

ANDREI LEICHSENRING

***INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS
GENES CYP1A1 E GSTP1 EM PORTADORES DE
TUMORES DE CAVIDADE BUCAL***

**Dissertação apresentada como
requisito parcial à obtenção do grau
de Mestre em Genética, curso de
Pós-Graduação em Genética,
Universidade Federal do Paraná**

**Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Enilze
Maria de Souza F. Ribeiro
Co-orientador: Prof. Dr. Iglénir
João Cavalli**

**CURITIBA
2005**

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro e ao professor Dr. Iglenir João Cavalli, por toda a orientação conferida e por compartilhar inúmeros valores que vão além do conhecimento acadêmico. Por suas amizades, por sua ética e por seu apoio em todos os momentos.

A todos os professores do curso de pós-graduação e aos demais professores do Departamento de Genética, por transmitirem conhecimentos de valores imensuráveis e por sua ajuda em todas as etapas do mestrado, em especial às professoras Eleidi Alice Chautard-Freire-Maia, Roseli Wassem, Maria da Graça Bicalho e Maria Luiza Petzl-Erlor.

Aos colegas do curso de pós-graduação e aos colegas do Laboratório de Citogenética Humana, por enriquecerem o dia-a-dia com suas colaborações e com suas amizades.

A todos os membros do Departamento de Genética, sua coordenação e ao CNPq e CAPES, pelos apoios humano, intelectual e financeiro, possibilitando a realização desta dissertação.

A todos os indivíduos e instituições envolvidos nesta pesquisa, sobretudo ao doutores Benedito W. Oliveira, Gyl Ramos e Ilce Mara de Syllos Cólus, cujos conhecimentos e ajuda foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Ao Hospital Erasto Gaertner, Universidade Estadual de Londrina e Universidade Federal do Paraná, aos seus professores e funcionários, que contribuíram com seu auxílio, conhecimento e infra-estrutura. A todos os pacientes e familiares envolvidos, sem os quais este trabalho não seria possível.

Aos meus familiares, especialmente aos meus pais e aos meus avós, por seu apoio incondicional e incentivo diário. Ao meu irmão e à minha prima, que além de todo o apoio e incentivo, também contribuíram com este estudo através de seus conhecimentos. Aos meus amigos que há muitos anos me estimulam, apóiam-me em quaisquer decisões e que também enriqueceram minha vida e os anos nos quais esta pesquisa foi realizada.

*"Ter alegria ao observar e
compreender é o dom mais belo
da natureza"
(Albert Einstein)*

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 TUMORES DE CAVIDADE BUCAL	3
1.1.1 Epidemiologia	3
1.1.2 Fatores de risco	5
1.1.3 Prevenção	6
1.1.4 Aspectos clínicos	6
1.1.5 Classificação	7
1.1.6 Diagnóstico	8
1.1.7 Tratamento	8
1.2 SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA AOS TUMORES DE CAVIDADE BUCAL	9
1.2.1 Genética da metabolização xenobiótica	11
1.2.2 Polimorfismos de genes responsáveis pela metabolização de xenobióticos	13
1.2.2.1 Superfamília citocromo P450 e polimorfismos do gene <i>CYP1A1</i>	15
1.2.2.2 Enzimas GSTs e polimorfismos do gene <i>GSTP1</i>	18
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Caracterização da amostra	23
3.2 Critérios de inclusão e exclusão da amostra	24
3.3 Coletas do sangue e do tecido tumoral e armazenamento das amostras	24
3.4 Extrações de DNA de sangue periférico	25
3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	25
3.5.1 Análise do polimorfismo Ile/Val do gene <i>CYP1A1</i>	26
3.5.2 Análise do polimorfismo <i>BsmI</i> do gene <i>GSTP1</i> por PCR-RFLP	27

3.6	Análise estatística	28
4	RESULTADOS	30
4.1	Descrição de variáveis sócio-demográficas e respectivos genótipos	30
4.2	Análise da distribuição dos genótipos por sexo e idade	33
4.3	Análise do Equilíbrio de Hardy e Weinberg	34
4.4	Análise haplotípica	35
4.5	Estudo de associação	35
4.6	Comparação com dados da literatura	36
5	DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÃO	46
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
8	ANEXOS	62
8.1	ANEXO 1 – INFORMAÇÕES AO DOADOR	62
8.2	ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO	64
8.3	ANEXO 3 - QUESTIONÁRIO PESSOAL	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - VARIÁVEIS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES E RESPECTIVOS GENÓTIPOS	29
TABELA 2 - VARIÁVEIS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS DOS INDIVÍDUOS-CONTROLE E RESPECTIVOS GENÓTIPOS	31
TABELA 3 - NÚMERO DE INDIVÍDUOS HOMOZIGOTOS SELVAGENS, HETEROZIGOTOS E HOMOZIGOTOS MUTANTES PARA OS POLIMORFISMOS ANALISADOS NOS GENES <i>CYP1A1</i> E <i>GSTP1</i> , EM PACIENTES E CONTROLES	33
TABELA 4 - VALORES DE χ^2_1 E P PARA VERIFICAÇÃO DO EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG	33
TABELA 5 - FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS DOS DIFERENTES HAPLÓTIPOS <i>CYP1A1</i> / <i>GSTP1</i> NOS PACIENTES E CONTROLES E VALORES DE χ^2_1 E χ^2_8	34
TABELA 6 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>CYP1A1</i> , POLIMORFISMO ILE/VAL, EM POPULAÇÕES CAUCASÓIDES, SEGUNDO DIFERENTES DADOS DA LITERATURA	35
TABELA 7 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>GSTP1</i> EM POPULAÇÕES CAUCASÓIDES, SEGUNDO DIFERENTES DADOS DA LITERATURA	35

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - PADRÃO DE BANDAS DO POLIMORFISMO ILE/VAL DO GENE <i>CYP1A1</i>	26
FIGURA 2 - PADRÃO DE BANDAS DO POLIMORFISMO <i>BSMAI</i> DO GENE <i>GSTP1</i>	28

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ah – aril-hidrocarbono
Ala – alanina
CCE – carcinoma de células escamosas
CYP – citocromo P450
CYP1A1 – citocromo P450, subfamília I, polipeptídeo 1
GSTP1 – glutationa S-transferase pi-1
GSTs – glutationa-S-transferases
H – heterozigoto(s)
HIV – vírus da imunodeficiência humana
HM – homozigoto(s) mutante(s)
HPV – papilomavírus humano
HS – homozigoto(s) selvagem(ns)
IC – intervalo de confiança
Ile – isoleucina
INCA – Instituto Nacional do Câncer
NATs – N-acetiltransferases
OR – razão de probabilidade
PAHs – hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PCR – reação em cadeia da polimerase
RFLP – polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
Val – Valina

RESUMO

O câncer de cavidade bucal constitui-se, juntamente com o câncer de orofaringe, na neoplasia de maior prevalência em cabeça e pescoço e tem como principais fatores de risco o tabaco e o álcool. Em 2004, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou 10.635 novos casos no Brasil para o ano de 2003, com 3.245 óbitos devido a esse tipo de tumor. Enzimas responsáveis pela metabolização de xenobióticos, tais como compostos provenientes do tabaco, podem participar de forma indireta do mecanismo de carcinogênese, ao exercer um papel importante na ativação e detoxificação destes compostos e, assim, na susceptibilidade individual à doença. Por este motivo, polimorfismos de genes codificadores de tais enzimas, principalmente das famílias *CYPs*, *GSTs* e *NATs*, vêm sendo estudados e uma associação entre determinados genótipos e alguns tipos de tumor já foi estabelecida. Este trabalho teve como objetivo investigar a associação entre variantes dos genes *CYP1A1* e *GSTP1*, cujos produtos enzimáticos atuam, respectivamente, na fase I (fase de ativação) e na fase II (fase de detoxificação) do metabolismo, e o câncer de cavidade bucal. O polimorfismo do gene *CYP1A1* analisado neste trabalho resulta de uma mutação de ponto ($A_{4889} \rightarrow G$) que substitui um aminoácido isoleucina (Ile) por uma valina (Val). O alelo resultante desta mutação é denominado *CYP1A1*2B*. A variante *GSTP1* estudada apresenta uma transição $A \rightarrow G$ no nucleotídeo +313 do éxon 5, mudando o códon 105 de ATC (Ile) para GTC (Val), resultando no alelo *GSTP1*B*. Há evidências de que a atividade catalítica das enzimas codificadas por estas variantes encontra-se alterada, influenciando, assim, na susceptibilidade ao câncer. Este estudo comparou 72 indivíduos portadores de câncer de cavidade bucal com 60 indivíduos-controle que nunca apresentaram nenhum tipo de câncer, pareados por idade, sexo, grupo étnico e hábito tabagista. Foram utilizadas as técnicas de PCR e PCR-RFLP, seguidas de eletroforese em gel de agarose, para as análises moleculares. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas das variantes alélicas, genotípicas e haplotípicas de *CYP1A1*2B* (OR=1,06; IC 95% = 0,49 – 2,29; P=1) e *GSTP1*B* (OR=1,40; IC 95% = 0,70 – 2,79; P=380720 ± 0,005483) com o câncer de cavidade bucal.

1 INTRODUÇÃO

Células aberrantes, cuja regulação da multiplicação celular esteja comprometida, podem gerar descendentes que herdam a propensão para proliferar sem responder à regulação, resultando em uma proliferação celular clonal capaz de se expandir indefinidamente (CAVENEY e WHITE, 1996). Esta expansão culmina com a formação de massas tumorais, que podem ser benignas ou malignas. Quando malignas, têm potencial para se disseminar e são denominadas de “câncer”.

A etiologia genética do câncer é atualmente bem estabelecida. A transformação de uma célula normal em maligna representa um processo em etapas, envolvendo pelo menos quatro a sete alterações genéticas (VOGELSTEIN e KINZLER, 1993). Isto explica, em parte, porque o câncer é uma doença associada ao envelhecimento. As principais anormalidades genéticas observadas no câncer incluem uma expressão aumentada de proto-oncogenes (FEARON e VOGELSTEIN, 1990), inativação de genes supressores de tumor (WEINBERG, 1991), instabilidades cromossômicas (LENGAUER et al., 1998), alterações nos genes de reparo do DNA (HOEIJMAKERS, 2001), reativação da telomerase (GREIDER e BLACKBURN, 1996) e alterações epigenéticas (ROUNTREE et al., 2001).

A maioria das neoplasias envolve genes relacionados ao crescimento e proliferação celular, como os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor citados acima (CHANG et al., 1995). Os proto-oncogenes, que atuam no crescimento e diferenciação celular, são genes celulares normais que podem se tornar oncogenes através de translocações cromossômicas, ampliações gênicas e mutações de ponto (KNUDSON, 1985). Estes têm caráter dominante, de modo que alterações em um único alelo são suficientes para a transformação maligna da célula. Entre os principais agentes que podem promover tal ativação encontramos as radiações, infecções virais e os mais diversos carcinógenos. Já os genes supressores tumorais atuam como reguladores negativos da proliferação celular (WEINBERG, 1991; VERMA e TRIANTAFILLOU, 1998) e mutações de perda de função neste grupo têm caráter recessivo e também contribuem para o processo canceroso.

Ao contrário de outras doenças genéticas, que costumam ser causadas somente por mutações na linhagem germinativa, o câncer é causado, sobretudo, por mutações em células somáticas, devido a interações genético-ambientais (PERERA, 1997). Mesmo assim, cerca de 5% dos indivíduos apresentam mutações genéticas que foram herdadas e os predispõem ao desenvolvimento de tipos específicos de câncer (FEARON, 1997).

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, sendo que o Instituto Nacional do Câncer, do Ministério da Saúde, estimou 402.190 casos novos e 126.960 óbitos como consequência da doença no ano de 2003 no Brasil. Aqueles que mais acometem a população brasileira são os cânceres de pele não-melanoma, seguidos pelas neoplasias de mama, próstata, pulmão e estômago (INCA, 2004). Devido à morbidade e mortalidade causada por esta doença, grande ênfase tem sido dada às pesquisas nesta área, com grandes avanços sendo realizados, nos últimos dez anos, quanto ao conhecimento da etiopatologia, diagnóstico, prognóstico e terapêutica do câncer.

As taxas de mortalidade nas diferentes etnias, sexos e grupos etários são extremamente variáveis, sendo que para os carcinomas de cavidade bucal, as faixas anuais de incidência e mortalidade variam até 20 vezes entre diferentes países. Tais diferenças são devidas aos diferentes hábitos das populações, expectativa de vida, educação preventiva, estatísticas e qualidade dos relatórios médicos dos diferentes países (DAMM e BOUQUOT, 1998). No Brasil, onde a maioria da população não tem acesso adequado à saúde pública, incluindo a dentária, bem como à higiene e alimentação necessárias, os tumores de cavidade bucal têm uma alta prevalência. Constituem o quinto tipo mais comum entre os indivíduos do sexo masculino no Estado do Paraná, sendo menos frequentes que os tumores de pele não-melanoma, pulmão, estômago e próstata (INCA, 2004). De acordo com o Ministério da Saúde, estimou-se um total de 10.635 novos casos de câncer de boca no país no ano de 2003, com cerca de 3.245 óbitos. Dentre os novos casos, 680 localizados no estado do Paraná, com 130 apenas em Curitiba, levando a um total de 280 óbitos em todo o estado.

1.1 TUMORES DE CAVIDADE BUCAL

Neoplasmas de boca são definidos como aqueles envolvendo a cavidade bucal, que começa nos lábios e termina no pilar anterior, onde ocorre a transição da boca para a faringe (ZAKRZEWSKA, 1999). Os cânceres da cavidade bucal e orofaringe são o tipo mais comum de câncer de cabeça e pescoço (LIPPMAN e HONG, 2001) e representam aproximadamente 3% de todas as doenças malignas masculinas e 2% de todas as doenças malignas femininas nos Estados Unidos. Em 2004, estima-se cerca de 20.010 novos casos de câncer bucal naquele país, com aproximadamente 5.160 mortes devido a esta neoplasia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2004). O carcinoma de células escamosas (CCE) é o tipo que mais prevalece, estando presente em mais de 90% dos casos de neoplasias bucais (SILVERMAN, 1998; 2001; NEVILLE et al., 2002).

1.1.1 Epidemiologia

Em todo o mundo, o câncer bucal é estimado como sendo o sexto tipo mais comum de câncer, com maior prevalência na Índia (BOYLE et al., 1992) onde representa cerca de 40% de todos os tipos de câncer encontrados (CLARK, 1999). Um aumento na incidência também foi relatado na Europa central e oriental, especialmente entre jovens do sexo masculino (MACFARLANE et al., 1994). Cerca de 2.000 novos casos de câncer bucal são detectados por ano só no Reino Unido (ZAKRZEWSKA, 1999) e as mortes chegam a 900 a cada ano, sendo comparáveis àquelas atribuídas aos cânceres de mama, cervicais e melanomas (JOHNSON e WARNAKULASURIYA, 1993). A mortalidade é elevada porque, apesar do prognóstico para o câncer labial ser bom, o prognóstico para o CCE intra-bucal continua ruim (HINDLE et al., 1996).

O câncer bucal ocorre com maior frequência em indivíduos de meia-idade ou além dela, embora nos últimos anos um número alarmante de casos esteja também sendo documentado em adultos jovens (LLEWELLYN et al., 2001). Segundo uma perspectiva epidemiológica e clínica, os “cânceres bucais” podem ser subdivididos em três categorias: carcinomas dos lábios externos, carcinomas da cavidade bucal

propriamente dita e carcinomas orofaríngeanos. Os intra-buciais e orofaríngeanos são mais comuns em homens do que em mulheres, em uma taxa de 2:1 (RIES et al., 1991; SWANGO, 1996; NEVILLE et al., 2002). No Brasil, no ano de 2003, estimou-se que o câncer bucal acometeu cerca de duas vezes e meia mais homens (7.750 casos) do que mulheres (2.885 casos) (INCA, 2004). Contudo, a disparidade entre homens e mulheres vem se tornando menos pronunciada a cada década, provavelmente devido à maior exposição destas aos carcinógenos, como álcool e tabaco (CHEN et al., 1990; SILVERMAN, 1998).

A incidência anual de câncer bucal em afro-americanos (12,4 casos para cada 100.000 indivíduos) é maior que a observada entre caucasianos (9,7 casos para cada 100.000 indivíduos). A incidência mais elevada (20,5 casos para cada 100.000 indivíduos) é observada entre afro-americanos do sexo masculino (RIES et al., 1991; SILVERMAN, 2001).

Em contraste com os carcinomas intra-buciais e orofaríngeanos, os tumores dos lábios externos são epidemiologicamente mais semelhantes aos carcinomas de células escamosas da pele, ocorrendo principalmente em homens brancos (NEVILLE et al., 2002). Estes tumores estão mais associados à exposição crônica à luz solar, embora também exista uma relação com a região de contato com cigarros e hastes de cachimbos em tabagistas (SILVERMAN e SHILLITOE, 1998). Estas malignidades são muito mais comuns em homens, provavelmente pelo fato de os homens apresentarem profissões que resultam em maior exposição solar acumulativa. Os lábios costumavam ser o local mais comum de câncer bucal, entretanto a incidência de câncer nesta região tem decrescido significativamente nos últimos cinquenta anos porque, em muitos países, um menor número de homens vem mantendo ocupações ao ar livre (SILVERMAN, 1998; NEVILLE et al., 2002).

De 1985 a 1996 a taxa de sobrevivência de cinco anos para carcinomas intra-buciais variava de 47% a 52% entre caucasianos, contra 27% a 33% entre afro-americanos, parcialmente porque, em afro-americanos, o diagnóstico costuma ser mais tardio. Em contrapartida, a taxa de sobrevivência de cinco anos para o câncer labial atingiu números superiores a 95% (SILVERMAN, 1998; NEVILLE et al., 2002).

1.1.2 Fatores de risco

Existem importantes evidências de que o tabaco, em todas as suas formas, incluindo mascar o fumo, tem efeitos carcinogênicos no trato aerodigestivo superior, o que inclui a boca (IARC, 1986). O risco para tabagistas com consumo exacerbado de tabaco (que fumam cerca de 80 cigarros por dia) é 17 vezes maior que o risco em não fumantes e a porcentagem de câncer bucal em fumantes é duas a três vezes maior do que a da população em geral (MASHBERG et al., 1993; LEWIN et al., 1998; NEVILLE et al., 2002). Além disso, após o tratamento do câncer bucal, pacientes que continuam com os hábitos tabagistas, têm um risco de duas a seis vezes maior de desenvolver uma malignidade secundária nas vias aerodigestivas do que os pacientes que cessam estes hábitos (SILVERMAN e GRIFFITH, 1972; SILVERMAN e SHILLITOE, 1998). O uso da maconha também é visto como um potencial fator de risco, principalmente entre os jovens (SILVERMAN, 2001; SCHANTZ e YU, 2002). Existem evidências igualmente importantes que também indicam o álcool como agente carcinogênico, e revelam que este age de modo sinérgico com o tabaco (IARC, 1989). O etilismo, em geral, aumenta de três a nove vezes o risco para o câncer de boca.

