCl 900mM
 - NaCl 500mM
 - MgCl₂ 100mM
 - DTT 10mM

ANEXO I

Artigos Publicados



ELSEVIER

ORAL
ONCOLOGY

<http://intl.elsevierhealth.com/journals/oron/>

2 Association between GSTT-1 gene deletion and 3 the susceptibility to oral squamous cell 4 carcinoma in cigarette-smoking subjects

5 Sérgio Neves Drummond ^a, Ricardo Santiago Gomez ^a,
6 Júlio Carlos Motta Noronha ^a, Isabela Almeida Pordeus ^a,
7 Alvimar Afonso Barbosa ^b, Luiz De Marco ^{c,*}

8 ^a Department of Oral Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil
9 ^b Department of Surgery, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil
10 ^c Department of Pharmacology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais,
11 Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil

Received 20 October 2004; accepted 16 December 2004

11 KEYWORDS

12 Oral squamous cells
13 carcinoma;
14 Polymorphism;
15 GSTT1

Summary Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is related to tobacco use and alcohol consumption and the individual susceptibility for development of this tumor has been associated with xenobiotic-metabolizing enzymes polymorphisms. Glutathione S-transferase Theta-1 (GSTT1) is a phase II metabolic enzyme that catalyzes detoxification reactions of carcinogenic compounds. A genetic polymorphism of the GSTT1 gene is characterized by a complete gene deletion and consequent absence of the enzyme. The null genotype (gene deleted) of GSTT1 has a decreased capacity in detoxifying carcinogens present in tobacco smoke, leading the formation of DNA-adducts and DNA damage. The purpose of the present study was to evaluate the association between GSTT1 polymorphism and risk for OSCC development in a Brazilian population. We investigated the GSTT1 polymorphism in 87 patients with OSCC and 81 age-sex matched controls. The genotypes were studied by PCR-based methods. Individuals homozygous for the wild type GSTT1 (+/+) and heterozygous (+/0) were grouped together. The prevalence of GSTT1 deficiency (null) was significantly higher in the group with OSCC patients with oral cancer of the floor of the mouth. The results suggest that GSTT1 polymorphism increases the risk for OSCC development.

© 2005 Published by Elsevier Ltd.

* Corresponding author. Tel.: +55 31 34992717; fax: +55 31 34992983.

E-mail address: ldemarco@ufmg.br (L.D. Marco)

16 Introduction

17 Oral squamous cell carcinoma (OSCC) results
18 from a combination of environmental factors such
19 as tobacco use and alcohol consumption and genet-
20 ic damage resulting in the accumulation of DNA
21 alterations involving key cellular genes. These
22 changes generate genetic instability that can result
23 in an uncontrolled cellular growth.¹ It is recognized
24 that individual variability related to the capacity of
25 metabolizing xenobiotic substances may influence
26 the susceptibility for the development of esopha-
27 geal adenocarcinomas.² Indeed, it has been sug-
28 gested that genetic polymorphisms are able to
29 affect the risk of a wide range of cancers.³⁻⁷ The
30 environment-gene relationship in carcinogenesis is
31 associated with phase I and phase II metabolic en-
32 zymes that are involved in the metabolism of car-
33 cinogens. Since xenobiotic substances metabolism
34 can affect the potency of most carcinogens by acti-
35 vating or detoxifying them, carcinogen-metaboliz-
36 ing enzyme polymorphisms have an important
37 role in susceptibility to such xenobiotic-related
38 cancers.⁴

39 Human glutathione S-transferase class Theta-1
40 (GSTT1) is a phase II enzyme that catalyzes the
41 conjugation of glutathione to a broad variety of
42 carcinogenic compounds, resulting in increased
43 water solubility allowing excretion of carcinogenic
44 metabolites formed during phase I reactions.⁸ The
45 first evidence of the existence of a human GSTT1
46 came from the purification of a distinct protein⁹
47 and the cloning of a cDNA encoding human GSTT1
48 gene.¹⁰ The GSTT1 gene is characterized by a ge-
49 netic polymorphism causing a complete gene dele-
50 tion and consequent absence of the enzyme.¹⁰ The
51 null genotype (gene deleted) of GSTT1 has a de-
52 creased capacity in detoxifying carcinogens pres-
53 ent in tobacco smoke,¹ leading to the formation
54 of DNA-adducts and DNA damage.¹¹ The frequen-
55 cies of the null genotype have been determined
56 in different human populations, varying from
57 0.197 in Caucasians to 0.47 in Asians.¹²