Praticamente não há evidências convincentes de que uma higiene bucal inadequada, o uso de anti-sépticos ou que a maioria das infecções bucais de origem viral tenham papel importante neste tipo de carcinogênese (JOHNSON, 1991; MCKAIG et al., 1998). Entretanto, alguns estudos sugerem que o papilomavírus humano (HPV) possa estar associado a alguns tipos de câncer bucal, já que este é encontrado em 14% a 22% dos portadores da doença (SUGERMAN e SHILLITOE, 1997). Uma maior incidência da doença também foi relatada em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), provavelmente devido à imunossupressão (FLAITZ et al., 1995). Foi sugerido que líquen plano e fibrose submucosa bucal estão associados a um risco aumentado de malignidade. Ampla variação do potencial maligno destas lesões foi relatada. Embora lesões pré-malignas (displasias epiteliais) possam ser reconhecidas, muitos cânceres de cavidade bucal não passam por um estágio de pré-malignidade. Nem todas as lesões pré-malignas evoluem para câncer e outras regridem, mas muitas vezes o grau de displasia pode ser um fator

prognóstico importante (GUPTA et al., 1986). Outras doenças infecciosas, como sífilis ou candidíase, bem como a desnutrição e a anemia por deficiência de ferro, são fatores que podem predispor o indivíduo ao desenvolvimento destas lesões. O consumo de frutas e vegetais pode apresentar um discreto efeito protetor (DAMM e BOUQUOT, 1998; CLARK, 1999; SCULLY e PORTER, 2000).

Existe um discreto risco familiar para o câncer bucal, o qual pode acontecer por semelhantes exposições ao álcool e ao tabaco entre membros de uma família (GOLDSTEIN et al., 1994). Indivíduos que sofreram transplantes renais também apresentam maior incidência de câncer labial, o que pode ser devido à imunossupressão (KING et al., 1995), assim como acontece nos indivíduos imunossuprimidos pelo HIV.

1.1.3 Prevenção

A prevenção primária envolve eliminar o uso do tabaco. Regressões de lesões pré-malignas foram relatadas em ex-fumantes (GUPTA et al., 1992; 1995). A identificação precoce de lesões pré-malignas e de cânceres bucais de tamanho reduzido permite que os pacientes sejam tratados precocemente.

A triagem para o câncer bucal é simples, não requerendo nenhum apoio laboratorial; no máximo requer uma boa fonte de luz. Cirurgiões-dentistas devem ser encorajados à triagem dos pacientes, especialmente se estes forem do sexo masculino, tabagistas e estiverem acima dos 40 anos de idade.

Campanhas públicas são necessárias para conscientizar a população sobre os riscos do câncer bucal. Além disso, adultos que se submetem aos exames da cavidade bucal são melhores educados sobre a doença e mais cientes dos riscos do câncer bucal do que aqueles que não se submetem a tais exames (JOVANOVIC et al., 1992).

1.1.4 Aspectos clínicos

O câncer de cavidade bucal se apresenta numa variedade de formas, mas as lesões mais precoces são assintomáticas. Lesões pré-malignas e malignas precoces

podem se apresentar indolores e como manchas avermelhadas ou esbranquiçadas. As não-homogêneas ou que apresentam eritroplasia são as que mais indicam displasias severas. Algumas lesões malignas podem se apresentar como pequenas úlceras indolores. Lesões pré-malignas podem regredir se o uso do tabaco é descontinuado. A malignidade intermediária pode se apresentar como ulcerações persistentes, com fixação em tecidos adjacentes e linfonomegalia regional. Lesões mais tardias podem conferir, além do aspecto ulcerado, destruição óssea importante, levando à mobilidade ou perda dos dentes e até mesmo à fratura patológica (ZAKRZEWSKA, 1999).

1.1.5 Classificação

A comparação das características do tecido original e da produção do seu produto normal com as características do tecido tumoral é denominada “gradação”. Desta forma, pode-se classificar as lesões histopatologicamente, graduando-as em uma escala de I a III ou I a IV, de modo que os tumores menos diferenciados recebam graduação mais alta. O grau histopatológico das lesões é relacionado ao seu comportamento biológico (DAMM e BOUQUOT, 1998). Os principais tipos de câncer encontrados na cavidade bucal são (ZAKRZEWSKA, 1999):

- Carcinomas epiteliais
 - de células escamosas
 - verrucosos
 - de células fusiformes
 - adenóide-escamosos
 - de células basais
 - melanomas
- Odontogênicos
- Tumores ósseos primários
- Tumores de glândulas salivares
 - mucoepidermóides
 - de células actínicas

-- adenocarcinomas

- Hematopoiéticos
- Linforeticulares
- Metástases

Mais de 90% dos tumores de cavidade bucal são do tipo carcinoma de células escamosas, surgindo a partir da mucosa adjacente (SILVERMAN, 1998; 2001; NEVILLE et al., 2002). Tumores das glândulas salivares têm outros fatores etiológicos e são raros.

1.1.6 Diagnóstico

Devido ao fato da taxa de sobrevida de cinco anos estar associada ao estágio em que a doença é diagnosticada, esforços para prevenção e detecção precoce contribuem para diminuir a incidência e melhorar a sobrevida dos pacientes (NEVILLE e DAY, 2002).

O diagnóstico depende do clínico ou mesmo do paciente que possam identificar a lesão ou algum sintoma em estágio precoce. Como grande parte destas lesões é assintomática, o clínico deve suspeitar, sobretudo, de indivíduos que apresentem lesões pré-malignas e que venham sendo expostos aos fatores de risco. As investigações mais úteis para suspeitas de malignidades bucais são biópsias que podem ser realizadas em mais de uma área, normalmente sob anestesia local, embora a investigação possa ser facilitada sob anestesia geral. Radiografias intra-bucais, dos maxilares e mandíbula, bem como tomografia computadorizada, podem ajudar a definir a extensão da lesão e o envolvimento ósseo e nodular (ZAKRZEWSKA, 1999).

1.1.7 Tratamento

O tratamento para o câncer de boca é principalmente cirúrgico. Poucos pacientes são tratados somente com radioterapia e menos ainda com quimioterapia.

Radioterapia e quimioterapia são normalmente utilizadas como terapia adjuvante (ZAKRZEWSKA, 1999).

O objetivo do procedimento cirúrgico é a excisão completa da lesão, para eliminar possíveis canais de disseminação, como o sistema linfático, nervos e vasos sanguíneos. Esta cirurgia é seguida por outra reconstrutiva que visa restaurar as funções orgânicas, bem como melhorar a qualidade de vida. Cirurgias paliativas são utilizadas apenas para tumores incuráveis. Alguns procedimentos cirúrgicos envolvem apenas tecidos moles. Dissecções no pescoço são requeridas frequentemente, com conseqüente aumento da morbidade pós-operatória. A reconstrução pode envolver não apenas a pele, mas também ossos, e requerer implantes.

Radioterapia é raramente usada como tratamento primário. Ela é mais utilizada para diminuir o tumor antes de uma cirurgia ou para prevenir recorrências e eliminar tecido residual após uma ressecção incompleta. As complicações da radioterapia incluem mucosite bucal e osteorradionecrose, trazendo dificuldades do manejo dos pacientes. Radioterapia também é usada se houver disseminação extracapsular, neste caso sendo iniciada seis semanas antes da cirurgia.

Quimioterapia é usada quase que somente como tratamento paliativo, quando há recorrência local ou metástases. Alguns estudos, entretanto, demonstram que a quimioterapia adjuvante para CCE de cabeça e pescoço resulta em um aumento significativo da sobrevida, às custas, porém, de um aumento na morbidade (EL-SAYED e NELSON, 1996).

1.2 SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA AOS TUMORES DE CAVIDADE BUCAL

Acredita-se que os fatores genéticos exercem grande influência no processo de transformação de lesões bucais benignas para carcinomas de cavidade bucal (LICHTENSTEIN et al., 2000). De acordo com análises estatísticas baseadas na incidência de carcinomas de cabeça e pescoço, sugere-se que estes tumores surgem após 6 a 10 eventos genéticos independentes (ROSSI, 1999). Alterações moleculares em tumores de cavidade bucal vêm sendo investigadas, mas ainda existem dúvidas

quanto ao seu valor prognóstico em lesões pré-cancerosas (WARNAKULASURIYA, 2000). Segundo LIPPMAN e HONG (2001), a padronização de testes moleculares deveria ser estabelecida para que fossem tomados procedimentos mais adequados com pacientes portadores de leucoplasia, já que informações de caráter molecular podem ser de grande auxílio na determinação do risco e na condução do tratamento de pacientes portadores de lesões indicativas de câncer bucal.

Pesquisas no campo da epidemiologia molecular têm fornecido evidências da contribuição do ambiente no surgimento do câncer humano e também sobre as situações de risco fortemente influenciadas pela susceptibilidade genética (WEINBERG, 1992). Aliando-se a metodologia molecular, principalmente a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), os modelos laboratoriais *in vitro* e *in vivo* e os diversos métodos bioquímicos, aos dados obtidos pela epidemiologia clássica, possibilita-se não apenas o levantamento rápido dos riscos populacionais, mas também individuais, no surgimento de neoplasias (KATO et al., 1994; FEIGELSON et al., 1996; SHI et al., 1996). Dessa forma, possibilita-se a intervenção precoce e é fornecida uma base para o tratamento destas neoplasias (HUSSAIM e HARRIS, 1998). Para tanto, faz-se necessário o uso de biomarcadores que possam sinalizar eventos em amostras ou sistemas biológicos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1987; NEBBERT et al., 1996). O biomarcador pode ser definido como método, estrutura ou processo que se encontra na via causal, ou intimamente ligado a esta, entre o momento da exposição e o câncer, em qualquer etapa do processo carcinogênico (BARTSCH, 2000). A presença, a quantidade e o padrão de expressão de determinado marcador estão correlacionados com a probabilidade de transformação maligna de uma célula (WOGAN, 1992).

Segundo o Conselho Norte-Americano de Pesquisa (1987), são três os tipos de marcadores disponíveis para os estudos em sistemas biológicos:

- marcadores de exposição, que fornecem informações sobre a quantidade de compostos normalmente ausentes em sistemas vivos (xenobióticos) aos quais os indivíduos estão expostos, principalmente pela sua presença na urina, plasma ou saliva;

- marcadores de efeito, que indicam a presença da doença ou de sinais pré-clínicos da mesma, representando momentos isolados do processo que podem ser qualitativa ou quantitativamente avaliados, como trocas entre cromátides irmãs, aberrações cromossômicas, estados hormonais alterados, antígenos tumorais, mutações em genes supressores de tumor e oncogenes;
- marcadores de susceptibilidade, que indicam indivíduos ou populações com diferenças biológicas capazes de influenciar a resposta do organismo a agentes ambientais, como absorção diferencial de micronutrientes e os polimorfismos dos genes de reparo e do biometabolismo.

O princípio básico dos marcadores de susceptibilidade consiste na diferença interindividual que confere graus de sensibilidade às doenças induzidas pelo ambiente. Esses marcadores podem incluir características genéticas, diferenças no metabolismo ou a capacidade diferencial de um órgão para se recuperar de agressões ambientais (BARTSCH e HIETANEN, 1996; TANINGHER et al., 1999).

Entre os mais significativos marcadores de susceptibilidade estão as diferenças genéticas na capacidade das células repararem lesões no DNA causadas por agentes ambientais (SPITZ e BONDY, 1993; KADERLIK e KADLUBAR, 1995). Um outro tipo importante de biomarcador baseia-se em enzimas que, se modificadas, podem aumentar ou diminuir a interação destas com as biomoléculas informacionais, aumentando o potencial carcinogênico de muitos compostos que normalmente não seriam prejudiciais (EUBANKS, 1994; GUENGERICH, 2000).

1.2.1 Genética da metabolização xenobiótica

O estudo de variações interindividuais na capacidade de metabolização de xenobióticos (substâncias químicas estranhas a um organismo ou sistema biológico) já permitiu identificar inúmeros polimorfismos genéticos, que afetam os níveis de expressão ou a atividade catalítica das enzimas envolvidas através de diferentes mecanismos moleculares (MACLEOD et al., 1997; MEYER e ZANGER, 1997). Muitos xenobióticos que desempenham papel importante na etiologia de doenças

podem ser ativados ou inativados por enzimas polimórficas e, dependendo do tipo de reação mediada por esta enzima, sua deficiência pode conferir vantagem ou desvantagem na susceptibilidade a uma certa patologia (DALY et al., 1993).

A maquinaria de metabolização xenobiótica possui dois tipos de enzimas: as de metabolismo mediado pelas oxidases de função mista – ou de Fase I – e as enzimas de conjugação – ou de Fase II. O processo de ativação corresponde à Fase I e o de detoxificação, à Fase II.

Muitos compostos, tais como as nitrosamidas, várias drogas medicamentosas e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) - estes encontrados também na fumaça do cigarro - são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas da Fase I, principalmente pelas enzimas da superfamília do citocromo P-450 (CYPs). Dessa forma, através da introdução de um ou mais grupamentos hidroxila ao substrato, um pró-carcinógeno pode tornar-se um carcinógeno. Como exemplo, o benzopireno é convertido em epóxido de benzopireno, um composto altamente reativo.

Em contraponto, as reações da Fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno (como glutationa, sulfato, glicose e acetato) através das glutationa-S-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem então como enzimas inativadoras dos produtos da Fase I, tornando tais metabólitos mais hidrofílicos e, portanto, passíveis de excreção (UMENO et al., 1988; IDLE, 1991; OMENN, 1991; PERSSON et al., 1993; BOIS et al., 1995; KROEMER e EICHELBAUM, 1995; RAUNIO et al., 1995).

Uma vez que a maioria dos agentes mutagênicos/carcinogênicos requer ativação metabólica antes de se ligar ao DNA, ao RNA e às proteínas (ROGERS, 1994), as variações nos processos de ativação e detoxificação de compostos químicos e drogas desempenham papel crucial na tumorigênese (BARTSCH e HIETANEN, 1996). Assim, distúrbios no equilíbrio destes processos podem explicar a variabilidade na resposta individual à exposição a tais compostos (DALY et al., 1993; HIRVONEN, 1995). A quantidade final efetiva de carcinógenos produzida depende da ação competitiva entre os mecanismos de ativação e detoxificação, envolvendo as enzimas que tomam parte nessas vias bioquímicas da célula (HAYES, 1995).

Desse modo, a variação interindividual na resposta aos agentes xenobióticos, aos quais os indivíduos podem ter sido expostos através da dieta, da terapia medicamentosa e/ou exposição ocupacional e os efeitos carcinogênicos potenciais advindos, são mediados pela predisposição herdada (VINEIS, 1995; WORMHOUDT et al., 1999). Alguns indivíduos ou subgrupos populacionais, como as diferentes etnias, podem apresentar risco significativamente maior de apresentar câncer quimicamente induzido do que a média populacional, devido às diferenças expressivas nos processos de ativação e detoxificação (IDLE, 1991; GILLILAND, 1997; CAPORASO, 1999).

Assim, o equilíbrio entre as enzimas que aumentam a toxicidade e as que inativam os produtos químicos pode conferir sensibilidade individual diferenciada (ALBERTINI, 1999; WORMHOUDT et al., 1999). Como consequência dessa variabilidade individual, os modelos de investigação de risco devem considerar a susceptibilidade genética, que torna os indivíduos mais resistentes ou mais sensíveis à exposição ambiental, sobretudo ao tabaco e ao álcool no caso do câncer de cavidade bucal, mas também à exposição a substratos endógenos, uma vez que tais enzimas também participam do metabolismo de hormônios esteróides e prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio, entre outros (VINEIS, 1995). Essas investigações devem considerar ainda que os produtos conjugados (detoxificados) e aqueles não metabolizados podem também ser responsáveis por toxicidade e mutagênese (NEBERT, 1991).

1.2.2 Polimorfismos de genes responsáveis pela metabolização de xenobióticos

Os polimorfismos metabólicos que têm sido associados de forma mais consistente com o aumento do risco de câncer incluem as enzimas da superfamília CYP, as GSTs e as NATs (GATTÁS, 2001). Além disso, a combinação de genótipos de alto risco para ativação e detoxificação de xenobióticos, como por exemplo, *CYP1A1* MspI / *GSTM1* nulo, está fortemente associada ao aumento de risco de desenvolver câncer, especialmente aqueles ligados ao cigarro (AUTRUP, 2000), já que o impacto de um único polimorfismo genético pode ser fraco, mas é amplificado

quando interações entre mais de um gene polimórfico são analisadas (KADLUBAR, 2001).

Segundo GEISLER e OLSHAN (2001), indivíduos deficientes em múltiplos passos enzimáticos possuem risco aumentado para o desenvolvimento de tumores, sendo sugerida uma maior susceptibilidade para aqueles indivíduos que possuem alterações na Fase I da metabolização, como aquelas conferidas por alterações no gene *CYP1A1*, concomitantes com deleção do gene *GSTM1*. Segundo estes autores, a identificação de grupos de pessoas que possuam uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço (tabagistas), como aqueles de cavidade bucal, baseada na capacidade de metabolizar os carcinógenos presentes no cigarro, é de grande importância. Devido à complexidade dos componentes do tabaco, e da presença de múltiplos passos em sua metabolização, a análise da susceptibilidade genética do indivíduo em ambas as fases da metabolização, I e II, deve ser considerada.

A correlação entre os polimorfismos nos genes *CYPs* e o risco para o desenvolvimento de câncer não está completamente estabelecida. Assim, novos estudos nesta área necessitam ser realizados (INGELMAN-SUNDBERG, 2001). Entretanto, estudos recentes mostraram que os genótipos nulos para os genes *GSTM1* e *GSTT1*, individualmente e em combinação, são um forte fator de risco para o desenvolvimento de leucoplasia bucal em indivíduos com hábito tabagista, o que, conseqüentemente, aumenta as chances de se desenvolver câncer bucal. Apesar destes dados necessitarem de confirmação, indivíduos de alto risco podem ser identificados e submetidos a tratamento quimioterápico preventivo antes mesmo de apresentarem os sintomas da malignidade (Hecht, 1999 apud BARTSCH, 2000).

Como a interação entre a constituição genética do indivíduo e os fatores ambientais é de grande importância na determinação do fenótipo, o fenômeno do polimorfismo genético poderia explicar o fato de apenas 15% dos fumantes desenvolverem câncer de pulmão. Sendo o metabolismo um processo bastante complexo, um grande número de enzimas deve estar envolvido, de modo que se torna

necessário elucidar o papel destes genes (como *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTP1*) no surgimento de determinadas doenças na população humana (AU et al., 2001).

Tanto a identificação de polimorfismos de genes cujos produtos estejam envolvidos na metabolização de xenobióticos, como a possível contribuição destes para o desenvolvimento de câncer de boca e de laringe, vêm sendo, portanto, avaliadas. A identificação precoce de alterações no material genético e de indivíduos mais propensos a acumular mutações no decorrer de suas vidas pode conduzir a novas perspectivas para a prevenção e o diagnóstico precoce de certos tumores (GATTÁS, 2001).

1.2.2.1 Superfamília citocromo P450 e polimorfismos do gene *CYP1A1*

A superfamília citocromo P450 representa uma das principais classes de biotransformação da Fase I, através de suas mais de 500 isoenzimas (LANG e PELKONEN, 1999). Estas enzimas encontram-se em animais, plantas, leveduras e bactérias e, somente em mamíferos, calcula-se que estejam presentes mais de 200 enzimas P450 funcionais (GONZALEZ e NEBERT, 1990). Estima-se que no genoma humano existam em torno de 60 a 100 genes codificadores de enzimas P450, sendo que cerca de 20 deles estão envolvidos na codificação de enzimas que metabolizam compostos exógenos (INGELMAN-SUNDBERG et al., 1999). Essa gama de enzimas participa tanto da biossíntese como da degradação de esteróides, vitaminas, ácidos graxos, prostaglandinas, aminas, ferormônios e metabólitos vegetais (WOLF, 1986). Metabolizam ainda, inúmeras drogas e carcinógenos / mutágenos químicos, entre outros poluentes ambientais denominados, em seu conjunto, como xenobióticos (GUENGERICH, 1988).

Estimados em cerca de 250.000 compostos no total, os xenobióticos são substratos potenciais para as enzimas P450, ou então indutores ou inibidores das mesmas (GUENGERICH, 1992). Essas reações ocorrem principalmente no fígado, contudo, existe expressão não-hepática em menor grau por todo o organismo, incluindo intestino, pulmão e rim (ROGERS, 1994). As CYPs podem não apenas

catalisar diferentes reações oxidativas, como também metabolizar uma grande quantidade de xenobióticos lipofílicos (LIN e LU, 1998).

Devido à importância de seu papel na ativação metabólica de inúmeros pró-carcinógenos, extensiva pesquisa tem sido concentrada na relação entre a distribuição de variantes polimórficas das diferentes enzimas de P450 e a susceptibilidade ao câncer, tendo sido avaliados principalmente os genes *CYP1A1*, *CYP2D6* e *CYP2E1* (INGELMAN-SUNDBERG et al., 1999).

De fato, diferenças individuais na expressão das isoformas de P450 causam variação marcante no nível de carcinógenos ativos na célula. Sabe-se ainda, que a expressão e atividade dessas enzimas são reguladas por mecanismos genéticos distintos. Uma vez que muitas dessas enzimas têm expressão induzida, tanto o agente indutor, como o mecanismo molecular de indução, podem variar, dificultando qualquer generalização. Muitas das substâncias que agem como indutoras são, em realidade, substratos para a enzima P450 que induzem, estimulando assim seu próprio metabolismo, bem como qualquer outro composto que seja substrato da mesma enzima. Além disso, muitos compostos que induzem as enzimas P450 podem induzir também uma ou mais enzimas da Fase II (ROGERS, 1994).

Os polimorfismos de P450 e a susceptibilidade ao câncer, podem estar associados ainda, pelo fato dessas isoenzimas participarem também da transformação de compostos endógenos relevantes durante os processos de diferenciação da célula transformada, até o estágio maligno (RANNUG et al., 1995).

O gene *CYP1A1* localiza-se no cromossomo 15, em 15q22-24 (HILDEBRAND et al., 1985). Codifica a enzima P450-1A1, uma isoenzima que catalisa a oxidação de PAHs em produtos fenólicos e epóxidos (GONZALEZ, 1989). A indução de *CYP1A1* ocorre via ligação do composto indutor ao receptor de aril-hidrocarbono (Ah), que ativa então a transcrição de vários genes que codificam proteínas envolvidas na metabolização de xenobióticos (KAWAJIRI et al., 1993). A bioativação de vários PAHs é iniciada com a estimulação do receptor de Ah e este, por sua vez, ativa a transcrição da *CYP1A1*, epóxido hidrolase e outras enzimas (HIRVONEN, 1995). Além dos PAHs, a *CYP1A1* é também induzida por xenobióticos encontrados em

plantas da família das crucíferas (repolho e brócolis), tais como flavonas e por derivados de indol (MCDONNEL et al., 1992). Foi demonstrada ainda, a ativação de CYP1A1 induzida pela luz ultravioleta na pele e no fígado de camundongos e ratos (RANNUG et al., 1995).

O padrão de atividade e capacidade indutora dessa enzima em humanos, relacionada à formação de metabólitos de PAHs capazes de reagir com a molécula de DNA é, portanto, de grande importância para a estimativa do risco de desenvolvimento de câncer. A enzima CYP1A1 é considerada primariamente uma enzima extra-hepática em humanos, sendo induzida no pulmão, linfócitos e na placenta após exposição aos PAHs, incluindo aqueles presentes na fumaça do cigarro (ANTTILLA et al., 1991).

Através do uso da enzima de restrição *MspI*, detectou-se um polimorfismo originado pela mutação T₆₂₃₅→C, resultando no alelo polimórfico denominado *CYP1A1*2A* (WALKER, 1996). As frequências destes polimorfismos mostram extensa variação étnica, tendo sido observados valores para o genótipo mutante de 31% entre japoneses e 12% em populações caucasóides, (NEBERT et al., 1996).

Uma segunda mutação de ponto (A₄₈₈₉→G) é responsável por outro polimorfismo no éxon 7 de *CYP1A1*, originando o alelo polimórfico *CYP1A1*2B*, que se encontra em desequilíbrio de ligação com o alelo *CYP1A1*2A* (HAYASHI et al., 1991). Tal mutação leva à substituição do aminoácido isoleucina (Ile) por uma valina (Val) no resíduo 462. Este polimorfismo resulta em dois genótipos homozigotos (Ile/Ile e Val/Val) e um heterozigoto (Ile/Val) e, no caso de os alelos serem mutantes, leva à diminuição da atividade catalítica da enzima (NAKACHI et al., 1991). Acredita-se que, em decorrência, possa haver a formação de adutos no DNA, levando ao acúmulo de danos com potencial carcinogênico (KIYOHARA et al., 1996). Entretanto, as conseqüências exatas deste polimorfismo ainda são discutidas. HAYASHI et al. (1991) afirmam que a substituição do aminoácido isoleucina por valina realmente afeta a atividade catalítica da enzima, uma vez que esta substituição ocorre na região heme da molécula que se liga ao substrato. Por outro lado, segundo PERSSON et al. (1997), a presença do polimorfismo Ile/Val não afeta a ligação da

enzima com o substrato, pois a troca de aminoácidos não muda a conformação da molécula.

Outros alelos polimórficos inicialmente descritos foram: *CYP1A1*3*, com o polimorfismo presente em uma região não codificadora do gene e que parece ocorrer exclusivamente em afro-americanos (CROFTS et al., 1993) e o alelo *CYP1A1*4*, também localizado no éxon 7 do gene (CASCORBI et al., 1996). Novas variantes vêm sendo descritas a cada ano (SMART e DALY, 2000; CHEVALIER et al., 2001; SAITO et al., 2003) e, recentemente, AMORIM et al. (2004) descreveram uma nova variante em um estudo envolvendo a população do Rio de Janeiro, atingindo um total de 16 alelos já descritos.

Os alelos *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2B* foram correlacionados a um aumento na susceptibilidade ao câncer de pulmão em populações japonesas (KAWAJIRI et al., 1990; HAYASHI et al., 1991; NAKACHI et al., 1995), porém tal associação não foi verificada em populações caucasóides ou afro-americanas (HIRVONEN et al., 1992; TEFREÉ et al., 1992; SHIELDS et al., 1993). Contudo, em um estudo posterior, foi demonstrada associação do polimorfismo *MspI* e câncer de pulmão em uma população norte-americana, concluindo que tal polimorfismo influencia na susceptibilidade à doença em caucasóides e japoneses da mesma forma (XU et al., 1996).

O tumor coloretal parece ter seu risco influenciado pelo polimorfismo *MspI* (SIVARAMAN et al., 1994), enquanto estudos envolvendo os cânceres do trato aerodigestivo superior e de mama sugerem ausência dessa associação (BAILEY et al., 1998; MATTHIAS et al., 1998).

A existência de diversas variantes já detectadas em *CYP1A1* ressalta a necessidade de verificação dos vários haplótipos decorrentes das várias combinações e do possível impacto de cada um deles como moduladores da susceptibilidade ao câncer (GARTE et al., 1996).

1.2.2.2 Enzimas GSTs e polimorfismos do gene *GSTP1*

Dentre as enzimas denominadas da Fase II envolvidas no processo de detoxificação, as glutathione-S transferases desempenham um papel predominante no

metabolismo celular, bem como na modificação de compostos eletrofilicos reativos, tanto pela conjugação com as glutathionas, como também por ligação não covalente com vários agentes xenobióticos, incluindo carcinógenos e drogas citotóxicas, como os PAHs presentes na dieta alimentar e na fumaça dos cigarros, impedindo a ligação destes ao DNA (VAN POPPEL et al., 1992; BROCKMÖLLER et al., 1993; STRANGE e FRYER, 1999). Tais compostos eletrofilicos reativos podem ser resultantes também, de processos endógenos, iniciados, por exemplo, na respiração e em processos inflamatórios, ou ainda, por radiação ionizante com a produção de espécies reativas de oxigênio, incluindo radicais superóxido e hidroxila (LANG e PELKONEN, 1999). Desse modo, é possível concluir que tais enzimas desempenham uma função protetora contra os radicais livres. Vários quimioterápicos são também substratos para as GSTs e, neste caso, a conjugação destes pode levar a uma diminuição do efeito e à ocorrência de resistência celular (WORMHOUDT et al., 1999).

Estima-se que existam, pelo menos, 20 GSTs na espécie humana, estando tais enzimas, assim como as CYPs, presentes na maioria dos organismos vivos (MANNERVIK et al., 1985; BUETLER e EATON, 1992). A família das GSTs é composta por proteínas diméricas solúveis e multifuncionais que podem conjugar-se com moléculas eletrofilicas, tornando-as menos tóxicas, já que catalisam o ataque nucleofílico pela glutathiona sobre as mesmas (PERSSON et al., 1995). Sua maior concentração é observada no fígado, mas também se encontra em menores concentrações nos pulmões, intestino delgado e outros órgãos. Entre as enzimas GSTs mais conhecidas estão as GSTM1, GSTT1 e GSTP1, todas polimórficas na população humana (BOARD et al., 1990; WIDERSTEN et al., 1991; ABDEL-RAHMAN et al., 1996).

Como estas enzimas catalisam a conjugação da glutathiona com xenobióticos, sua ausência poderia reduzir a capacidade de um organismo detoxificar metabólitos reativos. Nessa direção, diversos estudos têm detectado uma frequência elevada do genótipo *GSTM1* nulo (homozigotos para o alelo *GSTM1*0*, que tem atividade nula) em indivíduos portadores de diferentes neoplasmas (ALEXANDRIE et al., 1994;

HEAGERTY et al., 1994; ANWAR et al., 1996; JAHNKE et al., 1996), incluindo tumores de cabeça e pescoço (CHENG et al., 1999), altamente associados ao tabaco. Apesar disso, dados contraditórios também foram descritos, especialmente relacionados ao câncer de pulmão (BROCKMÖLLER et al., 1993).

O gene *GSTP1*, localizado em 11q13 (MOSCOW et al., 1988), codifica a isoenzima P1, que está envolvida no metabolismo de compostos halogenados, moléculas de baixo peso molecular e epóxidos reativos de alguns PAHs (DUSINKÁ et al., 2001), apresentando maior concentração nos pulmões, esôfago e placenta. BOARD et al. (1990) descreveram três diferentes alelos *GSTP1*, sendo estes denominados *GSTP1a* (ou *GSTP1*A*), que é o alelo selvagem, *GSTP1b* (*GSTP1*B*) e *GSTP1c* (*GSTP1*C*). A variante *GSTP1*B* apresenta uma transição A→G no nucleotídeo +313 do éxon 5, mudando o códon 105 de ATC (Ile) para GTC (Val). O *GSTP1*C* é caracterizado por duas transições de nucleotídeos, sendo a primeira, a mesma observada no *GSTP1*B*, e a segunda, uma transição C→T no nucleotídeo +341 do éxon 6, resultando na mudança de GCG (Ala) para GTG (Val) no códon 114.

O códon 105 compreende parte do sítio ativo da enzima GSTP1 para a ligação de eletrofilicos reativos, e a substituição Ile₁₀₅→Val₁₀₅ nas variantes *GSTP1*B* e *GSTP1*C* afeta a atividade catalítica substrato-específica e a estabilidade térmica da proteína codificada (JOHANSSON et al., 1998; PANDYA et al., 2000). Variações estruturais adicionais causadas pela mudança do aminoácido alanina para valina no códon 114 na *GSTP1*C* são de menor magnitude do que aquelas causadas por mudanças no códon 105, não possuindo tanto impacto na atividade catalítica.

O alelo *GSTP1*B* foi associado com o aumento da incidência de cânceres de bexiga, testículo e próstata (HARRIES et al., 1997), laringe e faringe (MATTHIAS et al., 1998) e pulmão (RYBERG et al., 1997; STUCKER et al., 2002), devido à atividade reduzida da variante *GSTP1*B*. Desse modo, a variante *GSTP1*B*, por apresentar menor capacidade de detoxificação dos metabólitos ativos, pode ser um fator de risco e um indicador de susceptibilidade para cânceres nos quais os PAHs estejam envolvidos na etiologia, como ocorre no caso dos cânceres de boca, cuja incidência aumenta de modo muito importante entre os indivíduos expostos ao tabaco.

Sem dúvida, tais polimorfismos modulam o risco de desenvolvimento de algumas neoplasias, porém, somente estudos subseqüentes poderão fornecer melhores informações sobre as contradições ora observadas, estabelecendo assim a participação dos mesmos na carcinogênese humana.

2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os tumores de cabeça e pescoço, incluindo os de cavidade bucal, têm uma alta incidência no Brasil e a taxa de sobrevivência de cinco anos permanece uma das menores entre os principais tipos de câncer.

Como o equilíbrio entre as enzimas que induzem a formação de metabólitos reativos e as que inativam os produtos químicos resultantes do tabaco e álcool – além de outros carcinógenos – pode ter influência no desenvolvimento do câncer de cavidade bucal, deve-se considerar a susceptibilidade genética na elaboração de modelos que estabeleçam perfis de risco populacional ou individual à exposição ambiental. Por isso, torna-se fundamental a realização de estudos genéticos para um melhor conhecimento do perfil biológico de pacientes com a doença.

A maior parte dos estudos moleculares é realizada em tumores de diferentes localizações anatômicas, o que dificulta o estabelecimento de correlações entre os achados genéticos e os parâmetros histopatológicos. Assim, analisamos marcadores de susceptibilidade em tumores bucais malignos com o objetivo de contribuir para estabelecer subsídios para auxiliar na detecção precoce, diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer bucal.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar as frequências gênica e genotípica dos genes *CYP1A1*, polimorfismo Ile/Val e *GSTP1*, polimorfismo *BsmI*;
- Estudo de associação do tipo caso-controle, objetivando identificar marcadores genéticos correlacionados com as neoplasias da cavidade bucal.
- Comparar as frequências gênicas observadas com outras descritas na literatura, visando contribuir para um melhor conhecimento da estrutura populacional.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização da amostra

O presente estudo foi realizado com amostras de sangue periférico de 72 indivíduos portadores de câncer da cavidade bucal e 60 indivíduos não aparentados (grupo controle) pareados quanto ao sexo, grupo etário (idade do paciente \pm 5 anos), grupo racial e hábito tabagista.

Entre os indivíduos do grupo controle, 26 foram selecionados dentre os doadores voluntários de medula óssea do Laboratório de Imunogenética Humana da Universidade Federal do Paraná. Os demais foram selecionados dentre diversos voluntários para o estudo em questão. Entre as amostras de pacientes acometidos pelo CCE bucal, 59 foram obtidas do Hospital Erasto Gaertner de Curitiba e 13 do Instituto do Câncer de Londrina.

Foi realizado um contato pessoal com cada doador, que recebeu as informações sobre os objetivos da pesquisa e o formulário para a assinatura do Consentimento Informado (Anexo I), para posterior coleta do material.

Para cada indivíduo foi solicitada a colaboração para responder a um Questionário Padrão (Anexo II) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina e pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner, referente ao seu estilo de vida, nível sócio-econômico, local de nascimento, origem étnica dos pais, idade, ocupação e história familiar de câncer, entre outros quesitos, baseado no questionário proposto por CARRANO e NATARAJAN (1988).

A suspeita clínica da doença foi avaliada através de amostra do tecido tumoral por um patologista.

No grupo de pacientes, 61 indivíduos eram do sexo masculino (85%) e 11 do feminino (15%), com idade média de $57,26 \pm 11,43$. No grupo controle, 49 indivíduos eram do sexo masculino (82%) e 11 do feminino (18%), com idade média de $53,68 \pm 12,07$. Em relação ao grupo racial, houve predomínio de caucasóides, com 63

pacientes e 53 controles. Os negros foram seis no grupo de pacientes e cinco no controle; os mulatos respectivamente dois e um; e apenas um asiático em ambos os grupos. Em relação ao hábito tabagista, 89,4% dos pacientes e controles eram tabagistas.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão da amostra

Todos os indivíduos foram previamente selecionados sob a condição de não terem sido submetidos à radioterapia ou quimioterapia e de concordarem em participar livremente da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento e respondendo ao Questionário Padrão. Foram excluídos os indivíduos cujo DNA não apresentou boa qualidade para a realização das análises moleculares. No caso dos pacientes, também foram excluídos aqueles cujo laudo histopatológico da amostra tumoral não confirmou a presença de malignidade. Foram excluídos do estudo indivíduos-controle que apresentem ou já apresentaram qualquer tipo de neoplasia.

3.3 Coletas do sangue e do tecido tumoral e armazenamento das amostras

As coletas de sangue foram realizadas através de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis. De cada indivíduo coletou-se cerca de 10 ml de sangue periférico, os quais foram imediatamente colocados em tubos estéreis contendo 1,75 ml de solução anti-coagulante ACD (0,016 M de ácido cítrico; 0,068 M de citrato de sódio; 0,081 M de glicose, previamente autoclavados), rotulados e enviados para o laboratório e mantidos a 4°C até o processamento.

As amostras de tecido tumoral foram avaliadas por um patologista para confirmar a presença de malignidade e então colocadas em frascos estéreis e estocadas em condições ideais de temperatura e conservação (-80°C). A classificação histopatológica foi realizada de acordo com a “WHO International Classification of Tumors”. O estadiamento clínico foi determinado pelo estadiamento TNM do câncer.

Após as extrações dos DNAs as amostras foram estocadas e conservadas a -80°C para realização das técnicas propostas.

3.4 Extrações do DNA de sangue periférico

O método para o isolamento de DNA foi escolhido com a finalidade de originar DNA de alto peso molecular e consiste, basicamente, no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol. O método utilizado no presente trabalho foi o de *salting out*, descrito por MILLER et al. (1988).

3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR é um método que envolve a síntese enzimática *in vitro* de várias cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Esta reação se baseia no pareamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (moléculas de DNA fita simples), usando como iniciadores oligonucleotídeos que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes oligonucleotídeos iniciadores, também chamados de “primers”, são sintetizados artificialmente, de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo. Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A desnaturação consiste na separação das duplas fitas de DNA, através de uma elevação da temperatura para cerca de 92° a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida, dependendo do tamanho e da seqüência do iniciador utilizado, e que permite a hibridização DNA-DNA de cada iniciador com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão, envolvendo a adição de nucleotídeos e utilizando como molde a seqüência-alvo. Deste modo, várias cópias desta seqüência alvo são realizadas em cada um dos diversos ciclos da reação, em uma escala geométrica (MULLIS et al., 1992).