58 The association of GSTT1 polymorphism and risk
59 for oral squamous cell carcinoma has been studied
60 and the results are inconsistent. Positive associa-
61 tion between GSTT1 deletion and oral cancer risk
62 was observed in different populations with odds
63 ratio ranging from 1.47 to 3.3.^{1,13-15} However,
64 other studies did not establish a positive correla-
65 tion.^{11,16,17} Therefore, we aimed to determine
66 the frequencies of GSTT1 genotypes in a case-con-
67 trol study in a population comprised of heavy
68 smokers and evaluated the association between

GSTT1 deletion and the risk for squamous cell
carcinoma. 69
70

Materials and methods 71

Human subjects 72

The study included 87 patients (mean age
55.7 yr; range 40-84 yr) with histological diagnosis
of oral squamous cell carcinoma (OSCC) and 81
age- and sex-matched control subjects (mean age
51.8 yr; range 34-86 yr) of the same geographical
region as well as socio-economic status. No patient
had had previous chemotherapy and/or radiation
therapy. All subjects in both groups had smoked
at least 10 cigarettes/day over a 20 yr period.
There were 76 males (87.3%) and 11 females
(12.7%) in the OSCC group. Ethnicity was not used
to define this population because of the established
hazards of judging Brazilians by color, race and
geographical origin.¹⁸

Oral swabs were obtained from all subjects using
sterile plastic tips and samples were stored in micro-
centrifuge tubes containing 150 µl of Krebs Buffer
(NaCl 20%, KCl 2%, CaCl₂·2H₂O 2%, MgSO₄, C₆H₁₂O₆)
and immediately frozen at -20 °C. The specimens
from patients with carcinoma were obtained from
the lesion's contra-lateral mucosa. All participants
signed an informed consent term and the study
was approved by the local Ethics Committee. 87
88
89
90
91
92
93
94
95

DNA isolation 96

The DNA was extracted using standard protocol.
GSTT1 genotyping was carried out by the polymer-
ase chain reaction (PCR) assay as previously de-
scribed.¹ PCR was performed in a final volume of
25 µl containing 25 ng of genomic DNA, 0.2 mM
dNTPs, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂
120 ng of each primer and 1.25 U Taq DNA polymer-
ase. Amplification was performed in a PTC-100-60
thermocycler (MJ Research, Watertown, MA). The
amplification conditions consisted of an initial
denaturing step at 94 °C for 5 min followed by 35
cycles of amplification at 95 °C for 30 s, 64 °C for
1 min and 72 °C for 1 min, followed by final elonga-
tion at 72 °C for 5 min. The reaction produced a
450bp product. Amplification of the β-globin gene
was used as an internal control. The amplified
products were visualized by 6.5% polyacrilamide
gel electrophoresis and silver stained. For the null
GSTT1 genotype no amplified product was observed
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115

116 (data not shown). The χ^2 test was used for statisti-
117 cal analysis and the significance was set at a *p* va-
118 lue of <0.05.

119 Results

120 The frequencies of the GSTT1 genotypes are
121 shown in Table 1. Individuals homozygous for the
122 wild type GSTM1 (+/+) and heterozygous (+/0) were
123 grouped together. The percentage of cases of null
124 genotype the OSCC group (83.9%) was statistically
125 different from the control subjects (42.0%) (Odds
126 ratio, O.R. = 7.20%, 95% CI = 3.50–14.84, *P* < 0.05).
127 The relationship between GSTT1 polymorphism
128 and oral cancer risk were further evident after seg-
129regation by sex. The difference between the preva-
130 lence of GSTT1 null genotype comparing female
131 individuals of the case group (81.8%) and of the con-
132 trol group (25.0%) was statistically significant
133 (O.R. = 13.50%, 95% CI = 2.0–90.69, *P* < 0.05). The
134 frequency of male patients with OSCC and null for
135 the GSTT1 genotype (84.2%) was statistically differ-

ent from the male controls (46.2%) (O.R. = 6.22%,
95% CI = 2.83–13.65, *P* < 0.05). The frequencies of
GSTT1 deficiency were analyzed after segregation
by oral site of the tumor and the results demon-
strated a strong association for patients with oral
cancer of the floor of the mouth (O.R. = 13.82%,
95% CI = 3.02–63.14, *P* < 0.05). For other sites such
as tongue, gingiva and retromolar region the results
were also significant (Table 2).