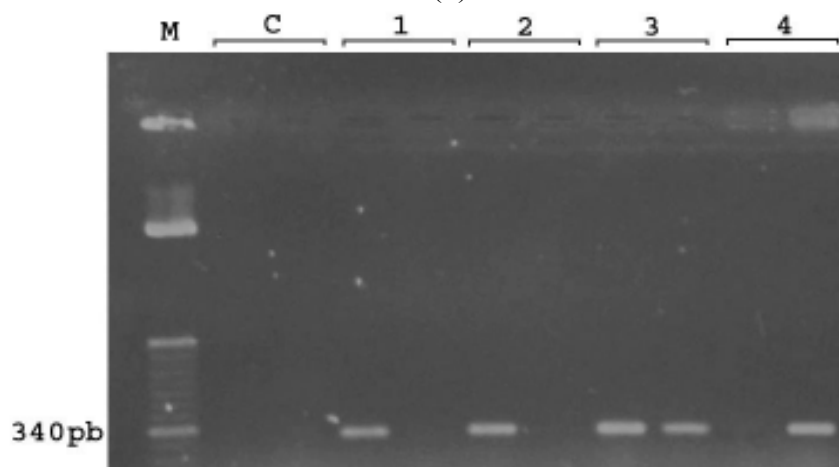
Neste trabalho, a técnica de PCR foi utilizada para a detecção de um polimorfismo específico para cada um dos genes do biometabolismo aqui estudados, *CYP1A1* e *GSTP1*.

3.5.1 Análise do polimorfismo Ile/Val do gene *CYP1A1*

O polimorfismo Ile/Val é encontrado no éxon 7 do gene *CYP1A1*, quando ocorre uma mudança de base A→G, na posição 4889 da molécula de DNA, resultando na substituição do aminoácido isoleucina por valina.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação, denominados A e G, são diferenciados apenas por uma base, adenina ou guanina. Os fragmentos são amplificados utilizando-se estes iniciadores juntamente com o iniciador reverso W (selvagem), em duas reações distintas: pareando-se o iniciador selvagem com A ou com G. Os fragmentos amplificados possuem peso molecular de 340 pb (ALEXANDRIE et al., 1994). A Figura 1 mostra os diferentes fenótipos obtidos.

FIGURA 1 – PADRÃO DE BANDAS DO POLIMORFISMO ILE/VAL DO GENE *CYP1A1*, REPRESENTANDO OS GENÓTIPOS HOMOZIGOTOS SELVAGENS ILE/ILE (1 E 2), HETEROZIGOTO ILE/VAL (3) E HOMOZIGOTO MUTANTE VAL/VAL (4)



M – marcador molecular de 50 pares de bases. C – controle negativo.

A reação de PCR para a detecção deste polimorfismo é baseada no protocolo de DRAKOULIS et al. (1994), modificado, que consiste num volume final de 50 µl contendo tampão 10x (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4); MgCl₂ 1,5 mM; 2 mM de cada dNTP; 100 ng/µl do iniciador W e do iniciador A (para a reação A) ou G (para a reação G); 1,25 U de AmpliTaq DNA polimerase e 100 ng/µl de DNA genômico.

O ciclo de amplificação consistiu de 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto e 70 °C por 2,5 minutos, seguidos de 5 minutos a 72 °C;

As seqüências dos iniciadores utilizados foram:

W: 5'-GAA AGG CTG GGT CCA CCC TCT-3'

A: 5'-AAG ACC TCC CAG CGG GCA AT-3'

G: 5'-AAG ACC TCC CAG CGG GCA AC-3'

Após a reação de amplificação, os produtos de PCR obtidos foram visualizados em gel de agarose (2%) e corados com solução de brometo de etídeo. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 50 pb para a comparação dos produtos.

3.5.2 Análise do polimorfismo *Bsm*I do gene *GSTP1* por PCR-RFLP

A reação de amplificação por PCR e o polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) *Bsm*I no gene *GSTP1* foram obtidos de acordo com HARRIES et al. (1997). Para um volume total de 25 µl por reação, são utilizados tampão 10x (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4); MgCl₂ 1,5 mM; dNTPs 2 mM; 100 ng/µl de cada iniciador *P105F* e *P105R*; 1,25 U de *Ampli*Taq DNA polimerase e 100 ng/µl de DNA genômico.

O ciclo de amplificação foi: 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 57°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 94°C por 30 segundos, seguidos de 5 minutos a 72°C.

As seqüências dos iniciadores utilizados foi:

P105F: 5'-ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA-3'

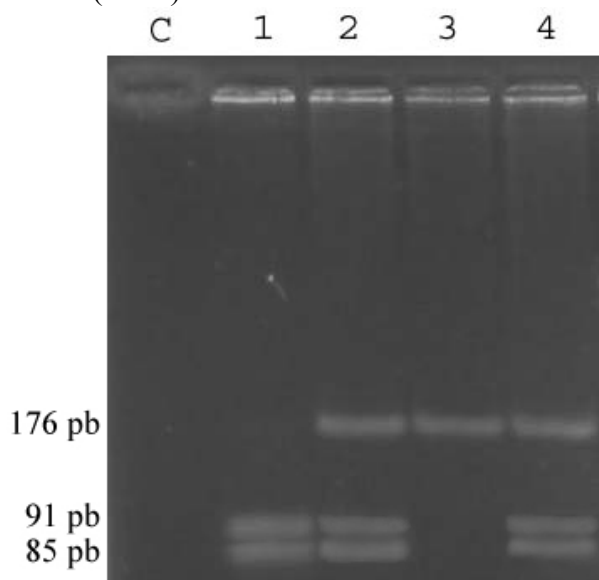
P105R: 5'-TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT-3'

Após a reação de amplificação, 20 µl do produto da PCR foram digeridos com 5U da enzima *Bsm*I, a 55°C por 2 horas, seguindo-se então, com a análise em gel de agarose 3,5% submetido à eletroforese a 40V.

O par de iniciadores *P105F* e *P105R* pode gerar três produtos de amplificação distintos como resultado (Figura 2):

- um produto constante de 176 pb, referente ao genótipo homocigoto para o alelo selvagem (Ile/Ile), o qual não sofre ação da enzima *Bsm*I, originando uma banda não-clivada;
- um produto com uma banda de 91 pb e outra de 85 pb no caso de o genótipo ser homocigoto para o alelo mutante (Val/Val), que possui um sítio para a enzima de restrição *Bsm*I, que cliva o produto inicial;
- um produto com três bandas - uma de 176 pb, uma de 91 pb e uma de 85 pb – caso o genótipo seja heterocigoto (Ile/Val).

FIGURA 2 – PADRÃO DE BANDAS DO POLIMORFISMO *BSM*I DO GENE *GSTP1*, REPRESENTANDO OS GENÓTIPOS HOMOCIGOTO SELVAGEM (3), HETEROZIGOTOS (2 E 4) E HOMOCIGOTO MUTANTE (1)



C – controle negativo.

3.6 Análise estatística

As frequências fenotípicas observadas foram comparadas com as esperadas, de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg, conforme BEIGUELMAN, 1988.

Para analisar a associação entre as variantes polimórficas estudadas e o câncer de cavidade bucal foram comparadas as frequências alélicas do gene *CYP1A1* e do gene *GSTP1*, de indivíduos portadores de neoplasia bucal com indivíduos controles, através da análise das tabelas de contingência 2X2, para se obter o valor de P. Este valor foi

determinado pelo teste exato de Fisher com o auxílio do programa RXC (MILLER, 1997). O valor de $P=0,05$ foi adotado como limite de significância.

O teste do qui-quadrado foi aplicado com o objetivo de verificar se os genótipos observados se distribuíam igualmente em pacientes e controles e em diferentes amostras da literatura, incluindo os dados obtidos neste trabalho.

4 RESULTADOS

4.1 Descrição de variáveis sócio-demográficas e respectivos genótipos

As variáveis sócio-demográficas dos pacientes e indivíduos-controle, com os respectivos resultados das genotipagens, estão descritas nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1 – VARIÁVEIS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES E RESPECTIVOS GENÓTIPOS

Código	Sexo	GR	Idade	Tabagista	CYP1A1	GSTP1	Localização do Tumor
CO 004	F	N	58	Não	Ile/Ile	+/+	Gengiva
CO 007	M	C	62	Sim	Ile/Ile	+/-	Lábio inferior
CO 011	F	C	80	Não	Ile/Ile	+/-	Mucosa
CO 018	M	C	56	Sim	Ile/Ile	+/+	Língua
CO 022	M	C	70	Sim	Ile/Ile	+/-	Trígono molar direito
CO 023	F	A	73	Não	Ile/Ile	+/+	Mucosa
CO 024	M	C	68	Sim	Ile/Ile	+/-	Língua
CO 028	M	C	57	Não	Ile/Ile	+/-	Palato mole
CO 029	M	N	66	Sim	Ile/Val	+/+	Língua
CO 032	M	C	55	Sim	Ile/Val	+/-	Língua
CO 036	F	N	49	Não	Ile/Ile	+/-	Mucosa
CO 038	M	C	58	Sim	Ile/Ile	+/-	Língua
CO 041	M	N	52	Sim	Ile/Ile	+/-	Mucosa
CB 001	M	C	66	Sim	Ile/Val	+/-	Língua
CB 003	M	C	47	Sim	Ile/Ile	-/-	Língua
CB 004	M	C	48	Sim	Ile/Ile	-/-	Pilar amigdaliano
CB 005	M	C	46	Sim	Ile/Ile	+/-	Trígono molar direito
CB 006	M	C	52	Sim	Ile/Ile	+/+	Orofaringe
CB 007	M	M	83	Sim	Ile/Ile	+/-	Língua / Assoalho
CB 008	M	N	61	Sim	Ile/Ile	+/-	Língua / Assoalho
CB 010	M	C	50	Sim	Ile/Val	+/-	Língua / Assoalho
CB 011	M	C	66	Sim	Ile/Val	-/-	Língua
CB 012	M	C	38	Sim	Ile/Val	+/-	Assoalho
CB 013	M	C	60	Sim	Ile/Ile	-/-	Orofaringe
CB 014	M	C	62	Sim	Ile/Ile	+/+	Língua
CB 015	M	C	49	Sim	Ile/Ile	+/+	Língua / Assoalho
CB 016	M	C	73	Sim	Ile/Ile	+/+	Língua / Assoalho
CB 017	F	C	67	Sim	Ile/Ile	-/-	Língua / Assoalho
CB 019	M	C	41	Sim	Ile/Val	-/-	Assoalho
CB 021	M	C	66	Sim	Ile/Val	+/+	Assoalho
CB 022	M	C	73	Sim	Ile/Ile	-/-	Assoalho
CB 023	M	C	57	Sim	Ile/Ile	+/-	Língua

CB 024	M	C	42	Sim	Ile/Ile	+/-	Mucosa
CB 025	M	N	42	Sim	Ile/Ile	+/+	Língua
CB 026	M	M	73	Sim	Ile/Val	+/+	Palato duro
CB 027	M	C	63	Sim	Ile/Ile	+/-	Orofaringe
CB 028	M	C	50	Sim	Ile/Ile	+/+	Trígono retromolar
CB 029	M	C	70	Sim	Ile/Val	+/-	Pilar palatoglosso
CB 030	M	C	39	Sim	Ile/Ile	+/+	Palato mole
CB 031	M	C	53	Sim	Ile/Ile	+/-	Assoalho
CB 032	M	C	65	Sim	Ile/Ile	+/-	Palato
CB 033	M	C	75	Sim	Val/Val	+/+	Assoalho
CB 034	M	C	52	Sim	Ile/Ile	+/+	Língua / Assoalho
CB 035	M	C	67	Sim	Ile/Ile	+/+	Assoalho
CB 036	M	C	45	Sim	Ile/Ile	+/+	Língua
CB 037	M	C	40	Sim	Ile/Ile	+/-	Língua / Assoalho
CB 038	F	C	60	Sim	Ile/Ile	+/+	Palato duro
CB 039	M	C	53	Sim	Ile/Val	+/+	Pilar amigdaliano
CB 040	M	C	55	Sim	Ile/Ile	+/-	Palato mole
CB 041	M	C	66	Sim	Ile/Val	+/+	Assoalho
CB 043	M	C	63	Sim	Ile/Ile	+/-	Assoalho
CB 045	M	C	51	Sim	Ile/Ile	+/+	Assoalho
CB 047	F	C	42	Sim	Ile/Ile	+/+	Língua
CB 049	M	C	63	Sim	Ile/Ile	+/-	Língua
CB 051	F	C	47	Sim	Ile/Ile	+/-	Gengiva superior
CB 052	M	C	47	Sim	Ile/Ile	+/-	Palato mole
CB 053	M	C	40	Sim	Ile/Ile	+/+	Orofaringe
CB 054	M	C	49	Sim	Ile/Val	+/-	Língua
CB 055	M	C	47	Sim	Ile/Ile	+/+	Mucosa / Assoalho
CB 056	M	C	58	Sim	Ile/Val	+/+	Assoalho
CB 057	F	C	37	Sim	Ile/Val	+/-	Rebordo alveolar
CB 058	M	C	73	Sim	Ile/Ile	+/-	Pilar amigdaliano
CB 059	M	C	61	Sim	Ile/Val	+/-	Assoalho
CB 060	M	C	65	Sim	Ile/Ile	+/+	Orofaringe
CB 061	M	C	65	Sim	Ile/Ile	+/-	Assoalho
CB 062	M	C	52	Sim	Ile/Val	+/+	Assoalho
CB 063	F	C	52	Não	Ile/Ile	+/+	Língua / Assoalho
CB 064	M	C	50	Sim	Ile/Ile	+/-	Língua
CB 065	M	C	78	Sim	Ile/Ile	+/+	Língua / T. molar / P.A.
CB 066	F	C	40	Não	Ile/Val	+/+	Palato duro
CB 067	M	C	75	Sim	Ile/Ile	-/-	Língua / Assoalho
CB 068	M	C	49	Sim	Val/Val	+/-	Trígono molar direito

M=masculino; F=feminino; GR=grupo racial; C=caucasóide; N=negro; M= mulato; A=asiático

TABELA 2 – VARIÁVEIS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS DOS INDIVÍDUOS-CONTROLE E RESPECTIVOS GENÓTIPOS

Código	Sexo	GR	Idade	Tabagista	CYP1A1	GSTP1
CTL004	F	N	63	Não	Ile/Ile	+/+
CTL007	M	C	58	Sim	Ile/Ile	+/+
CTL011	F	C	77	Não	Ile/Ile	+/+
CTL018	M	C	55	Sim	Ile/Val	+/-
CTL022	M	C	71	Sim	Ile/Ile	+/-
CTL023	F	A	68	Não	Ile/Ile	+/+
CTL024	M	C	68	Sim	Ile/Ile	+/+
CTL028	M	C	56	Não	Ile/Ile	+/-
CTL029	M	N	68	Sim	Ile/Val	+/-
CTL032	M	C	52	Sim	Ile/Val	+/+
CTL036	F	N	53	Não	Ile/Ile	+/-
CTL038	M	C	53	Sim	Ile/Ile	+/+
CTL041	M	N	52	Sim	Ile/Ile	+/+
CT001	M	C	64	Sim	Ile/Val	+/+
CT003	M	C	42	Sim	Ile/Val	+/-
CT004	M	C	44	Sim	Ile/Ile	+/+
CT005	M	C	41	Sim	Ile/Ile	+/-
CT006	M	C	47	Sim	Ile/Ile	+/-
CT007	M	M	80	Sim	Ile/Ile	+/-
CT010	M	C	45	Sim	Ile/Ile	+/+
CT011	M	C	70	Sim	Ile/Ile	+/-
CT012	M	C	38	Sim	Ile/Val	-/-
CT013	M	C	57	Sim	Ile/Val	+/-
CT014	M	C	61	Sim	Ile/Ile	+/+
CT015	M	C	46	Sim	Ile/Ile	+/-
CT016	M	C	78	Sim	Ile/Ile	+/+
CT017	F	C	72	Sim	Ile/Ile	+/+
CT019	M	C	37	Sim	Ile/Ile	+/+
CT022	M	C	70	Sim	Ile/Ile	+/-
CT023	M	C	53	Sim	Ile/Val	+/-
CT024	M	C	37	Sim	Ile/Val	-/-
CT025	M	N	42	Sim	Ile/Val	-/-
CT027	M	C	59	Sim	Ile/Ile	+/-
CT028	M	C	51	Sim	Ile/Ile	+/+
CT029	M	C	65	Sim	Ile/Ile	+/-
CT030	M	C	38	Sim	Ile/Ile	+/-
CT031	M	C	49	Sim	Ile/Val	+/-
CT032	M	C	60	Sim	Ile/Ile	+/+
CT035	M	C	63	Sim	Ile/Val	-/-
CT036	M	C	42	Sim	Ile/Val	+/+
CT037	M	C	35	Sim	Ile/Ile	+/+

CT038	F	C	62	Sim	Ile/Ile	-/-
CT039	M	C	49	Sim	Ile/Ile	+/+
CT040	M	C	52	Sim	Ile/Ile	+/+
CT045	M	C	45	Sim	Ile/Ile	+/+
CT047	F	C	40	Sim	Ile/Ile	+/-
CT051	F	C	44	Sim	Ile/Val	+/-
CT052	M	C	42	Sim	Ile/Ile	+/+
CT053	M	C	37	Sim	Ile/Ile	+/+
CT054	M	C	44	Sim	Ile/Ile	+/+
CT055	M	C	40	Sim	Ile/Ile	+/+
CT056	M	C	53	Sim	Ile/Ile	+/-
CT057	F	C	57	Sim	Ile/Ile	+/+
CT059	M	C	56	Sim	Ile/Ile	+/-
CT062	M	C	45	Sim	Ile/Ile	+/+
CT063	F	C	58	Não	Ile/Ile	+/+
CT064	M	C	45	Sim	Ile/Ile	+/-
CT065	M	C	80	Sim	Ile/Val	+/-
CT066	F	C	46	Não	Ile/Ile	+/+
CT068	M	C	46	Sim	Ile/Val	+/-

M=masculino; F=feminino; GR=grupo racial; C=caucasóide; N=negro; M= mulato; A=asiático

As frequências de indivíduos masculinos (61 pacientes e 49 controles) e femininos (11 em ambas as amostras) apresentaram-se homoganeamente distribuídas na amostra de pacientes e de controles ($\chi^2_1=0,22$; $P>0,50$).

4.2 Análise da distribuição dos genótipos por sexo e idade

As diferenças das frequências de homens e mulheres de cada genótipo dos genes *CYP1A1* e *GSTP1*, tanto nos pacientes como nos controles, não foram estatisticamente significativas. Dos 72 pacientes analisados para o gene *CYP1A1*, 43 homens apresentaram o genótipo Ile/Ile, 16 eram Ile/Val e dois Val/Val e entre as mulheres, nove eram Ile/Ile, duas Ile/Val e nenhuma Val/Val ($\chi^2_2=0,78$; $P>0,50$). Para o gene *GSTP1*, 24 homens eram +/+, 30 +/- e sete -/- e entre as mulheres, seis eram +/+, quatro +/- e uma -/- ($\chi^2_2=0,90$; $P>0,50$). Nos 60 controles analisados para o gene *CYP1A1*, 34 homens apresentaram o genótipo Ile/Ile e 15 eram Ile/Val e entre as mulheres, 10 eram Ile/Ile e uma Ile/Val ($\chi^2_1=2,11$; $P>0,10$). Não se detectou o

genótipo Val/Val em nenhum dos sexos. Para o gene *GSTP1*, 23 homens eram +/+, 22 +/- e quatro -/- e entre as mulheres, sete eram +/+, três +/- e uma -/- ($\chi^2_2=1,07$; $P>0,50$).

4.3 Análise do Equilíbrio de Hardy e Weinberg

Nos pacientes, a frequência alélica foi de 0,15 e 0,35 para as variantes mutantes *CYP1A1**2B e *GSTP1**B, respectivamente. Nos controles, as respectivas frequências foram iguais a 0,13 e 0,29 e, no total, foram de 0,14 e 0,32, respectivamente. Os dados referentes aos pacientes e controles são apresentados na Tabela 3. De acordo com os dados da Tabela 4, as frequências genotípicas observadas em *CYP1A1* e *GSTP1* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto na amostra de pacientes como na de controles. Em nenhuma das comparações realizadas houve diferenças estatisticamente significativas, o que permite considerar que as amostras estudadas foram obtidas de populações em equilíbrio genético.

TABELA 3 - NÚMERO DE INDIVÍDUOS HOMOZIGOTOS SELVAGENS (HS), HETEROZIGOTOS (H) E HOMOZIGOTOS MUTANTES (HM) PARA OS POLIMORFISMOS ANALISADOS NOS GENES *CYP1A1* E *GSTP1*, EM PACIENTES E CONTROLES

	<i>CYP1A1</i>		<i>GSTP1</i>	
	Pacientes	Controles	Pacientes	Controles
HS	52	44	30	30
H	18	16	34	25
HM	2	0	8	5

TABELA 4 - VALORES DE χ^2_1 E P PARA VERIFICAÇÃO DO EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG

	<i>CYP1A1</i>	<i>GSTP1</i>
<i>Pacientes</i>	0,78; $P>0,30$	0,14; $P>0,70$
<i>Controles</i>	1,49; $P>0,20$	0,01; $P>0,90$
<i>Total</i>	0,32; $P>0,50$	0,08; $P>0,70$

4.4 Análise haplotípica

O teste de homogeneidade foi utilizado para verificar a significância das diferenças das freqüências absolutas de pacientes e controles para os haplótipos *CYP1A1* / *GSTP1* (Tabela 5). O valor do teste de $\chi^2_8=10,25$; $P>20$, não apresentou diferença estatisticamente significativa, demonstrando que as freqüências absolutas dos diferentes haplótipos distribuem-se igualmente nos pacientes e controles.

TABELA 5 - FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS DOS DIFERENTES HAPLÓTIPOS *CYP1A1* / *GSTP1* NOS PACIENTES E CONTROLES E VALORES DE χ^2_1 E χ^2_8

Genótipos (<i>CYP1A1</i> <i>GSTP1</i>)	Pacientes	Controles	Total	χ^2
+/+ +/+	21	27	48	2,25
+/- +/+	8	3	11	1,47
-/- +/+	1	0	1	0,82
+/+ +/-	25	16	41	0,68
+/- +/-	8	9	17	0,38
-/- +/-	1	0	1	0,82
+/+ -/-	6	1	7	2,75
+/- -/-	2	4	6	1,08
-/- -/-	0	0	0	0
TOTAL	72	60	132	10,25

4.5 Estudo de associação

O estudo de associação não demonstrou correlação entre os genótipos estudados e a presença de câncer bucal. A análise da tabela de contingência 2x2 pelo programa RxC apresentou os seguintes resultados: $P=1$ para o gene *CYP1A1* e $P=0,380720 \pm 0,005483$ para o gene *GSTP1*. Foram calculadas as razões de probabilidade $OR=1,06$ (IC 95% = 0,49 – 2,29) para o polimorfismo de *CYP1A1* e $OR=1,40$ (IC 95% = 0,70 – 2,79) para o polimorfismo de *GSTP1*.

4.6 Comparação com dados da literatura

Neste trabalho, não sendo verificada significância estatística na análise de associação alélica entre o grupo de pacientes e o grupo controle, foi observada uma frequência genotípica total de aproximadamente 0,72 para o genótipo homozigoto selvagem de *CYP1A1* (Tabela 6). A frequência de homozigotos selvagens de *GSTP1* foi de aproximadamente 0,45 e encontra-se de acordo com a frequência encontrada em outros estudos (Tabela 7). Estes dados são referentes à população caucasóide selecionada dentro dos grupos estudados, tendo em vista que nosso grupo de pacientes conta com apenas um indivíduo asiático, dois mulatos e seis negros e o grupo controle conta com um asiático, um mulato e cinco negros; uma amostra reduzida para que informações conclusivas sobre estes grupos raciais sejam obtidas.

TABELA 6 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *CYP1A1*, POLIMORFISMO ILE/VAL, EM POPULAÇÕES CAUCASÓIDES, SEGUNDO DIFERENTES DADOS DA LITERATURA

<i>CYP1A1</i>	A		B		C		D		E		F	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Ile/Ile	154	93	4319	90	434	92	378	90	172	84	84	72
Ile/Val	11	7	444	9	37	8	37	9	32	15,5	30	26
Val/Val	0	0	27	1	0	0	2	1	1	0,5	2	2

A – Adaptado de OLSHAN et al., 2000. B – Adaptado de GARTE et al., 2001. C - Adaptado de TERRY et al., 2003. D – Adaptado de LI et al., 2004. E – Adaptado de AMORIM et al., 2004. F - Presente estudo.

TABELA 7 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *GSTP1* EM POPULAÇÕES CAUCASÓIDES, SEGUNDO DIFERENTES DADOS DA LITERATURA

<i>GSTP1</i>	A		B		C	
	N	%	N	%	N	%
+/+	68	40	498	44	52	45
+/-	80	48	561	49	52	45
-/-	12	12	78	7	12	10

A – Adaptado de OLSHAN et al., 2000. B – Adaptado de GARTE et al., 2001. C – Presente estudo.

5 DISCUSSÃO

Avanços na genética e biologia molecular têm revolucionado nossa compreensão sobre o início e progressão do câncer. O termo câncer compreende um grupo heterogêneo de doenças, cada uma determinada por uma seqüência complexa de alterações genéticas que levam a uma proliferação celular descontrolada e à possibilidade de disseminação metastática. O conhecimento destas alterações genéticas tem estimulado o desenvolvimento de inovadoras terapias moleculares, porém, a aplicação das mesmas no campo clínico tem sido rara. Assim, a cura de tipos específicos ou de todos os tipos de câncer deve ser considerada como um objetivo a ser alcançado em longo prazo. A identificação de alterações genéticas que levam à progressão do câncer tem fornecido uma variedade de marcadores moleculares e testes que podem redefinir os critérios para o diagnóstico desta doença e prover novos parâmetros para a detecção precoce, de fundamental importância por possibilitar um melhor procedimento terapêutico mesmo antes das novas terapias moleculares serem implantadas, contribuindo para a diminuição da morbidade e mortalidade (SIDRANSKY, 1997).

Dentre as neoplasias conhecidas, aquelas das células epiteliais contribuem com a grande maioria das mortes por câncer em todo o mundo. O carcinoma de células escamosas (CCE) de cabeça e pescoço é uma doença heterogênea, com padrões distintos de apresentação e comportamento, onde mais especificamente o CCE bucal, juntamente com o câncer de orofaringe, constitui o tipo mais freqüente (NEVILLE, 2002). A associação do CCE de cabeça e pescoço com o tabaco e o álcool tem sido reconhecida há muitos anos e dados moleculares fornecem evidências de que os carcinógenos encontrados nestas substâncias têm um papel causal importante na transformação para a malignidade. Os cânceres do assoalho bucal, laringe e hipofaringe raramente se desenvolvem em indivíduos não-fumantes, onde a borda lateral da língua é um sitio mais comum de neoplasia. Os não fumantes, em geral, apresentam neoplasmas da cabeça e do pescoço precocemente ou tardiamente se comparados com o grupo dos fumantes (KOCH, 1999). Pacientes com neoplasias

primárias, que consomem o álcool e o tabaco intensamente, podem apresentar múltiplas lesões pré-cancerosas e cancerosas, processo conhecido como “cancerização de campo” (SLAUGHTER, 1953), no trato aerodigestivo superior. Em geral, um segundo câncer se desenvolve em indivíduos fumantes e não fumantes com frequência semelhante, mas um segundo CCE primário de cabeça e pescoço é muito mais comum em indivíduos tabagistas e etilistas pesados (KOCH, 1999).

Embora os carcinógenos encontrados no tabaco e no álcool possam promover uma variedade de alterações genéticas distintas, importantes para o desenvolvimento do CCE da cabeça e do pescoço (BRENNAN, 1995), existem evidências da participação dos genes do biometabolismo no processo de transformação de lesões bucais benignas para carcinomas de cavidade bucal (LICHTENSTEIN et al., 2000). Além dos carcinógenos descritos acima, muitos outros xenobióticos que desempenham papel importante na etiologia do câncer e de outras doenças podem ser ativados ou inativados por enzimas polimórficas. A deficiência destas enzimas ou a função alterada das mesmas pode conferir aumento ou diminuição na susceptibilidade a uma certa patologia (DALY et al., 1993). A maioria dos agentes mutagênicos requer ativação metabólica antes de se ligar ao DNA e precisa passar por uma fase de detoxificação adequada para que não tenham uma atividade mutagênica (ROGERS, 1994; BARTSCH e HIETANEN, 1996). A quantidade final efetiva dos carcinógenos depende da ação competitiva entre estes mecanismos de ativação e detoxificação (HAYES, 1995). Portanto, alterações nas funções das enzimas que participam destas fases metabólicas podem promover um distúrbio no equilíbrio destes processos. Assim, o conhecimento das variantes polimórficas dos genes do biometabolismo pode ajudar a elucidar a variabilidade na resposta individual após a exposição aos diferentes carcinógenos (DALY et al., 1993; HIRVONEN, 1995).

O estudo de variações interindividuais na capacidade de metabolização de xenobióticos já identificou inúmeros polimorfismos genéticos que interferem nos níveis de expressão ou na atividade catalítica das enzimas envolvidas nos mecanismos de ativação ou detoxificação destes compostos (MACLEOD, 1997; MEYER e ZANGER, 1997). Entre eles, encontram-se os polimorfismos dos genes *CYP1A1*

(CROFTS et al., 1991; HAYASHI et al., 1991; CASCORBI et al., 1996; WALKER, 1996; AMORIM, 2004) e do gene *GSTP1* (BOARD et al., 1990), cujos produtos enzimáticos atuam na fase I e na fase II do metabolismo, respectivamente. A escolha destes genes como objeto deste estudo, em especial das variantes *CYP1A1*2B* e *GSTP1*B*, deve-se ao seu potencial como marcadores de susceptibilidade para diferentes tipos de câncer, indicando indivíduos ou populações com diferenças genéticas capazes de influenciar a resposta do organismo aos agentes ambientais, principalmente aos compostos do tabaco. A variante *CYP1A1*2B*, segundo NAKACHI et al. (1991), codifica uma enzima com atividade catalítica diminuída, com conseqüente formação de adutos no DNA, levando ao acúmulo de danos com potencial carcinogênico (KIYOHARA et al., 1996). Este alelo foi correlacionado a um aumento na susceptibilidade ao câncer de pulmão em populações japonesas (KAWAJIRI et al., 1990; HAYASHI et al., 1991; NAKACHI et al., 1995). O alelo *GSTP1*B* está associado ao aumento da incidência de cânceres de bexiga, testículo e próstata (HARRIES et al., 1997), laringe e faringe (MATTHIAS et al., 1998) e pulmão (RYBERG et al., 1997; STUCKER et al., 2002) e há evidências de que esta correlação positiva esteja relacionada à atividade reduzida da variante enzimática *GSTP1*B* em sua capacidade de detoxificação (JOHANSSON et al., 1998; PANDYA et al., 2000).

A identificação dos indivíduos que possuam uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores da cavidade bucal, baseada na capacidade de metabolizar os carcinógenos presentes no cigarro, é de grande importância (GEISLER e OLSHAN, 2001). Assim, estudos nesta área necessitam ser realizados, já que a identificação precoce dos indivíduos mais propensos a acumular mutações no decorrer de suas vidas pode conduzir a novas perspectivas para a prevenção e o diagnóstico precoce de certos tumores (GATTÁS, 2001).

Os últimos 30 anos apresentaram um progresso considerável na compreensão dos mecanismos genético-moleculares das doenças herdadas de forma Mendeliana. O desafio atual consiste em elucidar as bases genéticas das doenças humanas complexas, as quais resultam de um efeito combinado de muitos genes. O entendimento das bases genéticas das doenças complexas, que inclui a maior parte dos cânceres e o da

cavidade bucal, contribuirá para o conhecimento de novos aspectos da etiologia da doença e para o desenvolvimento de novos métodos preventivos e de tratamento (PHAROAH, 2004). Várias informações indicam um modelo poligênico para a susceptibilidade ao câncer, variando de alguns poucos alelos que conferem risco moderado até um número maior de alelos que conferem um pequeno aumento no risco. Estudos de ligação baseados em famílias têm sido a base para muitos sucessos no mapeamento de doenças Mendelianas, mas esta abordagem está praticamente limitada aos genes com alelos raros e de alta penetrância, não apresentando poder informativo capaz de detectar alelos que conferem risco moderado que, segundo PHAROAH (2004), são norma nas doenças complexas. A principal alternativa para o estudo de ligação é o estudo de associação, no qual as frequências de variantes genéticas – como *CYP1A1*2B* e *GSTP1*B* – são comparadas entre pacientes e controles, caracterizando-se como associação positiva quando a distribuição dos genótipos difere nos dois grupos.

Em relação às frequências genótípicas de *CYP1A1*, AMORIM et al. (2004), estudando uma população do Rio de Janeiro, apresentaram os dados que mais se aproximam dos dados deste estudo, com uma frequência de indivíduos contendo o alelo *CYP1A1*2B* de cerca de 0,16. Esta frequência ainda é significativamente pequena se comparada com a frequência de 0,28 encontrada neste estudo ($\chi^2_1=6,03$, $P<0,025$). A diferença encontrada entre as frequências genótípicas do presente estudo e as dos outros dados da literatura (OLSHAN et al., 2000; GARTE et al., 2001; TERRY et al., 2003; LI et al., 2004) pode ser devida à miscigenação da população considerada caucasóide na região do Paraná, observando-se que estudos sobre o polimorfismo Ile/Val, como o de GARTE et al. (2001), envolvendo um grande número de indivíduos (n=1132), demonstram uma frequência maior de heterozigotos (0,36) e homozigotos mutantes (0,05) em populações como a asiática. Apesar das frequências genótípicas de ambos os grupos encontrarem-se em equilíbrio de Hardy e Weinberg, também não podem ser descartados problemas metodológicos para avaliação do polimorfismo em questão e testes para identificação de possíveis resultados falso-positivos estão sendo implementados.

Quanto às frequências genóticas de *GSTP1*, nota-se de acordo com a Tabela 7, que nossos dados estão de acordo com outros já descritos.

O estudo de associação realizado neste trabalho apresentou resultados que não indicam correlação entre a presença de câncer bucal e os genótipos de *CYP1A1* ($P=1$; $OR=1,06$, IC 95%: 0,49 – 2,29) e de *GSTP1* ($P=0,380720 \pm 0,005483$; $OR=1,40$, IC 95%: 0,70 – 2,79). Diferentes estudos divergem sobre estas associações, como mostrado adiante, mas deve ser considerada a possibilidade de se obter resultados falso-positivos ao acaso (erro tipo I) e falso-negativos devido à falta de poder estatístico (erro tipo II) em amostras de tamanho reduzido ou com controles inadequados (IOANNIDIS et al., 2001; LOCHMUELLER et al., 2003). PHAROAH (2004) exemplifica o exposto demonstrando que uma amostra de 1.000 pacientes e 1.000 controles seria o ideal para detectar um alelo de susceptibilidade co-dominante com frequência de 0,20 e conferindo um risco relativo de 1,5. Infelizmente, a obtenção de um tamanho amostral ideal é praticamente inviável para um único grupo de pesquisa no estudo de algumas doenças. Sendo assim, deve ser considerado – como também é admitido pelos mesmos autores – que amostras classificadas como de tamanho não ideal, obtidas por diferentes grupos de pesquisa com uma abordagem metodológica semelhante, se analisados em conjunto, podem fornecer informações valiosas nos estudos de associação.

A não confirmação de associações também pode resultar de uma heterogeneidade de risco entre populações. Enquanto KAWAJIRI et al. (1990), HAYASHI et al. (1991) e NAKACHI et al. (1995) demonstraram correlação positiva entre os alelos *CYP1A1**2A e *CYP1A1**2B e a susceptibilidade ao câncer de pulmão em populações japonesas, HIRVONEN et al. (1992), TEFREÉ et al. (1992) e SHIELDS et al. (1993) não verificaram esta correlação em populações caucasóides ou afro-americanas. Em um estudo posterior, entretanto, XU et al. (1996) demonstraram associação do polimorfismo *MspI* e câncer de pulmão em uma população norte-americana, concluindo que tal polimorfismo influencia na susceptibilidade à doença em caucasóides e japoneses da mesma forma. Estes dados levantam a questão sobre o verdadeiro impacto da mutação $A_{4889} \rightarrow G$, que caracteriza o alelo *CYP1A1**2B, sobre a

função enzimática. NAKACHI et al. (1991), HAYASHI et al. (1991) e KIYOHARA et al. (1996) admitem que a mutação afeta a atividade catalítica da enzima, enquanto PERSSON et al. (1997) postulam que a troca do aminoácido leucina por valina nesta região não interfere na ligação da enzima com o substrato, pois não muda a conformação da molécula. Recentemente, GEORGIADIS et al. (2005) demonstraram a existência de uma indução diferencial de *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2B* mesmo em não fumantes quando estes são expostos à fumaça do tabaco presente no ambiente, bem como a elevação nos níveis de marcadores de dano genético nos portadores destas variantes. Mais estudos funcionais devem ser realizados para esclarecer estes aspectos.

PARK et al. (1997) concluíram que o polimorfismo Ile/Val do gene *CYP1A1*, isoladamente, está associado a um risco elevado para o desenvolvimento do CCE na cavidade bucal (OR=2,6; IC 95%: 1,2 – 5,7). Esta informação diverge dos dados deste trabalho (P=1; OR=1,06, IC 95%: 0,49 – 2,29), que são corroborados por estudos realizados por OPHUIS et al. (1998) (OR=1,1; IC 95%: 0,7 – 1,9), OLSHAN et al. (2000) (OR=1,6; IC 95%: 0,6 – 3,8) e XIE et al. (2004) (OR=0,9; IC 95%: 0,5 – 1,9).