145 Discussion

146 Polymorphisms in genes coding for xenobiotic
147 metabolizing enzymes may influence individual sus-
148 ceptibility to various types of human cancers.^{3,5–7}
149 Our results suggest a strong relationship between
150 the GSTT1 polymorphism and an increased risk for
151 oral cancer development. Previous studies with dif-
152 ferent populations have also shown this associa-
153 tion,^{1,13–15} although other studies could not
154 confirm this positive correlation.^{11,16,17} The con-
155 flicting results regarding to GSTT1 polymorphism

Table 1 Glutathione S-transferase (GSTT1) genotypes in oral squamous cells carcinoma patients and controls

	<i>n</i>	GSTT1 genotype		χ^2	<i>p</i> ^a	Odds ratio (95% confidence interval)
		0/0 (%)	+/0 or +/+ (%)			
Control	81	34 (42.0)	47 (58.0)			
Males	65	30 (46.2)	35 (53.8)			
Females	16	4 (25.0)	12 (75.0)			
Oral cancer	87	73 (83.9)	14 (16.1)	31.89	<0.05	7.20 (3.50–14.84)
Males	76	64 (84.2)	12 (15.8)	22.83	<0.05	6.22 (2.83–13.65)
Females	11	9 (81.8)	2 (18.2)	8.43	<0.05	13.50 (2.00–90.69)

0/0 GSTT1 null; +/0 GSTT1 heterozygous; +/+ GSTT1 wild type homozygous.

^a Versus control.

Table 2 Glutathione S-transferase (GSTT1) genotypes in oral squamous cells carcinoma of different sites of the oral cavity

Location	<i>n</i>	GSTT1 genotype		χ^2	<i>p</i> ^a	Odds ratio (95% confidence interval)
		0/0 (%)	+/0 or +/+ (%)			
Oral floor	22	20 (90.9)	2 (0.1)	16.61	<0.05	13.82 (3.02–63.14)
Tongue	29	24 (82.8)	5 (17.2)	14.25	<0.05	6.63 (2.29–19.14)
Gingiva	11	9 (81.8)	2 (18.1)	6.18	<0.05	6.22 (1.26–30.64)
Palate	10	7 (70.0)	3 (30.0)	2.82	n.s.	–
Retromolar	12	10 (83.3)	2 (16.7)	7.17	<0.05	6.91 (1.42–33.59)
Buccal mucosa	3	3 (100.0)	0 (0)	3.95	n.s.	–

n.s., not significant.

0/0 GSTT1 null; +/0 GSTT1 heterozygous; +/+ GSTT1 wild type homozygous.

^a Versus control.

156 may be due to several confounding factors includ-
157 ing the choice of a correct control group, ethnic
158 variations and technical discrepancies in genotyp-
159 ing assays. In our study only patients with histolog-
160 ical diagnosis of squamous cell carcinoma of the
161 oral cavity were analyzed and the control group
162 consisted of smokers from the same geographic re-
163 gion and socio-economic status. Both groups were
164 also age-sex matched.

165 We also found a marked association between the
166 GSTT1 polymorphism and the risk for oral cancer at
167 specific sites of oral mucosa. In the present study,
168 the OR increased from 7.20 to 13.82, when the
169 floor of the mouth was considered, suggesting that
170 GSTT1 polymorphism is also associated with tumor
171 development in subsites of the oral cavity. We have
172 previously demonstrated that a GSTM1 deletion
173 correlates to an increase in the OR for the presence
174 of squamous carcinoma of the floor of the mouth
175 (2.01–3.67).¹⁹

176 The frequency of the null genotype in our
177 control population (0.392) was higher than other
178 studies with Brazilian populations (frequencies ob-
179 served around 0.250).^{20,21} This may be attributed
180 to different pattern of expression of the GSTs in
181 various tissues.^{22,23} In conclusion our findings dem-
182 onstrate a positive association between the lack of
183 GSTT1 enzyme activity and the susceptibility to
184 oral squamous cell carcinoma. Indeed, this associ-
185 ation varies in accordance with gender and site of
186 the tumor. Further studies using a large cohort of
187 patients are needed to clarify this issue.