Embora a grande maioria dos estudos não demonstre associação deste polimorfismo isolado com o CCE bucal, os genes do biometabolismo não agem isoladamente e a avaliação de múltiplos genes interagindo entre si e com a exposição aos carcinógenos pode ser necessária para compreender este fenômeno. Deste modo, alguns trabalhos demonstram um risco aumentado para o câncer de cavidade bucal para uma combinação das variantes *CYP1A1* Ile/Val com o genótipo *GSTMI* nulo (OLSHAN et al., 2000; SATO et al., 2000; NAIR e BARTSCH, 2001). O estudo de PARK (1997), porém, apesar de demonstrar a associação do polimorfismo Ile/Val, isoladamente, com o CCE bucal, mostra uma ausência da interação *CYP1A1* Ile/Val / *GSTMI* nulo como genótipo de risco. Nosso estudo também não demonstrou interação entre os genótipos de *CYP1A1* Ile/Val e de *GSTP1* e correlação com o CCE bucal ($\chi^2_{8}=10,25$; $P>0,20$). OLSHAN et al. (2000) também demonstraram ausência de interação em escala aditiva ou multiplicativa entre os mesmos genótipos.

Os dados obtidos pelos últimos autores apresentaram uma OR de 1,2 (IC 95 %: 0,8 – 1,9) em relação aos genótipos de *GSTP1* e o CCE da cabeça e do pescoço. Em

nosso estudo também não observamos evidências de associação entre as variantes de *GSTP1* e o CCE bucal, especificamente ($P=0,411340 \pm 0,008899$), e a OR observada foi de 1,40 (IC 95%: 0,70 – 2,79). Além dos dados de OLSHAN et al. (2000), dados semelhantes aos nossos foram encontrados nos trabalhos de JOURENKOVA-MIRONOVA et al. (1999) (OR=1,6; IC 95%: 1,0 – 2,8) e HASHIBE et al. (2003) (OR=1,10; IC 95%: 0,92 – 1,31). Estes últimos, apesar de demonstrarem através de uma meta-análise a ausência de associação entre o alelo *GSTP1**B e a neoplasia bucal, obtiveram evidências de um risco aumentado para o câncer de cabeça e pescoço em indivíduos portadores de haplótipos com a combinação *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e *GSTP1**B (OR=2,06; IC 95%: 1,11 – 3,81). Trabalhos anteriores, como os de KATOH et al. (1999) (OR=1,93; IC 95%: 1,05 – 3,98) e PARK et al. (1999) (OR=2,4; IC 95%: 1,2 – 4,8), divergem do nosso, pois mostraram um risco mais elevado associando positivamente o alelo *GSTP1**B ao câncer bucal. O estudo destes últimos autores demonstrou ainda que o risco é ainda maior em indivíduos homocigotos mutantes expostos à pequena quantidade de fumaça do tabaco do que entre indivíduos tabagistas pesados, devido ao fato dos indivíduos homocigotos mutantes para este gene supostamente apresentarem uma capacidade consideravelmente reduzida de detoxificação dos carcinógenos presentes na fumaça do tabaco.

Em nosso estudo, as amostras incluídas no grupo dos pacientes contêm apenas sete indivíduos não tabagistas. Três deles são homocigotos selvagens para ambos os genes, três são homocigotos selvagens para *CYP1A1* e heterocigotos para *GSTP1* e um é heterocigoto para *CYP1A1* e homocigoto selvagem para *GSTP1*. O grupo controle contém cinco indivíduos homocigotos selvagens para ambos os genes e dois homocigotos selvagens para *CYP1A1* e heterocigotos para *GSTP1*. Tais dados são insuficientes para fornecer informações consistentes sobre a relação do tabaco com o desenvolvimento do câncer bucal em diferentes genótipos.

Além das divergências encontradas nos estudos que pesquisam a associação do alelo *GSTP1**B com o CCE bucal, novas divergências, envolvendo o mesmo alelo, porém em outras localizações anatômicas, são geradas por estudos mais recentes. Os trabalhos de NAZAR-STEWART et al. (2003) e SCHNEIDER et al. (2004)

demonstram que não há associação positiva significativa entre esta variante e o câncer de pulmão, contrariando os resultados previamente obtidos por RYBERG et al. (1997) e STUCKER (2002). SCHNEIDER et al. (2004) também mostraram evidências de que não há efeito conjunto pela combinação dos genótipos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* e o hábito tabagista no câncer de pulmão. No estudo de outras regiões do trato digestivo, além da cavidade bucal, ficaram evidenciadas as ausências de associações significativas entre a variante *GSTP1**B e os cânceres de esôfago (ABBAS et al., 2004) e colorretal (CHEN et al., 2005).

É importante ressaltar que as discrepâncias entre os dados de associação nas análises caso-controle encontradas na literatura podem ocorrer pela variabilidade interindividual no nível de expressão das enzimas metabolizadoras nos tecidos da cabeça e do pescoço, de forma independente do genótipo. Os níveis de atividade das enzimas GSTs, entre elas a P1, variam significativamente entre indivíduos, tanto em tecidos normais e tecidos cancerosos entre si, bem como entre os mesmos tecidos da cabeça e do pescoço (MULDER et al., 1995). A expressão de *CYP1A1* também varia amplamente entre os diferentes indivíduos (VANDEN HEUVEL et al., 1993; WHYATT et al., 1995). A relação entre o genótipo e o fenótipo originado de *CYP1A1* ainda não é suficientemente compreendida. Assim, riscos associados com genótipos específicos avaliados neste estudo podem não ser detectados devido à atuação de outros fatores que influenciam a expressão das enzimas metabolizadoras de carcinógenos. Há evidências de que os níveis de metilação da região promotora de *GSTP1* estão aumentados de forma significativa nos tumores de próstata (JERÓNIMO et al., 2001; LIN et al., 2001), fígado e mama (ESTELLER et al., 1998). Esta alteração epigenética interfere na expressão do gene nestes órgãos.

A distribuição e disposição dos carcinógenos da fumaça do cigarro na cavidade bucal ainda não foram bem estudadas e as vias específicas de ativação e detoxificação dos carcinógenos nos tecidos da cabeça e do pescoço também ainda não foram bem caracterizadas. A análise genotípica pode trazer informações sobre o papel das vias metabólicas de carcinógenos específicos. Entretanto, devido às divergências encontradas entre os diferentes estudos envolvendo estes genes do biometabolismo, as

pesquisas futuras devem ser intensificadas objetivando obter informações mais consistentes e que possibilitem um melhor entendimento sobre as interações genético-ambientais.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo foram encontradas frequências alélicas de 0,14 e 0,32 para as variantes *CYP1A1*2B* e *GSTP1*B*, que encontraram-se homogeneamente distribuídas entre pacientes e controles, bem como entre os sexos masculino e feminino. Para ambos os genes as amostras estudadas encontraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas das variantes alélicas, genotípicas e haplotípicas de *CYP1A1*2B* e *GSTP1*B* com o câncer de cavidade bucal.

A ausência desta verificação, no entanto, não exclui completamente a possibilidade destes genes exercerem alguma influência no desenvolvimento do câncer bucal, tendo em vista que haplótipos envolvendo os diversos genes do biometabolismo podem contribuir de forma diferenciada para a carcinogênese.

Além de um acréscimo no tamanho amostral, para aumentar o poder de verificação estatística, estudos funcionais envolvendo as enzimas codificadas por estes genes também devem ser realizados para a obtenção de resultados mais definitivos no estudo de associação destes genes do biometabolismo com o desenvolvimento de neoplasias bucais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; DELVINQUIERE, K.; LECHEVREL, M.; LEBAILLY, P.; GAUDUCHON, P.; LAUNOY, G.; SICHEL, F. 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.**, 10: 3389-3393, 2004.

ABDEL-RAHMAN, S.Z.; EL-ZEIN, R.A.; ANWAR, W.A.; AU, W.W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. **Cancer Lett.**, 107: 229-233, 1996.

ALBERTINI, R.J. Biomarker responses in human populations: towards a worldwide map. **Mutat. Res.**, 428: 217-226, 1999.

ALEXANDRIE, A.K.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; SEIDEGARD, J.; TORNLING, G.; RANNUG, A. Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1: a study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. **Carcinogenesis**, 15: 1785-1790, 1994.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts and figures 2004**. American Cancer Society. Atlanta, 2004.

AMORIM, L.M.F.; LOTSCH, P.F.; SIMÃO, T.A.; GALLO, C.V.M.; PINTO, L.F.R. Analysis of CYP1A1 exon 7 polymorphisms by PCR-SSCP in a Brazilian population and description of two novel gene variations. **Mutat. Res.**, 547: 35-40, 2004.

ANTTILLA, S.; HIETANEN, E.; VAINIO, H.; CAMUS, A-M.; GELBOIN, H.V.; PARK, S.S.; HEIKKILÄ, L.; KARJALAINEN, A.; BARTSCH, H. Smoking and peripheral type of cancer are related to high levels of pulmonary cytochrome P450IA in lung cancer patients. **Int. J. Cancer**, 47: 681-685, 1991.

ANWAR, W.A.; ABDEL-RAHMAN, S.Z.; EL-ZEIN, R.; MOSTAFA, H.M.; AU, W.W. Genetic polymorphism of GSTM1, CYP2E1 and CYP2D6 in Egyptian bladder cancer patients. **Carcinogenesis**, 17: 1923-1929, 1996.

AU, W.W.; OH, H.Y.; GRADY, J.; SALAMA, S.A.; HEO, M.Y. Usefulness of genetic susceptibility and biomarkers for evaluation of environmental health risk. **Environ. and Mol. Mutagenesis**, 37: 215-225, 2001.

AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. **Mutat. Res.**, 464: 65-76, 2000.

BAILEY, R.L.; ROODI, N.; VERRIER, C.S.; YEE, C.J.; DUPONT, W.D.; PARL, F.F. Breast cancer and CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasian and African Americans. **Cancer Res.**, 58: 65-70, 1998.

BARTSCH, H. Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. **Mutat. Res.**, 462: 255-279, 2000.

BARTSCH, H.; HIETANEN, E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. **Environ. Health Perspect.**, 104: 569-577, 1996.

BOARD, P.G.; COGGAN, M.; JOHNSTON, P.; ROSS, V.; SUZUKI, T.; WEBB, C.G. Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. **Pharmacol Ther.**, 48: 357-369, 1990.

BOIS, F.; KROWECH, G.; ZEISE, L. Modeling human interindividual variability in metabolism and risk: the example of 4-aminobiphenyl. **Risk Analysis**, 15: 201-213, 1995.

BOYLE, P.; MACFARLANE, G.J.; ZHENG, T.; MAISONNEUVE, P.; EVSTIFEEVA, T.; SCULLY, C. Recent advances in epidemiology of head and neck cancer. **Curr. Opin. Oncol.**, 4: 471-477, 1992.

BRENNAN, J.A.; BOYLE, J.O.; KOCH, W.M.; ET AL. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N. Engl. J. Med.**, 332: 712-717, 1995.

BROCKMÖLLER, J.; KERB, R.; DRAKOULIS, N.; NITZ, M.; ROOTS, I. Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class m isoenzymes and y in lung cancer patients and controls. **Cancer Res.**, 53: 1004-1011, 1993.

BUETLER, T.M.; EATON, D.L. Glutathione S-transferase: aminoacid sequence comparison, classification and phylogenetic relationship. **Environ. Carcinogen. Ecotoxicol. Ver.**, 10: 181-203, 1992.

CAPORASO, N. Selection of candidate genes for population studies. Em: **Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer**. IARC Scientific publications. Lyons, 148: 23-36, 1999.

CARRANO, A.V.; NATARAJAN, A.T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutat. Res.**, 204: 381, 1988.

CASCORBI, I.; BROCKMÖLLER, J.; ROOTS, I. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1. Population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. **Cancer Res.**, 56: 49-65, 1996.

CAVENEY, W.K E WHITE, R.L. The genetic basis of cancer. **Sci. Am.**, 272: 72-79, 1996.

CHANG, F.; SYRJANEN, S.; SYRJANEN, K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. **J. Clin. Oncol.**, 13: 1009-1022, 1995.

CHEN, J.K.; KATZ, R.V.; KRUTCHKOFF, D.J. Intraoral squamous cell carcinoma. Epidemiologic patterns in Connecticut from 1935 to 1985. **Cancer**, 66: 1288-1296, 1990.

CHEN, K.; JIANG, Q.T.; HE, H.Q. Relationship between metabolic enzyme polymorphism and colorectal cancer. **World J. Gastroenterol.**, 11: 331-335, 2005.

CHENG, L.; STURGIS, E.M.; EICHER, S.A.; CHAR, D.; SPITZ, M.R.; WEI, Q. Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck. **Int. J. Cancer**, 84: 220-224, 1999.

CHEVALIER, D.; ALLORGE, D.; LO-GUIDICE, J.M.; CAUFFIEZ, C.; LHERMITTE, M.; LAFITTE, J.J.; BROLY, F. Detection of known and two novel (M331I and R464S) missense mutations in the human CYP1A1 gene in a French Caucasian population. **Hum. Mutat.**, 17: 355, 2001.

CLARK, A. Oral cancer prevention and early detection. **Nurs. Stand.**, 13: 43-47, 1999.

CROFTS, F.; COSMA, G.N.; CURRIE, D.; TAIOLI, E.; TOMIOLO, P.; GARTE, S.J. A novel CYP1A1 gene polymorphism in African Americans. **Carcinogenesis**, 14: 1729-1731, 1993.

DALY, A.K.; CHOLERTON, S.; GREGORY, W.; IDLE, J.R. Metabolic polymorphisms. **Pharmac. Ther.**, 57: 129-160, 1993.

DAMM, N.; BOUQUOT, A. Patologia Epitelial. Em: **Patologia Oral e Maxilofacial**, 287-296, 1998.

DRAKOULIS, N.; CASCORBI, I.; BROCKMÖLLER, J.; GROSS, C.R.; ROOTS, J. Polymorphisms in the human CYP1A1 gene as susceptibility factors for lung cancer: exon-7 mutation (4889 A to G), and a T to C mutation in the 3'-flanking region. **Clin. Investig.**, 72: 240-248, 1994.

DUSINSKÁ, M.; FICEK, A.; HORSKA, A.; RASLOVA, K.; PETROVSKA, H.; VALLOVA, B.; DRLICKOVA, M.; WOOD, S.G.; STUPAKOVA, A.; GASPAROVIC, J.; BOBEK, P.; NAGYOVA, A.; KOVACIKOVA, Z.; BLAZICEK, P.; LIEGEBEL, U.; COLLINS, A.R. Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. **Mutat. Res.**, 482: 47-55, 2001.

EL-SAYED, S.; NELSON, N. Adjuvant and adjunctive chemotherapy in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck region: a meta-analysis of prospective and randomised trials. **J. Clin. Oncol.**, 14: 838-847, 1996.

ESTELLER, M.; CORN, P.G.; URENA, J.M.; GABRIELSON, E.; BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. **Cancer Res.**, 5: 4515-4518, 1998.

EUBANKS, M. Biomarkers: the clues to genetic susceptibility. **Environ. Health Perspect.**, 102: 50-56, 1994.

FEARON, E.R. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. **Science**, 278: 1043-1050, 1997.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, 61: 759-767, 1990.

FEIGELSON, H.S.; ROSS, R.K.; YU, M.C.; COETZEE, G.A.; REICHARDT, J.K.; HENDERSON, B.E. Genetic susceptibility to cancer from exogenous and endogenous exposures. **J. Cell Biochem. Supl.**, 25: 15-22, 1996.

FERREIRA, M.E.; GUATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa-Cenargem. Brasília, 1998.

FLAITZ, C.M.; NICHOLS, C.M.; ADLER-STORTHZ, K. et al. Intraoral squamous cell carcinoma in human immunodeficiency syndrome virus infection. A clinicopathologic study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, 80: 55-62, 1995.

GARTE, S.J.; TRACHMAN, F.; CROFTS, F.; TONIOLO, P.; BUXBAUM, J.; BAYO, S.; TAIOLI, E. Distribution of composite CYP1A1 genotypes in Africans, African-Americans and Caucasians. **Human Hered.**, 46: 121-127, 1996.

GARTE, S.; GASPARI, L.; ALEXANDRIE, A.K.; AMBROSONE, C.; AUTRUP, H.; AUTRUP, J.L.; BARANOVA, H.; BATHUM, L.; BENHAMOU, S.; BOFFETTA, P.; BOUCHARDY, C.; BRESKVAR, K.; BROCKMOLLER, J.; CASCORBI, I.; CLAPPER, M.L.; COUTELLE, C.; DALY, A.; DELL'OMO, M.; DOLZAN, V.; DRESLER, C.M.; FRYER, A.; HAUGEN, A.; HEIN, D.W.; HILDESHEIM, A.; HIRVONEN, A.; HSIEH, L.L.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; KALINA, I.; KANG, D.; KIHARA, M.; KIYOHARA, C.; KREMERS, P.; LAZARUS, P.; LE MARCHAND, L.; LECHNER, M.C.; VAN LIESHOUT, E.M.; LONDON, S.; MANNI, J.J.; MAUGARD, C.M.; MORITA, S.; NAZAR-STEWART, V.; NODA, K.; ODA, Y.; PARL, F.F.; PASTORELLI, R.; PERSSON, I.; PETERS, W.H.; RANNUG, A.; REBBECK, T.; RISCH, A.; ROELANDT, L.; ROMKES, M.; RYBERG, D.; SALAGOVIC, J.; SCHOKET, B.; SEIDEGARD, J.; SHIELDS, P.G.; SIM, E.; SINNET, D.; STRANGE, R.C.; STUCKER, I.; SUGIMURA, H.; TO-FIGUERAS, J.; VINEIS, P.; YU, M.C.; TAIOLI, E. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 10: 1239-1248, 2001.

GATTÁS, G.J.F. Associação de genes polimórficos de metabolização de xenobióticos e câncer de boca e de laringe. **Mutagênese**, supl.47, 2001.

GEISLER, S.A.; OLSHAN, A.F. GSTM1, GSTT1 and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Am. J. Epidem.**, 154: 95-105, 2001.

GEORGIADIS, P.; TOPINKA, J.; VLACHODIMITROPOULOS, D.; STOIKIDOU, M.; GIOKA, M.; STEPHANOU, G.; AUTRUP, H.; DEMOPOULOS, N.A.; KATSOUYANNI, K.; SRAM, R.; KYRTOPOULOS, S.A. Interactions between CYP1A1 polymorphisms and exposure to environmental tobacco smoke in the modulation of lymphocyte bulky DNA adducts and chromosomal aberrations. **Carcinogenesis**, 26: 93-101, 2005.

GILLILAND, F.D. Ethnic differences in cancer incidence: a marker for inherited susceptibility? **Environ. Health Perspect.**, 105: 897-900, 1997.

GOLDSTEIN, A.M.; BLOT, W.J.; GREENBERG, R.S.; SCHOENBERG, J.B.; AUSTIN, D.F.; PRESTON-MARTIN, S. et al. Familial risk in oral and pharyngeal cancer. **Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.**, 30B: 319-322, 1994.

GONZALEZ, F.J. The molecular biology of cytochrome P450s. **Pharmacol. Rev.**, 40: 243-288, 1989.

GONZALEZ, F.W.; NEBERT, D.W. Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant "warfare", molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. **Trends Genet.**, 6: 182-186, 1990.