188 Acknowledgement

189 This study was supported in part by grants from
190 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas
191 Gerais (FAPEMIG), Programa de Excelência (PRO-
192 NEX) and Conselho Nacional de Desenvolvimento
193 Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. Dr. L. De
194 Marco, R.S. Gomez and I. Pordeus are research fel-
195 lows of CNPq.

196 References

197 1. Sreelekha TT, Ramadas K, Pandey M, Thomas G, Nalinaku-
198 mari KR, Pillai MR. Genetic polymorphism of CYP1A1,
199 GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol*
200 2001;**37**(7):593–8.
201 2. Casson AG, Zheng Z, Chiasson D et al. Associations between
202 genetic polymorphisms of Phase I and II metabolizing
203 enzymes, p53 and susceptibility to esophageal adenocarci-

noma. *Cancer Detect Prev* 2003;**27**(2):139–46. 204
3. Noriaki S, Takashi K, Noriko Y et al. Contribution of the
205 *NQO1* and *GSTT1* polymorphisms to lung adenocarcinoma
206 susceptibility. *Cancer Epidem Biomar Prev* 2002;**11**:730–8. 207
4. Norppa H. Genetic susceptibility, biomarker response, and
208 cancer. *Mutat Res* 2003;**544**(2-3):339–48. 209
5. Curtin K, Bigler J, Slattery ML, Caan B, Potter JD, Ulrich CM.
210 *MTHFR C677T* and *A1298C* polymorphisms: diet, estrogen,
211 and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*
212 2004;**13**:285–92. 213
6. Gemignani F, Moreno V, Landi S et al. A *TP53* polymorphism
214 is associated with increased risk of colorectal cancer and
215 with reduced levels of *TP53* mRNA. *Oncogene*
216 2004;**23**:1954–6. 217
7. Sillampää P, Hirvonen A, Kataja V et al. Vitamin D receptor
218 gene polymorphism as an important modifier of positive
219 family history related breast cancer risk. *Pharmacogenetics*
220 2004;**14**:239–45. 221
8. Smith CA, Smith G, Wolf CR. Genetic polymorphisms in
222 xenobiotic metabolism. *Eur J Cancer* 1994;**30A**(13):
223 1921–35. 224
9. Meyer DJ, Coles B, Pemble SE, Gilmore KS, Fraser GM,
225 Ketterer B. Theta, a new class of glutathione transferases
226 purified from rat and man. *Biochem J* 1991;**274**(Pt
227):409–14. 228
10. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR et al. Human gluta-
229 thione S-transferase Theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the
230 characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J*
231 1994;**300**(Pt1):271–6. 232
11. Gronau S, Koenig-Greger D, Riechelmann H. *GSTM1* enzyme
233 concentration and enzyme activity in correlation to the
234 genotype of detoxification enzymes in squamous cell
235 carcinoma of the oral cavity. *Oral Dis* 2003;**9**:62–7. 236
12. Garte S, Gaspari L, Alexandrie A et al. Metabolic gene
237 polymorphism frequencies in control populations. *Cancer*
238 *Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;**10**(12):1239–48. 239
13. Trizna Z, Clayman GL, Spitz MR, Briggs KL, Goepfert H.
240 Glutathione S-transferase genotypes as risk factors for head
241 and neck cancer. *Am J Surg* 1995;**170**:499–501. 242
14. Jourenkova-Mironova N, Voho A, Bouchardy C et al. Gluta-
243 thione S-transferase *GSTM1*, *GSTM3*, *GSTP1* and *GSTT1*
244 genotypes and the risk of smoking related oral and pharyn-
245 geal cancers. *Int J Cancer* 1999;**81**:44–8. 246
15. Amador AG, Righi PD, Radpour S et al. Polymorphisms of
247 xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma.
248 *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodont*
249 2002;**93**(4):440–5. 250
16. Buch SC, Notani PN, Bhisey RA. Polymorphism at *GSTM1*,
251 *GSTM3* and *GSTT1* gene loci and susceptibility to oral cancer
252 in an Indian population. *Carcinogenesis* 2002;**23**(5):803–7. 253
17. Kiethuubthew S, Sriplung H, Au WW. Genetic and environ-
254 mental interactions on oral cancer in Southern Thailand.
255 *Environ Mol Mutagen* 2001;**37**(2):111–6. 256
18. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM,
257 Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl*
258 *Acad Sci USA* 2003;**100**:177–82. 259
19. Drummond SN, Noronha JCM, De Marco L, Gomez R. *GSTM1*
260 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral*
261 *Oncol* 2004;**40**:52–3. 262
20. Amorin LMF, Rossini A, Mendonça GAS et al. *CYP1A1*,
263 *GSTM1*, and *GSTT1* polymorphisms and breast cancer risk
264 in Brazilian women. *Cancer Lett* 2002;**181**:179–86. 265
21. Pinto LFR, Rossini AMT, Albano RM et al. Mechanisms of
266 esophageal cancer development in Brazilians. *Mutat Res*
267 2003;**544**:365–73. 268