GREIDER, C.W.; BLACKBURN, E.H. Telomeres, telomerase and cancer. **Sci. Am.**, 274: 92-97, 1996.

GUENGERICH, F.P. Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. **Cancer Res.**, 48: 2946-2954, 1988.

GUENGERICH, F.P. Metabolic activation of carcinogens. **Pharmacol. Ther.**, 54: 17-61, 1992.

GUENGERICH, F.P. Metabolism of chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, 21: 345-351, 2000.

GUPTA, P.C.; BHONSLE, R.B.; MURTY, P.R.; MEHTA, F.S.; PINDBORG, J.J. Epidemiologic characteristics of treated oral cancer patients detected in a house-to-house survey in Kerala, India. **Indian J. Cancer**, 23: 206-211, 1986.

GUPTA, P.C.; MEHTA, F.S.; PINDBORG, J.J.; BHONSLE, R.B.; MURTI, P.R.; DAFTARY, D.K. et al. Primary prevention trial of oral cancer in India: a 10-year follow-up study. **J. Oral Pathol. Med.**, 21: 433-439, 1992.

GUPTA, P.C.; MURTI, P.R.; BHONSLE, R.B.; MEHTA, F.S.; PINDBORG, J.J. Effect of cessation of tobacco use on the incidence of oral mucosal lesions in a 10-year follow-up study of 12,212 users. **Oral Dis.**, 1: 54-58, 1995.

HARRIES, L.W.; STUBBINS, M.J.; FORMAN, D.; HOWARD, G.C.; WOLF, C.R. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. **Carcinogenesis**, 18: 641-644, 1997.

HASHIBE, M.; BRENNAN, P.; STRANGE, R.C.; BHISEY, R.; CASCORBI, I.; LAZARUS, P.; OUDE OPHUIS, M.B.; BENHAMOU, S.; FOULKES, W.D.; KATOH, T.; COUTELLE, C.; ROMKES, M.; GASPARI, L.; TAIOLI, E.; BOFFETTA, P. Meta- and pooled analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 12: 1509-1517, 2003.

HAYASHI, S.-I.; WATANABE, J.; NAKACHI, K.; KAWAJIRI, K. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the cytochrome P450IA gene. **J. Biochem.**, 110: 407-411, 1991.

HAYASHI, S-I.; WATANABE, J.; NAKACHI, K.; KAWAJIRI, K. PCR detection of an A/G polymorphism within exon 7 of the CYP1A1 gene. **Nucleic Acid Res.**, 19: 4797, 1991.

HAYES, R.B. Genetic susceptibility and occupational cancer. **Med. Lav.**, 86: 206-213, 1995.

HEAGERTY, A.H.M.; FITZGERALD, D.; SMITH, A.; BOWERS, B.; JONES, P.; FRYER, A.A.; ZHAO, L.; ALLDERSEA, J.; STRANGE, R.C. Glutathione S-transferase GSTM1 phenotypes and protection against cutaneous tumors. **Lancet**, 343: 266-268, 1994.

HILDEBRAND, C.E.; GONZALEZ, F.J.; MCBRIDE, O.W.; NEBERT, D.W. Assignment of the human 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible cytochrome P1-450 gene to chromosome 15. **Nucleic Acids Res.**, 13: 2009-2016, 1985.

HINDLE, I.; DOWNER, M.C.; SPEIGHT, P.M. The epidemiology of oral cancer. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, 34: 471-476, 1996.

HIRVONEN, A. Genetic factors in individual response to environmental exposures. **JOEM**, 37: 37-43, 1995.

HIRVONEN, A.; HUSGAFVEL-PURSIAINEN, K.; KARJALAINEN, A.; ANTTILA, S.; VAINIO, H. Point mutational MspI and Ile-Val polymorphisms closely linked in the CYP1A1 gene: lack of association with susceptibility to lung cancer in a Finish study population. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 2: 485-489, 1992.

HOEIJMAKERS, J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, 411: 366-374, 2001.

HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. **Cancer Res.**, 58: 4023-4037, 1998.

IDLE, J. Is environmental carcinogenesis modulated by host polymorphism? **Mutat. Res.**, 247: 259-266, 1991.

INGELMAN-SUNDBERG, M.; OSCARSON, M.; MCLELLAN, R.A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. **Trends Pharmacol Sci.**, 20: 342-349, 1999.

INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. **Mutat. Res.**, 482: 11-19, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. <http://www.inca.gov.br/estimativas/2003/index.asp?link=tabelaestados.asp&UF=BR>. INCA. Rio de Janeiro, 2004.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Tobacco smoking**. IARC. Lyons, 38, 1986.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Alcoholic beverages**. IARC. Lyons, 42, 1989.

IOANNIDIS, J.P.; NTZANI, E.E.; TRIKALINOS, T.A.; CONTOPOULOS-IOANNIDIS, D.G. Replication validity of genetic association studies. **Nature Genet.**, 29: 306-309, 2001.

JAHNKE, V.; MATTHIAS, C.; FRYER, A. Glutathione S-transferase and cytochrome P-450 polymorphism as risk factors for squamous cell carcinoma of the larynx. **Am. J. Surg.**, 172: 671-673, 1996.

JERÓNIMO, C.; USADEL, H.; HENRIQUE, R.; OLIVEIRA, J.; LOPES, C.; NELSON, W.G.; SIDRANSKY, D. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, 93:1747-1752, 2001.

JOHANSSON, A.S.; STENBERG, G.; WIDERSTEN, M.; MANNERVIK, B. Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1-1 governed by the H-site residue 105. **J. Mol. Biol.**, 278: 687-698, 1998.

JOHNSON, N.W. **Ed. Oral cancer: detection of patients and lesions at risk.** Cambridge University Press. Cambridge, 1991.

JOHNSON, N.W.; WARNAKULASURIYA, X.A. Epidemiology and aetiology of oral cancer in the United Kingdom. **Community Dental Health**, 10: 1330, 1993.

JOURENKOVA-MIRONOVA, N.; VOHO, A.; BOUCHARDY, C.; WIKMAN, H.; DAYER, P.; BENHAMOU, S.; HIRVONEN, A. Glutathione S-transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 genotypes and the risk of smoking-related oral and pharyngeal cancers. **Int. J. Câncer**, 81: 44-48, 1999.

JOVANOVIC, A.; KOSTENSE, P.J.; SCHULTEN, E.A.; SNOW, G.B.; VAN DER WAAL, I. Delay in diagnosis of oral squamous cell carcinoma: a report from the Netherlands. **Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.**, 28B: 37-38, 1992.

KADLUBAR, F.F. Concluding remarks: symposium on Genetic Susceptibility to Environmental Toxicants. **Mutat. Res.**, 482: 111-113, 2001.

KADERLIC, K.R.; KADLUBAR, F.F. Metabolic polymorphism and carcinogen-DNA adduct formation in human populations. **Pharmacogenetics**, 5: S108-117, 1995.

KATO, S.; SHIELDS, G.; CAPORASO, N.; SUGIMURA, H.; TRIVERS, G.E.; TUCKER, M.A.; TRUMP, B.F.; WESTON, A.; HARRIS, C.C. Analysis of cytochrome p450 2E1 genetic polymorphisms in relation to human lung cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, 3: 515-518, 1994.

KATOH, T.; KANEKO, S.; TAKASAWA, S.; NAGATA, N.; INATOMI, H.; IKEMURA, K.; ITOH, H.; MATSUMOTO, T.; KAWAMOTO, T.; BELL, D.A. Human glutathione-S-transferase P1 polymorphism and susceptibility to smoking related epithelial cancer; oral, lung, gastric, colorectal and urothelial cancer. **Pharmacogenetics**, 9: 165-169, 1999.

KAWAJIRI, K.; NAKACHI, K.; IMAI, K.; WATANABE, J.; HAYASHI, S. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. **Critical Rev. Oncol. Hematol.**, 14: 77-87, 1993.

KAWAJIRI, K.; NAKACHI, K.; IMAI, K.; YAOSHII, A.; SHINODA, N.; WATANABE, J. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P-450IA1 gene. **FEBS Lett.**, 263: 131-133, 1990.

KING, G.N.; HEALY, C.M.; GLOVER, M.T.; KWAN, J.T.; WILLIAMS, D.M.; LEIGH, I.M. et al. Increased prevalence of dysplastic and malignant lip lesions in renal-transplant recipients. **N. Engl. J. Med.**, 332: 1052-1057, 1995.

KIYOHARA, C.; HIROHATA, T.; INUTSUKA, S. The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms of the CYP1A1 gene. **Jpn. J. Cancer. Res.**, 87: 18-24, 1996.

KNUDSON, A.G. Hereditary cancer, oncogenes and anti-oncogenes. **Cancer Res.**, 45: 1437-1443, 1985.

KOCH, W.M.; LANGO, M.; SEWELL, D.; ZAHURAK, M.; SIDRANSKY, D. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. **Laryngoscope**, 109: 1544-1551, 1999.

KROEMER, H.; EICHELBAUM, M. Molecular bases and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism. **Life Sciences**, 56: 2285-2298, 1995.

LANG, M.; PELKONEN, O. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. Em: **Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer**. IARC Scientific publications. Lyons, 148: 13-22, 1999.

LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, 396: 643-649, 1998.

LEWIN, F.; NORELL, S.E.; JOHANSSON, H. et al. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. A population-based case-referent study in Sweden. **Cancer**, 82: 1367-1375, 1998.

LI, Y.; MILLIKAN, R.C.; BELL, D.A.; CUI, L.; TSE, C.J.; NEWMAN, B.; CONWAY, K. Cigarette smoking, cytochrome P4501A1 polymorphisms and breast cancer among African-American and white women. **Breat Cancer Res.**, 6:460-473, 2004.

LICHTENSTEIN, P.; HOLM, N.V.; VERKASALO, P.K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer: analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. **N. Engl. J. Med.**, 343: 78-85, 2000.

LIN, J.H.; LU, A.Y.H. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. **Clin. Pharmacokinet.**, 35: 361-390, 1998.

LIN, X.; ASGARI, K.; PUTZI, M.J.; GAGE, W.R.; YU, X.; CORNBLATT, B.S.; KUMAR, A.; PIANTADOSI, S.; DEWEESE, T.L.; DE MARZO, A.M.; NELSON, W.G. Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide. **Cancer Res.**, 61: 8611-8616, 2001.

LIPPMAN, S.; HONG, W.K. Molecular markers of the risk of oral cancer. **N. Engl. J. Med.**, 344: 1323-1326, 2001.

LLEWELLYN, C.D.; JOHNSON, N.W.; WARNAKULASURIYA, K.A. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people—a comprehensive literature review. **Oral Oncol.**, 37: 401-418, 2001.

LOHMULLER, K.E.; PEARCE, C.L.; PIKE, M.; LANDER, E.S.; HIRSCHHOM, J.N. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. **Nature Genet.**, 33: 177-182, 2003.

MACFARLANE, G.J.; BOYLE, P.; EVSTIFEEVA, T.V.; ROBERTSON, C.; SCULLY, C. Rising trends of oral cancer mortality among males worldwide: the return of an old public health problem. **Cancer Causes Control**, 5: 259-265, 1994.

MACLEOD, S.; SINHA, R.; KADLUBAR, F.F.; LANG, N.P. Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 influence the in vivo function of CYP1A2. **Mutat. Res.**, 376: 135-142, 1997.

MANNERVIK, B.; ALIN, P.; GUTHENBERG, C.; JENSSON, H.; TAHIR, M.K.; WARHOLM, M.; JORNVALL, H. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82: 7202-7206, 1985.

MASHBERG, A., BOFFETTA, P.; WINKELMAN, R. et al. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. **Cancer**, 72: 1369-1375, 1993.

MATTHIAS, C.; BOCKMUHL, U.; JAHNKE, V.; HARRIES, L.W.; WOLF, C.R.; JONES, P.W.; ALLDERSEA, J.; WORRALL, S.F.; HAND, P.; FRYER, A.A.; STRANGE, R.C. The Glutathione S-transferase GSTP1 polymorphism: effects on susceptibility to oral/pharyngeal and laryngeal carcinomas. **Pharmacogenetics**, 8: 1-6, 1998.

MATTHIAS, C.; BOCKMUHL, U.; JAHNKE, V.; JONES, P.W.; HAYES, J.D.; ALLDERSEA, J.; GILFORD, J.; BAILEY, L.; BATH, J.; WORRALL, S.F.; HAND, P.; FRYER, A.A.; STRANGE, R.C. Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers. **Pharmacogenetics**, 8: 91-100, 1998.

MCDONNELL, W.M.; SCHEIMAN, J.M.; TRABER, P.G. Induction of cytochrome p450IA genes (CYP1A1) by omeprazole in the human alimentary tract. **Gastroenterology**, 103: 1509-1516, 1992.

MCKAIG, R.G.; BARIC, R.S.; OLSHAN, A.F. Human papilloma virus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. **Head Neck**, 20: 250-265, 1998.

MEYER, U.A.; ZANGER, U.M. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. **Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.**, 37: 269-296, 1997.

MILLER, M.P. **R X C: a program for the analysis of contingency tables via the metropolis algorithm computer**. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, 1997.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. **Nucl. Acid. Res.**, 16: 1215, 1988.

MOSCOW, J.A.; TOWNSEND, A.J.; GOLDSMITH, M.E.; WHANG-PENG, J.; VICKERS, P.J.; POISSON, R.; LEGAULT-POISSON, S.; MYERS, C.E.; COWAN, K.H. Isolation of the human anionic glutathione S-transferase cDNA and the relation of its gene expression to estrogen-receptor content in primary breast cancer. **Prot. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 85: 6518-6522, 1988.

MULDER, T.P.J.; MANNI, J.J.; ROELOFS, H.M.J.; PETERS, W.H.M.; WIERSMA, A. Glutathione-S-transferase and glutathione in head and neck cancer. **Carcinogenesis**, 16: 619-624, 1995.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. **Biotechnology**, 24: 17-27, 1992.

NAIR, U.; BARTSCH, H. Metabolic polymorphisms as susceptibility markers for lung and oral cavity cancer. **IARC Sci Publ.**, 154: 271-290, 2001.

NAKACHI, K.; HAYASHI, S.; KAWAJIRI, K.; IMAI, K. Association of cigarette smoking and CYP1A1 polymorphisms with adenocarcinoma of the lung by grades of differentiation. **Carcinogenesis**, 16: 2209-2213, 1995.

NAKACHI, K.; IMAI, K.; HAYASHI, S.; WATANABE, J.; KAWAJIRI, K. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. **Cancer Res.**, 51: 5177-5180, 1991.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS. Biological markers in environmental health research. **Environ. Health Perspect.**, 74: 3-9, 1987.

NAZAR-STEWART, V.; VAUGHAN, T.L.; STAPLETON, P.; VAN LOO, J.; NICOL-BLADES, B.; EATON, D.L. A population-based study of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 genotypes and risk for lung cancer. **Lung Cancer**, 40: 247-258, 2003.

NEBERT, D.W. Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. **Mutat. Res.**, 247: 267-281, 1991.

NEBERT, D.W.; MCKINNON, R.A.; PUGA, A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. **DNA Cell Biol.**, 15: 273-280, 1996.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M. et al. **Oral & maxillofacial pathology**. 2nd ed. Saunders. Philadelphia, 337-369, 2002.

NEVILLE, B.W.; DAY, T.A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J. Clin.**, 52: 195-215, 2002.

OLSHAN, A.F.; WEISSLER, M.C.; WATSON, M.A.; BELL, D.A. GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 9: 185-191, 2000.

OMENN, G.S. Future research directions in cancer ecogenetics. **Mutat. Res.**, 247: 283-291, 1991.

OPHUIS, M.B.O.; VAN LIESHOUT, E.M.M.; ROELOFS, H.M.J.; PETERS, W.H.M.; MANNI, J.J. Glutathione-S-transferase M1, and T1, and cytochrome P4501A1 polymorphisms in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. **Cancer**, 82: 936-943, 1998.

PANDYA, U.; SRIVASTAVA, S.K.; SINGHAL, S.S.; PAL, A.; AWASTHI, S.; ZIMNIAK, P.; AWASTHI, Y.C.; SINGH, S.V. Activity of allelic variants of Pi class human glutathione S-transferase toward chlorambucil. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 278: 258-262, 2000.

PARK, J.Y.; MUSCAT, J.E.; REN, Q.; SCHANTZ, S.P.; HARWICK, R.D.; STERN, J.C.; PIKE, V.; RICHIE, J.P.JR.; LAZARUS, P. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 6: 791-797, 1997.

PARK, J.Y.; SCHANTZ, S.P.; STERN, J.C.; KAUR, T.; LAZARUS, P. Association between glutathione S-transferase pi genetic polymorphisms and oral cancer risk. **Pharmacogenetics**, 10: 371, 2000.

PERERA, F.P. Environment and cancer: Who are susceptible? **Science**, 278: 1068-1073, 1997.

PERSSON, I.; JOHANSSON, T.; BERGLING, H.; DAHL, M.L.; SEIDEGARD, J.; RYLANDER, R.; RANNUG, A.; HÖBERG, J.; SUNDBERG, M.I. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. **FEBS Lett.**, 319: 207-211, 1993.

PERSSON, I.; JOHANSSON, T.; BERGLING, H.; MARJA-LIISA, D.; SEIDEGARD, J.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1: regulation and toxicological significance. **JOEM**, 7: 25-36, 1995.

PERSSON, I.; JOHANSSON, T.; 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.**, 231: 227-230, 1997.

PHAROAH, P.D.P.; DUNNING, A.M.; PONDER, B.A.J.; EASTON, D.F. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. **Nat. Rev. Cancer**, 4: 850-860, 2004.

RANNUG, H.; ALEXANDRIE, A-K.; PERSSON, I.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic polymorphism of cytochromes p450 1A1, 2D6 and 2E1: Regulation and toxicological significance. **JOEM**, 37: 25-36, 1995.

RAUNIO, H.; HUSGAFVEL-PURSIANEN, H.; ANTILLA, S.; HIETANEN, E.; HIRVONEN, A.; PELKONEN, O. Diagnosis of polymorphism in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility - a review. **Gene**, 159: 113-121, 1995.

RIES, L.A.G.; HANKEY, B.F.; MILLER, B.A. et al. Cancer Statistics Review 1973-1988. National Cancer Institute, **NIH Publication**, 91-2789, 1991.

ROGERS, A.S. The role of cytochrome P450 in developmental pharmacology. **J. Adolescent Health**, 15: 635-640, 1994.

ROSSI, B.M.; PINHO, M. Mutação e Câncer e Oncogenes e Genes Supressores de Tumor: Um Equilíbrio. Em: **Genética e Biologia Molecular para o Cirurgião**. Marina ISBN. São Paulo, 1999.

ROUNTREE, M.R.; BACHMAN, K.E.; HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. **Oncogene**, 20: 3156-3165, 2001.

RYBERG, D.; SKAUG, V.; HEWER, A.; PHILLIPS, D.H.; HARRIES, L.W.; WOLF, C.R.; OGREID, D.; ULVIK, A.; VU, P.; HAUGEN, A. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. **Carcinogenesis**, 18: 1285-1289, 1997.