- 269 22. Awasthi YC, Sharma R, Singhal SS. Human glutathione S-
270 transferases. *Int J Biochem* 1994;**26**(3):295–308. 272
271 23. de Bruin WCC, Wagenmans MJM, Peters WHM. Expression of
glutathione S-transferase α , P1-1 and T1-1 in the human
gastrointestinal tract. *Jpn J Cancer Res* 2000;**91**:310–6. 273
274

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

UNCORRECTED PROOF



ELSEVIER

GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma

Sérgio Neves Drummond^a, Luiz De Marco^b, Júlio Carlos Motta Noronha^a, Ricardo Santiago Gomez^{a,*}

^a*Departamento de Patologia e Cirurgia, Faculdade de Odontologia, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil*

^b*Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil*

Received 1 April 2003; received in revised form 23 April 2003; accepted 23 April 2003

KEYWORDS

Oral squamous cell carcinoma;
GSTM1;
Polymorphism

Summary We investigated the frequency of the GSTM1 genotypes in 70 Brazilian patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) and 82 age-sex matched controls. The GSTM1 genotypes were studied by PCR-based methods. The frequency of male patients with OSCC and null for the GSTM1 (70.5%) was statistically different from the male patients from the control group (48.5%) (Odds Ratio, OR=2.53, 95% CI=1.22–5.24, $P<0.05$). The frequency of the GSTM1 null genotype (0/0) in the group with OSCC (65.7%) was statistically different from the controls (48.7%) (OR=2.01, 95% CI=1.04–3.88, $P<0.05$). The prevalence of GSTM1 deficiency (null) was significantly higher for patients with oral cancer of the floor of the mouth (OR=3.67, 95% CI=1.11–12.11, $P<0.05$). In conclusion, the GSTM1 null genotype may increase the risk for OSCC development.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the 10 most frequent cancers worldwide. In addition to genetic features, environmental factors also modulate individual susceptibility to it. Among environmental causes, it has been shown that tobacco and alcohol consumption are the most significant factors involved in OSCC development.¹ Numerous carcinogens present in tobacco are metabolized by various key enzymes, causing their metabolic activation or detoxification.² Molecular

epidemiologic studies evaluating biomarkers have provided insights into the study of interindividual variation in human cancer risk.³ Susceptibility to cancer is determined, at least in part, by the degree of expression and/or activity of enzymes involved in carcinogen activation (by phase I enzymes) or deactivation (by phase II enzymes). In a population level, cancer susceptibility can be influenced by the presence of polymorphisms in many genes.²

Glutathione S-transferase (GSTs), a phase II enzyme, is encoded by five multigene enzyme groups (μ or M, θ or T, π , α and κ) and is related to detoxification of xenobiotic substances, including polycyclic aromatic hydrocarbons and tobacco specific nitrosamines.² This enzyme catalyzes the

* Corresponding author. Tel.: +55-31-34992477; fax: +55-31-34992472.

E-mail address: rsgomez@ufmg.br (R.S. Gomez).

reaction of glutathione with a wide variety of organic compounds to form thioethers, a reaction that is sometimes a first step in a detoxification process leading to mercapturic acid formation.³ GST μ (GSTM) family maps to chromosome 1q13.3 and has a genetic polymorphism leading to complete deletion of the gene, producing a novel 7.4-kb HindIII fragment with the loss of 10.3- and 11.4-kb HindIII fragments and subsequent absence of the gene product.⁴ The homozygous GSTM1 null genotype results in loss of expression of the GSTM1 enzyme and decreased capacity to detoxify carcinogens.⁵ The relationship between this polymorphism and human cancer has been a matter of dispute. While some data suggest that it can be a risk factor for lung, laryngeal, oral and oropharyngeal tumors⁵⁻⁷ others have not confirmed such associations.^{1, 8-10} However, several of these reports included patients with upper aerodigestive tract cancer or head and neck cancer thus not investigating patients with OSCC only.

Considering that genetic susceptibility to cancer can be influenced by the localization and histopathological classification of the specific primary tumor, the aim of the present study was to investigate the association of the GSTM1 null polymorphism and the risk for OSCC in a Brazilian population.

Subjects and methods

Subjects

In the present report we investigated a cohort of 70 patients (mean age=57.5 years; range 40–84 years) with OSCC and 82 control smoker subjects (mean age=54.0 years; range 34–86 years) who attended the Dental Clinics of the School of Dentistry. All subjects were unrelated and had smoked at least 10 cigarettes/day over a 20 years period. Patients were defined as alcohol drinkers if they had been drinking a minimum of 1 shot (12.9 g of 43% alcohol/week) over a minimum of 10 years. Both the experimental and control groups had the same socio-economic status and were age and gender matched. There were 61 (87%) males and 9 (13%) females in the patient's group. Ethnicity was not established as the hazards of judging Brazilians by color, race and geographical origin have been recently demonstrated.¹¹

Oral swabs were collected from their oral cavities. Sterile plastic tips were used for oral swabs, which were immediately placed in Eppendorf microtubes containing 150 μ l of Krebs buffer (NaCl 20%, KCl 2%, CaCl₂·2 H₂O 2%, MgSO₄, KH₂PO₄, C₆H₁₂O₆). The pellet obtained after 10 min of centrifugation at

6600 \times g was stored at –20 °C until further processing. All samples from the patients with carcinoma were obtained from the lesion's contra-lateral mucosa. A signed informed consent was obtained from all participants and the study was approved by the University Ethics Committee.

DNA extraction

The DNA extraction was carried out as described by Boom et al.¹²

GSTM1 polymorphism analysis

The GSTM1 genotypes were studied by the polymerase chain reaction (PCR) as previously described.⁵ Briefly, reactions were done in a final volume of 25 μ l containing 5 μ l genomic DNA, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8.4), 0.1% Triton X-100, 11.4 μ l H₂O, 5.0 μ l dNTPs and 2.5 U Taq DNA polymerase. Amplification of β -globin was used as an internal control. Amplification was performed in a PTC-100-60 thermocycler (MJ Research, Watertown, Massachusetts). The amplification conditions consisted of an initial denaturing step at 94 °C for 5 min followed by 35 cycles of amplification at 95 °C for 30 s, 64 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, followed by final elongation at 72 °C for 5 min. Each PCR amplification yields a 220 bp specific product which was analyzed in a 6.5% polyacrylamide gel electrophoresis followed by silver stain.

The χ^2 test was used for statistical analysis. The significance was set at a *P* value of <0.05.

Results

The percentage of subjects with OSCC who were alcohol drinkers (94.3%) was not statistically different from the control (93.9%). Fig. 1 shows the bands identifying each individual genotype of a representative sample. Individuals homozygous for the wild type GSTM1 (+/+) and heterozygous (+/0) were grouped together. The frequency of male patients with OSCC and null for the GSTM1 (0/0) (70.5%) was statistically different from the male patients from the control group (48.5%) (Odds ratio, OR=2.53, 95% CI=1.22–5.24, *P*<0.05). The frequency of female patients in the case group who were null for the GSTM1 genotype (44.4%) was not statistically different from the female control group (50.0%). The allele distribution of the GSTM1 genotypes between cases and controls is shown in Table 1. The frequency of the GSTM1 null genotype in the group with OSCC (65.7%) was statistically different from the controls (48.7%) (OR=2.01, 95%

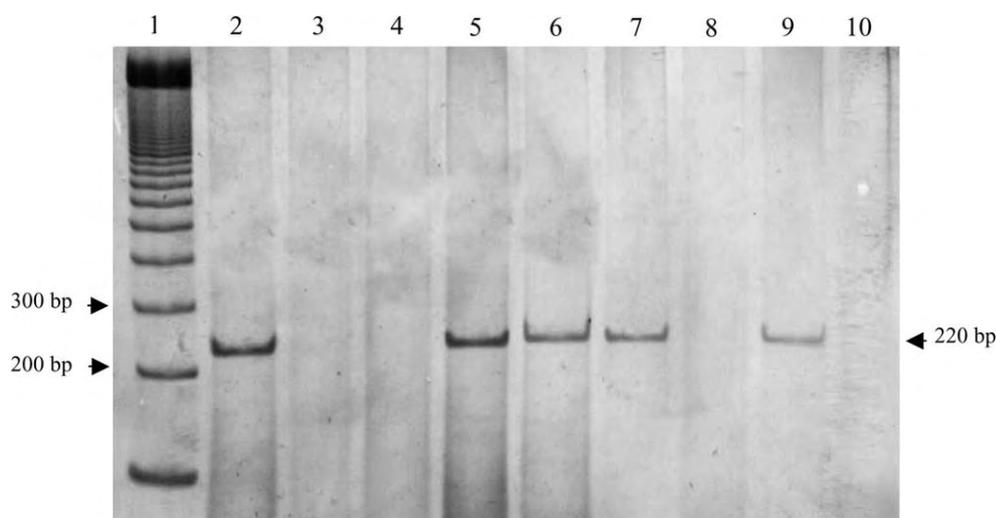


Figure 1 Electrophoretic pattern for GSTM1 run in a 6.5% polyacrylamide gel from representative samples analyzed by PCR-based methods. Lane 1: 100 bp ladder; lanes 2, 5, 6, 7 and 9: individuals GSTM1 wild type homozygous or heterozygous; lanes 3, 4, 8 and 10: individuals GSTM1 null genotype.

Table 1 Glutathione S-transferase (GSTM1) genotypes in oral squamous cells carcinoma patients and controls

	n	GSTM1 genotype		χ^2	P ^a	Odds ratio (95% confidence interval)
		0/0 (%)	+/0 or =+/+ (%)			
Control	82	40 (48.7)	42 (51.3)			
Oral cancer	70	46 (65.7)	24 (34.3)	4.40	<0.05	2.01 (1.04–3.88)
<i>Location</i>						
Oral floor	18	14 (77.8)	4 (22.2)	4.99	<0.05	3.67 (1.11–12.11)
Tongue	23	14 (61)	9 (39)	1.05	n.s.	—
Gingiva	11	5 (45.5)	6 (54.5)	0.04	n.s.	—
Palate	8	5 (62.5)	3 (37.5)	0.55	n.s.	—
Retromolar	7	6 (85.7)	1 (14.3)	—	—	—
Buccal mucosa	3	2 (66.6)	1 (33.4)	—	—	—

^a Versus control. ns., Not significant. 0/0 GSTM1 null; +/- GSTM1 heterozygous; +/+ GSTM1 wild type homozygous.

CI=1.04–3.88, $P<0.05$). The prevalence of GSTM1 deficiency (null) was significantly higher for patients with oral cancer of the floor of the mouth (OR=3.67, 95% CI=1.11–12.11, $P<0.05$). The OR of GSTM1 null genotype in retromolar region and buccal mucosa was not estimated due to the small number of cases available for investigation.

Discussion

Since exposure to tobacco and alcohol consumption is involved in oral cancer development, the relationship between genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and cancer susceptibility is of significant interest. Genetic polymorphisms have been identified for the μ , θ and π GST families, with GSTM1, GSTM3, GSTT1 and GSTP1 genes possessing

polymorphic alleles that have been associated with altered levels of GST protein expression.²

The GSTM1 null genotypes (0/0) polymorphism is the most widely studied and has been linked to increased susceptibility to head and neck cancer.^{7,13–16} However, this association has not been confirmed by other authors.^{17,18} In the present study, a positive association between the GSTM1 null genotype (0/0) and OSSC was observed. The discrepancy between our findings and previous reports that did not find any association between this polymorphism and oral cancer could be due to ethnic differences, tumor-site-related effect of the GSTM1 null genotype or inadequate control group. In our study only patients with oral cancer and histological diagnosis of squamous cell carcinoma were analyzed. In addition, all subjects belonging to our control group were smokers from the same

geographic region and socio-economic status as the patient's group and were also age-sex matched. However, one of the several limitations of molecular epidemiologic studies is the vulnerability to confounding factors.³

The association between GSTM1 and oral cancer has been investigated by isolated or combined analysis with other gene markers. A preliminary study that included a mixed racial cohort showed that the GSTM1 null genotype was associated with upper aerodigestive tract cancer (OR=2.37).¹³ In addition, a significant association between predicted epoxide hydrolase genotype activity, a genetic polymorphism involved in the metabolic activation of carcinogens, and orolaryngeal cancer risk has been reported in Caucasian subjects with the GSTM1 null (OR=3.5) but not GSTM1 [+] (OR=0.9) genotype.¹⁶ An interaction between different CYP1A1 polymorphisms and GSTM1 null genotype and increased risk for oral cancer was also demonstrated by different investigators (OR=4.3)¹⁴ (OR=10.2).¹⁵

The association between GSTM1 deficiency and oral cancer has also been linked to the site of the tumor.¹⁹ While they showed an OR of 2.5 between GSTM1 null genotype and oral cancer including all sites, this value increased to 3.4 in patients with cancer of the lower gingiva. In the present study, an increase of the OR of 2.01 to 3.67 was found when the floor of the mouth was considered; again suggesting that the GSTM1 null genotype is particularly associated with tumor development in sub-sites of the oral cavity.

In conclusion, the present study shows an increased prevalence of the GSTM1 null genotype in patients with OSCC particularly male subjects and those with tumors of the floor of the mouth. This data indicates that the GSTM1 deletion confers an increased risk for OSSC.

Acknowledgements

This study was supported in part by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Programa de Excelência (PRO-NEX) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. Dr. L. De Marco and R.S. Gomez are research fellows of CNPq.

References

- Matthias C, Bockmühl U, Jahnke V, Jones PW, Hayes JD, Alldersea J. 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* 1998;**8**:91–100.
- Lazarus P, Park JY. Metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 2000;**36**:421–431.
- Perera FP, Weinstein IB. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 2000;**21**:517–524.
- Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and GSTM1 deletion. *J Biol Chem* 1998;**273**:3517–3527.
- Sreelekha TT, Ramadas K, Pandey M, Thomas G, Nalinakumari KR, Pillai MR. Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol* 2001;**37**:593–598.
- Quiñones L, Lucas D, Godoy J, et al. CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 genetic polymorphisms. The effect of single and combined genotypes on lung cancer susceptibility in Chilean people. *Cancer Lett* 2001;**174**:35–44.
- Mulder TJP, Manni JJ, Roelofs HMJ, Peters WHM, Wiersma A. Glutathione S-transferase and glutathione in human head and neck cancer. *Carcinogenesis* 1995;**16**:619–624.
- Oude-Ophuis MB, Lieshout EMMV, Roelofs HMJ, Peters WHM, Manni JJ. Glutathione S-transferase M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphism in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. *Cancer* 1998;**82**:936–943.
- Park JY, Muscat JE, Ren Q, Schantz SP, Harwick RD, Stern JC. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent* 1997;**6**:791–797.
- Amador AG, Righi PD, Radpour MD, Everett ET, Weisberger E, Langer M, et al. Polymorphisms of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endol* 2002;**93**:440–445.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:177–182.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jausen CK, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;**28**:495–503.
- Trizna Z, Clayman GL, Spitz MR, Briggs KL, Goepfert H. Glutathione S-transferase genotypes as risk factors for head and neck cancer. *Am J Surg* 1995;**170**:499–501.
- Tanimoto K, Hayashi S, Yoshiga M, Ichikawa T. Polymorphisms of the CYP1A1 and GSTM1 gene involved in oral squamous cell carcinoma in association with a cigarette dose. *Oral Oncol* 1999;**35**:191–196.
- 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* 2000;**36**:267–271.
- Park JY, Schantz SP, Lazarus P. Epoxide hydrolase genotype and orolaryngeal cancer risk: interaction with GSTM1 genotype. *Oral Oncol* 2003;**39**:483–490.
- Hahn M, Hagedorn G, Kuhlisch E, Schackert HK, Eckelt U. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity cancer. *Oral Oncol* 2002;**38**:486–490.
- González MV, Alvarez V, Pello MF, Menéndez MJ, Suárez C, Coto E. Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase M1, and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in susceptibility to head and neck cancer. *Clin Pathol* 1998;**51**:294–298.
- Nomura T, Noma H, Shibahara T, Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T. Aldehyde dehydrogenase 2 and glutathione S-transferase M 1 polymorphisms in relation to the risk for oral cancer in Japanese drinkers. *Oral Oncol* 2000;**36**:42–46.

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](#)