SATO, M.; SATO, T.; IZUMO, T.; AMAGASA, T. Genetically high susceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined genotyping of CYP1A1 and GSTM1 genes. **Oral Oncol.**, 36: 267-271, 2000.

SAITO, T.; EGASHIRA, M.; KIYOTANI, K.; FUJIEDA, M.; YAMAZAKI, H.; KIYOHARA, C.; KUNITOH, H.; KAMATAKI, T. Novel Nonsynonymous Polymorphisms of the CYP1A1 Gene in Japanese. **Drug Metab. Pharmacokinet.**, 18: 218-221, 2003.

SCHANTZ, S.P.; YU, G.P. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, 128: 268-274, 2002.

SCHNEIDER, J.; BERNGES, U.; PHILIPP, M.; WOITOWITZ, H.J. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphism and lung cancer risk in relation to tobacco smoking. **Cancer Lett.**, 208: 65-74, 2004.

SCULLY, C.; PORTER, S. Oral Cancer. **BMJ**, 321: 97-100, 2000.

SHI, C.Y.; SEOW, A.; LIN, Y.; CHIA, K.S.; ONG, C.N.; CHAN, S.H.; LEE, H.P. Biomarkers: a molecular approach to cancer epidemiology. **Ann. Acad. Med. Singapore**, 25: 49-54, 1996.

SHIELDS, P.G.; CAPORASO, N.F.; FALK, R.T.; SUGIMURA, H.; TRIVERS, G.E.; TRUMP, B.F.; HOOVER, R.N.; WESTON, A.; HARRIS, C.C. Lung cancer, race, and CYP1A1 genetic polymorphism. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 2: 481-485, 1993.

SIDRANSKY, D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. **Science**, 278: 1054-1059, 1997.

SILVERMAN, S.JR. Epidemiology. Em: **Silverman S. Jr. ed. Oral Cancer**. 4th ed. BC Decker Inc. Hamilton, 1-6, 1998.

SILVERMAN, S.JR. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. **J. Am. Dent. Assoc.**, 132: 7S-11S, 2001.

SILVERMAN, S.JR.; GRIFFITH, M. Smoking characteristics of patients with oral carcinoma and the risk for second oral primary carcinoma. **J. Am. Dent. Assoc.**, 85: 637-640, 1972.

SILVERMAN, S.JR.; SHILLITOE, E.F. Etiology and Predisposing Factors. Em: **Silverman S. Jr. ed. Oral Cancer**. 4th ed. BC Decker Inc. Hamilton, 7-24, 1998.

SIVARAMAN, L.; LEATHAM, M.P.; YEE, J.; WILKENS, L.R.; LAU, A.F.; LE MARCHAND, L. CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. **Cancer Res.**, 54: 3692-3695, 1994.

SLAUGHTER, D.P.; SOUTHWICK, H.W.; SMEJKAL, W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. **Cancer**, 6: 963-968, 1953.

SMART, J.; DALY, A.K. Variation in induced CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTM1 polymorphisms. **Pharmacogenetics**, 10: 11-24, 2000.

SPITZ, M.R.; BONDY, M.L. Genetic susceptibility to cancer. **Cancer**, 72: 991-995, 1993.

STRANGE, R.C.; FRYER, A.A. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. Em: **Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer**. IARC Scientific Publications. Lyon, 148: 231-249, 1999.

STUCKER, I.; HIRVONEN, A.; DE WAZIERS, I.; CABELGUENNE, A.; MITRUNEN, K.; CENEE, S.; KOUM-BESSON, E.; HEMON, D.; BEAUNE, P.; LORIOT, M.A. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases as modulators of lung cancer susceptibility. **Carcinogenesis**, 23: 1475-81, 2002.

SUGERMAN, P.B.; SHILLITOE, E.J. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: Evidence for and against a causal relationship. **Oral Dis.**, 3: 130-147, 1997.

SWANGO, P.A. Cancers of the oral cavity and pharynx in the United States: An epidemiologic overview. **J. Public Health Dent.**, 56: 309-318, 1996.

TANINGHER, M.; MALACARNE, D.; IZZOTI, A.; UGOLINI, D.; PARODI, S. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. **Mutat. Res.**, 436: 227-261, 1999.

TEFRÉ, T.; RYBERG, D.; HAUGEN, A.; NEBERT, D.W.; SKAUG, V.; BROGGER, A.; BORRENSEN, A.-L. Human CYP1A1 (cytochrome P1 450) gene: lack of association between the MSP I restriction fragment I polymorphism and incidence of lung cancer in a Norwegian population. **Pharmacogenetics**, 1: 20-25, 1992.

TERRY, K.L.; TITUS-ERNSTOFF, L.; GARNER, E.O.; VITONIS, A.F.; CRAMER, D.W. Interactions between *CYP1A1* polymorphic variants and dietary exposures influencing ovarian cancer risk. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 12: 187-190. 2003.

UMENO, M. MCBRIDE, O.; YANG, C.; GELBOIN, H.; GONZALEZ, F. Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping and Cdna-directed expression. **Biochemistry**, 27: 9006-9013, 1988.

VAN POPPEL, G.; DE VOLGEL, N.; VAN BLADEREN, P.J.; KOK, F.J. Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme mu. **Carcinogenesis**, 13: 303-305, 1992.

VANDEN HEUVEL, J.P.; CLARK, G.C.; THOMPSON, C.L.; MCCOY, Z.; MILLER, C.R.; LUCIER, G.W.; BELL, D.A. *CYP1A1* mRNA levels as a human exposure biomarker: use of quantitative polymerase chain reaction to measure *CYP1A1* expression in human peripheral blood lymphocytes. **Carcinogenesis**, 14: 2003-2006, 1993.

VERMA, R.S.; TRIANTAFILLOU, N.G. Oncogenetic map of human genome. **Cancer Genet. Cytogenet.**, 100: 88-90, 1998.

VINEIS, P. Interactions between genetics and environmental exposures: the example of cancer. **Epid. Prev.**, 19: 79-81, 1995.

VOGELSTEIN, B. E KINZLER, K.W. The multistep nature of cancer. **Trends Genet.**, 9:138-141, 1993.

WALKER, C.L. Cancer susceptibility genes and molecular carcinogenesis. **Mol. Med. Today**, 2: 364-365, 1996.

WARNAKULASURIYA, S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer. **J. Pathol.**, 190: 407-409, 2000.

WEINBERG, R.A. Tumor suppressor genes. **Science**, 254: 1138-1146, 1991.

WEINBERG, R.A. The integrations of molecular genetics into cancer management. **Cancer**, 70: 1653-1658, 1992.

WHYATT, R.M.; GARTE, S.J.; COSMA, G.; BELL, D.A.; JEDRYCHOWSKI, W.; WAHRENDORF, J.; RANDALL, M.C.; COOPER, T.B.; OTTMAN, R.; TANG, D.; ET AL. CYP1A1 messenger RNA levels in placental tissue as a biomarker of environmental exposure. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 4: 147-153, 1995.

WIDERSTEN, M.; PEARSON, W.R.; ENGSTROM, A.; MANNERVIK, B. Heterologous expression of the allelic variant Mu-class glutathione transferases m and y. **Biochem. J.**, 276: 519-524, 1991.

WOGAN, G.N. Molecular epidemiology in cancer risk assessment and prevention: recent progress and avenues for future research. **Environ. Health Perspect.**, 98: 167-178, 1992.

WOLF, C.R. Cytochrome P-450s: polymorphic multigene families involved in carcinogen activation. **TIG**: 209-214, 1986.

WORMHOUDT, L.W.; COMMANDEUR, J.N.M.; VERMEULEN, N.P.E. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. **Crit. Rev. Toxicol.**, 29: 59-124, 1999.

XIE, H.; HOU, L.; SHIELDS, P.G.; WINN D.M.; GRIDLEY, G.; BRAVO-OTERO, E.; DIEHL, S.R.; BOWMAN, E.D.; BROWN, L.M.; HAYES, R.B. Metabolic polymorphisms, smoking, and oral cancer in Puerto Rico. **Oncol. Res.**, 14: 315-320, 2004.

XU, X.; KELSEY, K.T.; WIENCKE, J.K.; WAIN, J.C.; CHRISTIANI, D.C. Cytochrome P450 CYP1A1 MspI polymorphism and lung cancer susceptibility. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.**, 5: 687-692, 1996.

ZAKRZEWSKA, J.M. Fortnightly review: Oral cancer. **BMJ**, 318: 1051-1054, 1999.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO 1 – INFORMAÇÕES AO DOADOR

INFORMAÇÕES AO DOADOR

Nome do projeto de pesquisa: “Investigação do Perfil Genético Molecular de Lesões da Cavidade Oral”.

1. Justificativa e objetivos da pesquisa:

Este estudo tem como principal objetivo estudar algumas características genéticas encontradas em lesões da cavidade oral. Esta pesquisa é muito importante, pois se acredita que haja uma correlação entre as características genéticas que desejamos estudar e o desenvolvimento destas lesões.

O que se chama de “características genéticas”, compreende basicamente o estudo de genes que formam proteínas que nos protegem contra agentes tóxicos às células e que normalmente podem estar presentes em nosso local de trabalho ou em nosso estilo de vida, como por exemplo, cigarro, álcool, defensivos agrícolas, raios-X, metais pesados, etc...

2. Procedimentos a serem utilizados:

Serão recrutados cerca de 100 pacientes portadores de lesões na cavidade oral, os quais serão submetidos aos seguintes procedimentos:

- a) Os doadores responderão a um Questionário Padrão referente ao seu grupo racial, estilo de vida, idade, local de nascimento, hábito tabagista, história familiar de câncer etc... Nesta etapa eles poderão fazer todas as perguntas que acharem necessárias para um perfeito esclarecimento de todas as suas dúvidas.
- b) Um profissional da área de saúde, devidamente treinado, colherá cerca de 10 ml de sangue (punção venosa) com seringa plástica descartável, de cada voluntário, bem como uma amostra do tecido tumoral através de biópsia.
- c) O sangue e o tecido tumoral serão levados ao Laboratório de Genética e Mutagênese da UEL ou do Laboratório de Citogenética Humana da UFPR e serão devidamente processados para a realização deste estudo.
- d) Os resultados serão analisados e correlacionados com hábito de vida, idade, história familiar de câncer e outros fatores da vida de cada doador.
- e) O término deste estudo está previsto para aproximadamente 48 meses.

3. Desconforto e Riscos:

Durante a colheita do sangue e do tecido da lesão o doador poderá sentir desconfortos, ou uma ligeira dor decorrente da picada da agulha no braço ou na região oral, ou ainda, dependendo do estado emocional da pessoa, sentir pânico ao ver seu próprio sangue ou

mesmo uma fobia pela agulha da seringa. Às vezes podem ocorrer sentimentos de desconfiança por parte do doador em relação ao profissional que está retirando o sangue. Quanto aos riscos de se doar sangue, estes são inexistentes, pois todo o material utilizado será descartável, eliminado qualquer possibilidade de contaminação por esta via. Também não há riscos de perda de sangue neste processo.

4. Benefícios esperados:

Não existem benefícios imediatos ao paciente, no entanto espera-se que estudos como este possam contribuir para um melhor entendimento destas lesões. Os pesquisadores envolvidos neste estudo se comprometem em informar ao médico oncologista responsável os resultados obtidos nesta pesquisa e suas implicações ao paciente. O médico, por sua vez, ficará encarregado de passar as informações pertinentes ao paciente.

5. Informações adicionais a respeito deste estudo:

O sangue e o tecido tumoral serão coletados com seringas e agulhas estéreis e descartáveis e serão processados nas dependências da UEL ou da UFPR, em ambiente esterilizado e por profissionais adequados. No entanto, existem diferenças entre as células dos indivíduos em responder às técnicas utilizadas e, portanto, em alguns casos, há a necessidade de se repetir a colheita do material. Caso isto aconteça, o doador poderá ser contatado para uma nova doação de sangue.

6. Confiabilidade do estudo:

Os doadores em hipótese alguma terão sua identidade divulgada para outras pessoas ou entidades, além daquelas que participam efetivamente do estudo. Também serão mantidas em sigilo todas as informações obtidas e que estejam relacionadas com a privacidade do doador.

8.2 ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO

Nome do estudo: “Investigação do perfil genético-molecular de lesões da cavidade oral”.

CONSENTIMENTO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial (exame de sangue e coleta de material da lesão). Fui informado de que não estou correndo nenhum risco ao fazer esta doação.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar neste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual.

Estou ciente de que, ao participar desta pesquisa, meus dados pessoais serão mantidos em sigilo e as amostras que forneci (sangue e lesão) serão devidamente estocadas e farão parte de um banco de DNA nas universidades envolvidas.

Eu, _____, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo com a profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus ou com a Dra. Enilze M. S. F. Ribeiro, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “Informações ao doador”, necessárias para a minha compreensão do estudo.

_____ Data: __/__/__

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus / profa. Dra. Enilze Ribeiro, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador.

_____ Data: __/__/__

Ilce Mara de Syllos Cólus / Enilze M. S. F. Ribeiro

8.3 ANEXO 3 – QUESTIONÁRIO PESSOAL

QUESTIONÁRIO PESSOAL

Por favor, leia as questões seguintes cuidadosamente e responda-as da forma mais completa e precisa possível. A informação que você der não será associada a seu nome em nenhum documento público, e será conhecida somente dos principais pesquisadores deste estudo. As informações que você der podem ter influência direta na interpretação de nossos resultados, portanto, pedimos que coopere gentilmente, fornecendo informações corretas. Obrigado pelo interesse.

1- Iniciais: _____

2- A ser preenchido pelo pesquisador:

Código: _____

Data: ___/___/___

Esta folha deve ser destacada do restante do questionário e preenchida pelo pesquisador. Somente o código será usado como identificação para as páginas subsequentes. Se for necessário espaço adicional para complementar a sua resposta, por favor escreva no verso da página e identifique a parte restante da questão com seu respectivo número.

Código nº _____

HISTÓRIA PESSOAL

- 1- Registro hospitalar: _____
- 2- Sexo: () masculino () feminino
- 3- A qual grupo étnico você pertence ?
 Negro () Caucasiano () Asiático () Indígena () Outros ()
- Idade: _____
- Local de nascimento: Paraná ? () sim () não
- Se não : Que região brasileira ? Norte () Sul () Nordeste () Centro-Oeste ()
 Sudeste ()
- Número de filhos: (i.e. não se incluem aí filhos adotados): a) 0 b) 1 c) 2 d) + de 2
- 6- Sua moradia era na zona rural ou urbana? () Rural () Urbana
- 7- Quanto tempo viveu neste local? _____ anos _____ meses
- 8- No local onde morou por mais tempo qual era o tipo de moradia?
 () casa () apartamento () barraco () cortiço () outra
- 9- A residência onde mora é servida por água encanada? () sim () não
- 10- Qual o seu grau de instrução?
 () analfabeto () 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto
 () 2º grau completo () técnico () profissional () superior
- 11- Qual sua religião? a) () Católico b) () Protestante c) () Outras

Histórico de moradia

- 12- Qual era o tipo de construção onde você morou mais tempo?
 () alvenaria () madeira () barro () mista
- 13- Que tipo de cobertura tinha essa moradia? () telha barro comum () laje
 () folha de zinco () brasilit-eternit () sapé () outro (qual?) _____
- 14- Você poderia me contar se morou a menos de 1 Km de uma destas indústrias por mais de 1 ano?
- | | | |
|-------------------------------|---------|---------|
| Indústria têxtil ou tecelagem | () sim | () não |
| Processamento de madeira | () sim | () não |
| Papel ou celulose | () sim | () não |
| Fábrica de sapatos ou curtume | () sim | () não |

Metalúrgica (cromo/níquel)	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Usina de açúcar ou álcool	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Plástico ou borracha	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Refinaria de petróleo	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não

Histórico de exposição relacionado ou não ao trabalho

15- Você já se expôs a alguma destas substâncias abaixo em seu trabalho?

Se SIM, por quanto tempo e a quanto tempo foi isso: _____

Derivados de petróleo (querosene, gasolina, solventes,...)	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Tintas/ corantes	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Indústrias têxteis ou tecelagem	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Praguicidas / Herbicidas	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Radiação	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Metais pesados (Pb, Ni, Cr,...)	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Processamento de madeira	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Papel ou celulose	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Mineração	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Fábrica de sapatos ou curtume	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Metalúrgica	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Usina de açúcar ou álcool	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Plástico ou borracha	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Outras substâncias químicas:	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não

16- Se SIM para a pergunta acima: Você utilizava equipamentos de proteção individual para trabalhar com essas substâncias químicas ? (máscaras, luvas, óculos,...)

a) sim b) não

29- Durante a sua vida, já consumiu ou consome alguma bebida diariamente por mais de 6 meses continuamente?

a) Sim b) Não

Histórico de Saúde

30- Há cerca de um ano você tem se automedicado com, por exemplo, aspirinas, antiácidos, antihistamínicos, sedativos, ou outras drogas? sim não não sabe

31- Você toma vitaminas frequentemente ou tem tomado nos últimos seis meses?

sim não não sabe

32- Você já operou da garganta (amígdalas)? sim não

33- Você se submeteu a algum Raio-X de cabeça e pescoço recentemente ?

sim não

34- Se SIM, quantos ? a) Menos de 10 vezes b) Mais de 10 vezes

35- Você já teve as seguintes doenças?

Bronquite asmática Pressão alta Diabetes Tuberculose Câncer
(localização do tumor _____)

36- Em casos de câncer na família, qual era o vínculo de parentesco?

Pai Mãe Irmão Filho Tio Primo Outro

37- Qual foi a localização do tumor?

Boca/garganta Pulmão Estômago Intestino Ginecológico Mama
 Outro (qual?) _____

38- Você já teve alguma moléstia venérea?

a) sim b) não

Histórico de Saúde Dentária

39- Você usa/usou dentadura ou aparelho móvel? sim não

40- (Se sim) há quanto tempo? a) 0-5 anos. b) 5 –10 anos. c) mais 10 anos.

41- Esta dentadura já lhe causou alguma ferida na boca? sim não

42- Com que frequência você vai ao dentista? nunca <1/ano >1/ano

43- Você tem algum dente estragado? sim não

44- (Se sim) eles estão lhe machucando? sim não

Histórico alimentar: (refira-se somente a hábitos freqüentes)

- 45- De qual tipo é o fogão da sua casa? () gás () lenha () elétrico () outro
 46- Já residiu em casa com fogão a lenha? () sim () não
 47- Você tem o hábito de ingerir alimentos e bebidas muito quentes ? () sim () não
 48- Você toma chimarrão? () sim () não
 49- Você se alimenta apenas de vegetais? ()sim()não
 50-Você come carne? ()sim ()não
 51-Se SIM, com que freqüência você come estes alimentos:

Dias/Semana

	1-2	3-4	5-6	Diariamente
Carne	()	()	()	()
Peixe	()	()	()	()
Frango	()	()	()	()
Porco	()	()	()	()
Outros	()	()	()	()

Histórico genético

- 52-Para mulheres: você já sofreu algum aborto espontâneo? ()sim ()não
 53-Para ambos os sexos: você possui algum(a) irmão(a) idêntico(a)? ()sim ()não

Incluir informações das amostras do tumor:

Suspeita clínica:

Laudo Histopatológico:
