

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**



**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES *GSTM1*, *GSTT1* E**  
***GSTP1* COM O RISCO E A PROGRESSÃO DO CARCINOMA**  
**ESPINOCELULAR DE VIAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES**

**THIAGO MAGALHÃES DA SILVA**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Maio de 2010**

THIAGO MAGALHÃES DA SILVA

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *GSTM1*, *GSTT1*  
E *GSTP1* COM O RISCO E A PROGRESSÃO DO CARCINOMA  
ESPINOCELULAR DE VIAS AERODISGESTIVAS SUPERIORES**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Biologia Molecular da Universidade Estadual de  
Santa Cruz para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Genética e Biologia  
Molecular

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Maio de 2010**

## DEDICATÓRIA

A todos aqueles que de certa forma contribuíram para que eu atingisse o degrau no qual me encontro agora, dedico essa dissertação. Aos meus sobrinhos queridos, Ícaro, Luana, Milena e Lorena. Aos meus irmãos Lukas, Naadson e Vanessa. Aos meus pais, Tony e Gal, e às minhas amadas tias Quita e Neide. Aos meus sogros, Juscelino e Ivone e às suas filhas lindas que moram em meu coração. À Cintia, minha amada companheira, colega, amiga e namorada.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, a quem serei eternamente grato pelo exemplo de vida e dedicação, sem os quais não poderia encontrar-me aqui a redigir essas palavras. Muito Obrigado!

Aos colegas do LAFEM, em especial Teddy, Jairo, Cinthia, Naty, Milly e Elias, pela convivência, pelas risadas e aprendizado mútuo.

Aos colegas de mestrado, especialmente Guga, Léo, Auta e Pedro, pelo companheirismo e amizade que ajudaram a tornar mais leve essa etapa que se finda agora.

Ao professor Dr. Giuliano di Pietro, pela co-orientação e por se colocar sempre à disposição para ajudar no planejamento e execução dessa pesquisa.

Ao Dr. Marcílio Ferreira Marques Filho, pela co-orientação, pelos esclarecimentos e ajuda fundamentais para a execução desse trabalho.

À Dr. Liane Rossi, pela ajuda dada no recrutamento dos pacientes e pela forma solícita e cordial com que sempre se pôs à disposição para contribuir com o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos funcionários da UNACON, em especial Soraya, Elisa, Sharlene, Rita e Vilma, pela contribuição na coleta dos dados clínicos e das amostras biológicas.

Aos funcionários da CLIONI, especialmente às meninas da enfermagem e a Taciana, pela ajuda na pesquisa de prontuários, recrutamento dos pacientes e coleta das amostras biológicas.

Ao Dr. Ari Paranhos, por se colocar à inteira disposição para ajudar no recrutamento dos pacientes do grupo controle.

Ao meu orientador, Dr. Fabrício Rios Santos, pela oportunidade e aprendizagem proporcionadas, pelos conselhos, esclarecimentos e *insights* fundamentais para a execução da presente pesquisa e pela confiança em mim depositada.

À Cintia, minha Cintia, por estar sempre ao meu lado, literalmente, sendo minha fiel e amada companheira na vida e na bancada! Te amo!

A todos os professores do programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UESC que contribuíram para o meu aperfeiçoamento profissional ao longo desse período.

A todos os pacientes arrolados nessa pesquisa, que de forma voluntária e despretensiosa deram uma contribuição inefável à produção do conhecimento aqui apresentado, e aos quais esperamos poder retribuir, num futuro não muito longínquo e imbuídos do mesmo espírito, com a melhora do problema de saúde objeto desse estudo.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

## EPÍGRAFE

“O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto”.

(Thomas Huxley)

da SILVA, Thiago Magalhães, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Maio 2010. **Associação de polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* com o risco e a progressão do carcinoma espinocelular de vias aerodigestivas superiores.** Orientador: Fabrício Rios Santos. Co-orientador: Giuliano Di Pietro.

## EXTRATO

A caracterização de polimorfismos que afetam a atividade de enzimas envolvidas na metabolização de carcinógenos constitui um dos alvos mais promissores para a investigação da susceptibilidade genética ao carcinoma das vias aerodigestivas superiores (HNSCC). No presente trabalho, objetivou-se avaliar a associação de polimorfismos nos genes candidatos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* com o risco de desenvolvimento e a progressão dessa neoplasia maligna. Foi conduzido um estudo caso-controle que incluiu 116 casos com diagnóstico anatomopatológico confirmado de HNSCC e 224 controles saudáveis, pareados por sexo, idade e cor da pele autodeclarada, os quais foram genotipados para os principais polimorfismos descritos para esses genes por meio de métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR). O polimorfismo de deleção completa do gene *GSTT1* foi associado como um fator de proteção para o HNSCC (OR: 0,5; IC 95%: 0,27 – 0,93), embora tal associação não tenha sido confirmada após ajustes para sexo, idade, tabagismo, etilismo e cor da pele autodeclarada através da aplicação de um modelo de regressão logística multivariada (OR: 0,61; IC 95%: 0,29 - 1,28). Diferenças estatísticas não foram verificadas para as frequências dos polimorfismos dos demais genes entre casos e controles. Considerando um modelo multigênico de doença, os grupos genotípicos de maior risco resultantes da combinação entre *GSTT1* e

*GSTM1* (*GSTT1* positivo/*GSTM1* nulo) e entre *GSTT1* e *GSTP1* (*GSTT1* positivo/*Ile/Val* ou *Val/Val*) foram significativamente mais frequentes entre os casos comparativamente aos controles (OR: 2,54; IC 95%: 1,06 – 6,05 e OR : 4,54; IC 95%: 1,13 – 15,87, respectivamente). Além disso, um efeito modificador do risco de HNSCC pelo genótipo *GSTT1* nulo foi observado para a classe de fumantes moderados (pack-years  $\leq 20$ ), não sendo verificada nenhuma outra interação significativa entre os genótipos de *GSTs* e o consumo de cigarros. O alelo mutante de *GSTP1* (105Val) foi marginalmente associado ao risco de metástases para linfonodos regionais (OR: 2,23; IC 95%: 0,94 – 5,30), tendência que foi mantida quando a análise considerou apenas os casos de câncer oral (OR: 3,02; IC 95%: 0,93 – 9,82). Nenhuma outra associação foi verificada entre os genótipos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* e os demais parâmetros clinicopatológicos avaliados. Em conclusão, os polimorfismos dos genes *GSTs* aqui descritos foram associados à susceptibilidade ao HNSCC dentro de um modelo multigênico de doença. O genótipo *GSTT1* nulo apresentou-se como um fator de proteção independente para essa enfermidade, principalmente entre fumantes leves.

**Palavras-chave:** metabolização de carcinógenos, polimorfismos, Glutathione S-transferase, carcinoma espinocelular de vias aéreas superiores



da SILVA, Thiago Magalhães, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Maio 2010. **Associação de polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* com o risco e a progressão do carcinoma espinocelular de vias aerodigestivas superiores.** Advisor: Fabrício Rios Santos. Co-advisor: Giuliano DiPietro.

## ABSTRACT

The glutathione-S-transferase (*GST*) genes are involved in the detoxification of various carcinogens that increase the risk to upper aerodigestive tract or head and neck squamous cell carcinoma cancers (HNSCC). A case-control study was undertaken to evaluate the role of the genetic polymorphism *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* genes as molecular biomarkers of HNSCC susceptibility. In the present study, 116 unrelated histopathologically confirmed cases and 224 controls, matched by age, skin color and gender, were genotyped for polymorphisms in *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* using polymerase chain reaction (PCR) based methods. The *GSTT1* null genotype was an protective factor for HNSCC (OR: 0,5; IC 95%: 0,27 – 0,93) though the risk was not found to be significant when adjusted for age, sex, smoking, skin color, and alcohol use by multivariate logistic regression model (OR: 0,61; IC 95%: 0,29 - 1,28). No statistically significant association was observed for *GSTM1* and *GSTP1* polymorphisms. The frequencies higher-risk genotypes of *GST* combinations (*GSTT1* positive/*GSTM1* null and *GSTT1* positive/*GSTP1* Ile/Val or Val/Val) between controls and patients were significantly different. A significant interaction was observed among light smokers ( $\leq 20$  pack-year) carrying *GSTT1* null genotype. There was no evidence of gene–environment interaction related to smoking for others *GST* genotypes. The presence of *GSTP1* polymorphic genotype resulted in a borderline risk associated with lymph node involvement in the HNSCC and oral

cancer cases. In conclusion, *GSTT1* null genotype was an independent protective factor for HNSCC, particularly for light smokers, and significant gene–gene interactions of *GST* genes may confer a substantial risk to these disease.

**Key-words:** carcinogens metabolism, polymorphisms, Glutathione S-transferases, upper aerodigestive tract cancers

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Anatomia das vias aerodigestivas superiores.....	2
<b>Figura 2-</b> Biotransformação de carcinógenos.....	4
<b>Figura 3-</b> PCR-Multiplex para os genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> .....	11
<b>Figura 4-</b> PCR-RFLP para o gene <i>GSTP1</i> .....	12

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> <i>Primers</i> utilizados para genotipagem dos genes <i>GSTs</i> .....	13
<b>Tabela 2-</b> Características demográficas e de hábitos de vida entre casos e controles.....	15
<b>Tabela 3-</b> Consumo de cigarros (em pack-years) entre casos e controles e associação com o risco de HNSCC.....	16
<b>Tabela 4-</b> Distribuição dos genótipos dos genes <i>GSTs</i> entre casos e controles e associação com o risco de HNSCC.....	17
<b>Tabela 5-</b> Associação entre o polimorfismo Ile105Val de <i>GSTP1</i> e os parâmetros clinicopatológicos no câncer oral.....	18
<b>Tabela 6-</b> Genótipos combinados dos genes <i>GSTs</i> entre casos e controles e risco associado de HNSCC.....	19
<b>Tabela 7-</b> Interações gene-ambiente entre os genótipos de <i>GSTs</i> e o tabagismo na modificação do risco de HNSCC.....	21
<b>Tabela 8-</b> Polimorfismos de <i>GSTs</i> e associação com os parâmetros clínicos no HNSCC.....	22

## LISTA DE SIGLAS

IC Intervalo de Confiança

CEC Carcinoma Espinocelular

G1 (Grau 1) Carcinoma Espinocelular Bem Diferenciado

G2 (Grau 2) Carcinoma Espinocelular Moderadamente Diferenciado

G3 (Grau 3) Carcinoma Espinocelular Pouco Diferenciado

GST Glutathione S-Transferase

GSTM1 Glutathione S-Transferase M1

GSTP1 Glutathione S-Transferase P1

GSTT1 Glutathione S-Transferase Teta1

HNSCC Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço)

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INCA Instituto Nacional do Câncer

OR Odds ratio (Razão de chances)

p Probabilidade

pb Pares de Bases

PCR Reação de Polimerase em Cadeia

SNP Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de nucleotídeo simples)

T (T1, T2, T3 e T4) Tamanho do tumor

UICC União Internacional Contra o Câncer

## ÍNDICE

<b>EXTRATO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1- REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	1
<b>1.1 Carcinoma Espinocelular de Vias Aerodigestivas Superiores (HNSCC)</b> .....	1
<b>1.2 Estudos de associação genética como ferramenta na pesquisa de <i>loci</i> de susceptibilidade para o HNSCC</b> .....	3
<b>1.3 Glutationas S-transferases (GST's)</b> .....	6
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	8
<b>3- METODOLOGIA</b> .....	9
<b>3.1 Sujeitos de Pesquisa</b> .....	9
<b>3.2 Delineamento de Estudo</b> .....	10
<b>3.3 Extração de DNA</b> .....	10
<b>3.4 Genotipagem dos Genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i></b> .....	10
<b>3.5 Genotipagem do gene <i>GSTP1</i> por PCR-RFLP</b> .....	11
<b>3.6 Análise estatística</b> .....	13
<b>4- RESULTADOS</b> .....	14
<b>5- DISCUSSÃO</b> .....	23
<b>6- CONCLUSÕES</b> .....	35
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	36
<b>ANEXO 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> .....	49

<b>ANEXO 2. Questionário Sócio-Econômico.....</b>	<b>50</b>
---	-----------



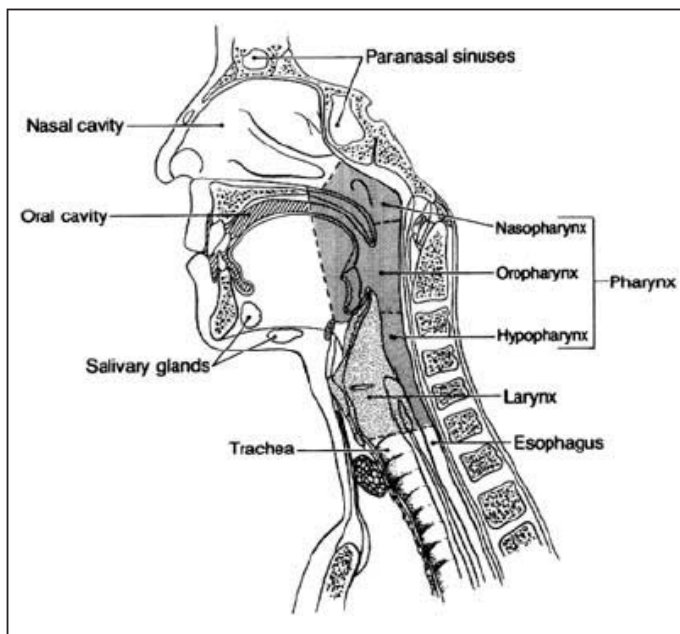
## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Carcinoma Espinocelular de Vias Aerodigestivas Superiores (HNSCC)

O carcinoma de vias aerodigestivas superiores, ou de cabeça e pescoço, é a oitava causa mais comum de morte por câncer no mundo, sendo responsável por 5% de todos os novos cânceres diagnosticados (Choong e Vokes, 2008). Cerca de dois terços de todos os casos desse tipo de câncer ocorre em homens, embora o aumento dos hábitos de tabagismo e etilismo entre as mulheres venha contribuindo para reduzir essa diferença de incidência entre sexos (McMahon e Chen, 2003; Parkin *et al.*, 2005; Pollock *et al.*, 2006). Esse tipo de carcinoma engloba uma ampla variedade de neoplasias malignas que têm origem na mucosa do segmento aerodigestivo superior. O tipo histológico mais comum é o carcinoma de células escamosas ou espinocelular, designado pela sigla HNSCC (do inglês Head and Neck Squamous Cell Carcinoma), que responde por mais de 90% de todos os casos (Biselli *et al.*, 2006). O trato aerodigestivo superior é dividido anatomicamente em várias regiões definidas, denominadas de cavidade nasal e seios paranasais, cavidade oral, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe e laringe (figura 1). Independentemente do sítio primário de acometimento, esses tumores tendem a compartilhar etiologia, patogênese, história natural e resposta a terapia semelhantes, o que permite classificá-los como uma única entidade biológica (Boyer *et al.*, 2000).

Os principais fatores etiológicos envolvidos no desenvolvimento desse tipo de câncer são o tabagismo e o etilismo, com a exposição simultânea a essas duas variáveis conferindo uma elevação do risco da ordem de 20 vezes em relação aos indivíduos não expostos (McMahon e Chen, 2003). Além disso, uma dieta pobre em certas vitaminas e elementos, a exemplo das vitaminas A, E, C, ferro, riboflavina e iodo, e rica em nitrosaminas já foi implicada como um fator de risco para a

ocorrência dessas neoplasias (Boccia *et al.*, 2008; Scully e Bedi, 2000). Má higiene oral e condições inflamatórias crônicas da mucosa também podem ser fatores etiológicos importantes no câncer oral (Pollock *et al.*, 2006).



**Figura 1 - Anatomia das vias aerodigestivas superiores. Modificado de Choong & Vokes (2007).**

O papiloma vírus humano (HPV) tem sido encontrado em cerca de 26% dos casos de HNSCC, existindo uma maior prevalência de infecção nos tumores de orofaringe comparativamente aos de cavidade oral e laringe. O subtipo H16 está presente na grande maioria dos tumores de vias aerodigestivas superiores HPV positivos, mas a causalidade direta atribuível a esse agente infeccioso ainda não foi confirmada (Kreimer *et al.*, 2005). Já o vírus Epstein Barr (EBV) tem sido associado ao desenvolvimento de carcinoma nasofaríngeo em regiões endêmicas do sudeste asiático, com 90% dos portadores desse tipo de tumor apresentando um nível sérico elevado de imunoglobulina A contra o antígeno do capsídeo viral do EBV, o que é aplicado como um marcador útil na detecção precoce dessa neoplasia (Pollock *et al.*, 2006).

A incidência de HNSCC varia extensamente entre as diferentes regiões do mundo, representando 3% a 4% de todos os cânceres diagnosticados na América do Norte e União Européia, e de 8% a 10% de todos os casos de câncer detectados na África e Sudeste Asiático (Parkin *et al.*, 2005). No Brasil, segundo estimativas do

Instituto Nacional do Câncer (INCA), os cânceres orais, que representam a forma mais frequente de HNSCC diagnosticados no país (Gattas *et al.*, 2006) , devem corresponder a cerca de 3% de todos os casos registrados no ano de 2010 (INCA, 2010). Além disso, nas previsões de incidência de câncer oral por região geográfica considerando apenas homens (73% de todos os novos casos previstos), percebe-se que a estimativa é maior nas regiões sul e sudeste (13,79 e 14,20 novos casos por 100 mil homens, respectivamente) e menor na região norte do país (3,11 casos por 100 mil homens), enquanto que valores intermediários de incidência são esperados para as regiões nordeste e centro-oeste (6,56 e 7,83 novos casos por 100 mil homens, respectivamente). Esses dados sugerem que diferenças étnico-culturais, alimentares e de hábitos de vida, além de fatores de predisposição genética, possam influenciar a distribuição da incidência desse tipo de neoplasia maligna entre populações humanas distintas. Nesse contexto, duas regiões do mundo são ilustrativas. Na Índia, a prática do tabagismo invertido, isto é, fumar com a extremidade acessa do cigarro na cavidade oral, e o hábito de mascar a noz de areca (betel) estão associados a uma maior incidência de cânceres da cavidade oral (Boyer *et al.*, 2000). Observa-se também uma alta incidência de fibrose submucosa da cavidade oral na população indiana em geral, lesão considerada pré-maligna e que está relacionada ao costume de mascar noz de areca (Pollock *et al.*, 2006). O sudeste asiático, por sua vez, é considerado uma área endêmica para o carcinoma nasofaríngeo, o qual apresenta uma maior prevalência que a observada em outros grupos étnicos, a exemplo de africanos e caucasóides. Infecções pelo vírus Epstein Barr, assim como o consumo de peixes em salmoura e produtos vegetais preservados, além do próprio *background* genético da população, são apontados como prováveis causas do aumento da prevalência desse tipo de carcinoma naquela região (Parkin *et al.*, 2005).

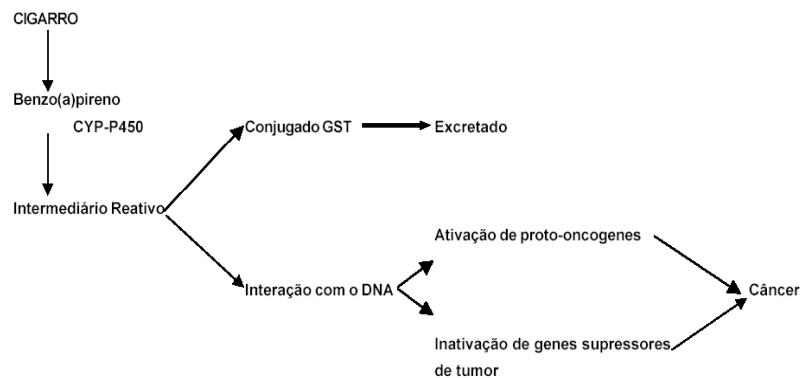
## **1.2. Estudos de associação genética como ferramenta na pesquisa de *loci* de susceptibilidade para o HNSCC**

Embora o consumo de tabaco e de álcool sejam os principais fatores de risco para o HNSCC, algumas observações de estudos epidemiológicos sugerem que fatores genéticos do hospedeiro desempenham um papel relevante na modulação da susceptibilidade a esse tipo de neoplasia maligna (Tae *et al.*, 2004). A principal

delas é a de que apenas 20% dos fumantes vêm a desenvolver câncer de pulmão, bexiga ou de vias aerodigestivas superiores (Hirvonen, 1995). Isso indica que o consumo de cigarros, em vez de causa necessária ou suficiente para esses tipos de cânceres, atua como um componente de um complexo causal do qual participam outros fatores de risco ambientais e/ou genéticos (Vineis e Martone, 1995).

A avaliação do papel de fatores genéticos do hospedeiro na etiologia de doenças complexas baseia-se geralmente na abordagem do gene candidato, na qual são pesquisados polimorfismos em *loci* que conhecidamente ou putativamente afetam a expressão do fenótipo de doença (Rothman e Greenland, 1998).

A maioria dos compostos genotóxicos que causam tumores em seres humanos, como os presentes na fumaça do cigarro e em poluentes ambientais, precisam ser bioativados para exercerem suas ações carcinogênicas, o que em geral se dá a partir de reações de oxirredução catalisadas por enzimas de fase I, a exemplo das citocromos P450 (Lázarus e Park, 2000). Os produtos eletrofílicos que são gerados nessas reações podem seguir dois caminhos dentro da célula: reagir com centros nucleofílicos, dentre eles regiões do DNA, levando à formação de adutos; ou sofrerem detoxificação via enzimas de fase II, como as Glutathione S-transferases (GSTs) e a N-acetiltransferase 2 (NAT2), com posterior excreção (Guan *et al.*, 2006). Os adutos que se formam em regiões de genes que estimulam (proto-oncogenes) ou inibem (genes supressores de tumor) a proliferação celular, caso não sejam devidamente reparados pela célula, podem levar ao ganho ou à perda de função desses genes, determinado o início de um processo neoplásico (Geisler e Olshan 2001)( figura 2).



**Figura 2- Biotransformação de carcinógenos. No esquema, o benzo(a)pireno, que é um dos compostos carcinogênicos presentes na fumaça do cigarro, é tomado como modelo.**

Uma considerável variação interindividual na susceptibilidade a carcinógenos é reconhecida em humanos, resultando em parte de polimorfismos que alteram a atividade dessas enzimas metabolizadoras (Ketelslegers *et al.*, 2006). De fato, uma quantidade significativamente maior de adutos no DNA induzidos por compostos carcinogênicos foi observada entre indivíduos portadores de certos alelos polimórficos de *GSTs* comparativamente às suas contrapartes selvagens (Ryberg *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 2000; Ludovici *et al.*, 2004;). Por esse motivo, genes que atuam em vias de ativação e detoxificação de xenobióticos são apontados como potenciais candidatos na modulação do risco de HNSCC, uma vez que a extensão da exposição e dano das células do trato aerodigestivo superior pela ação de carcinógenos pode depender do balanço entre as atividades das enzimas por eles codificadas (Hashibe *et al.*, 2003). Uma das evidências que sugerem o envolvimento dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* como possíveis modificadores de risco para o carcinoma de vias aerodigestivas superiores é a sua participação em vias de detoxificação de diversos compostos carcinogênicos presentes na fumaça do cigarro, a exemplo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH's) e nitrosaminas (Geisler e Olshan, 2001). A observação de que esses genes são expressos na mucosa escamosa que reveste as vias aerodigestivas superiores constitui mais um indício da possível implicação desses *loci* na susceptibilidade a esse tipo de neoplasia maligna (Parise *et al.*, 1994; Mulder *et al.*, 1995; Chen e Lin, 1997).

A distribuição frequências de muitas das variantes alélicas de genes de metabolização de xenobióticos são étnico-dependentes, o que pode introduzir um viés de análise caso não sejam selecionados grupos de comparação apropriados (Cardon e Palmer, 2003). Em outras palavras, um malpareamento entre casos e controles para etnia ou graus de ancestralidade pode levar a resultados espúrios, uma vez que qualquer alelo que seja mais frequente em um grupo étnico específico será associado como fator de risco ou de proteção para um desfecho particular caso o referido grupo étnico seja majoritariamente representado entre os casos ou controles, respectivamente (Pritchard e Rosenberg, 1999). Um exemplo clássico dessa situação é o estudo de associação entre diabetes melitus tipo 2 e o haplótipo Gm3;5;13;14 de HLA entre índios da etnia Pima-Papago com graus variados de miscigenação com caucasóides europeus (Knowler *et al.*, 1988). Nesse estudo o haplótipo candidato foi menos frequente entre os indivíduos portadores da doença.

Esse resultado se deveu ao fato de que a prevalência de diabetes tipo 2 é maior nos indivíduos com ancestralidade indígena predominante, enquanto que a frequência do haplótipo em questão é significativamente menor nesse grupo comparativamente aos indivíduos com ascendência majoritariamente européia. Como consequência, houve uma maior representação de indivíduos com ancestralidade indígena nos casos relativamente aos controles. Na análise estratificada por graus de ancestralidade indígena essa associação deixou de existir.

### 1.3. Glutathionas S-transferases (GSTs)

As Glutathionas S-Transferases (GSTs) são uma super-família de enzimas que estão envolvidas na detoxificação de metabólitos reativos carcinogênicos, drogas terapêuticas e produtos gerados do estresse oxidativo (Board *et al.*, 2000), e por isso, podem ser importantes na modulação da susceptibilidade ao câncer (McCarty *et al.*, 2007). Seis famílias polimórficas de GSTs solúveis citosólicas foram identificadas em humanos, sendo a *alfa* (GSTA) no cromossomo 6, a *mi* (GSTM) no cromossomo 1, a *teta* (GSTT) no cromossomo 22 e a *pi* (GSTP) no cromossomo 11 (Mitrunen *et al.*, 2001; Strange *et al.*, 2001), e recentemente as famílias *zeta* (GSTZ) e *omega* (GSTO) (Sampayo-Reyes e Zakharyan, 2006). Cinco genes da classe *mi* estão situados em tandem (5'- GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3 - 3') em um grupo de 20Kb na região 1p13.3 (Pearson *et al.*, 1993). Para o gene GSTM1 quatro alelos distintos são reconhecidos, a saber: GSTM1\*A, GSTM1\*B, GSTM1\*0 e GSTM1x2. O alelo GSTM1\*A é considerado o tipo selvagem, enquanto que o GSTM1\*B resulta de uma transversoão G→C no códon 173, levando à substituição de uma lisina por uma asparagina na cadeia aminoacídica. O alelo GSTM1x2 consiste de uma duplicação gênica que leva a uma super-expressão de GSTM1, enquanto que GSTM1\*0 é um alelo nulo que resulta de uma deleção completa do gene GSTM1 (Hayes *et al.*, 2005) e que tem sido implicado no aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias malignas (Schnakenberg *et al.*, 2007). Os indivíduos que são homozigotos para este alelo são incapazes de produzir a proteína GSTM1. Devido à alta frequência (16 a 60%) do genótipo GSTM1 nulo na maioria das populações analisadas, a distribuição alélica deste gene tem sido amplamente estudada e varia entre os grupos étnicos distintos (Garte *et al.*, 2001).

Um outro gene, da família *teta* (*GSTT1*), localizado no cromossomo 22 (Coggan *et al.*, 1998), é também polimórfico e apresenta dois alelos: o alelo ativo *GSTT1\*1* e o alelo nulo *GSTT1\*0*. O *GSTT1* nulo é um alelo não-funcional resultante da deleção completa do gene *GSTT1*, sendo que os indivíduos homocigotos para o alelo *GSTT1* nulo são incapazes de produzir a proteína *GSTT1* (Pemble *et al.*, 1994). O genótipo homocigoto nulo de *GSTT1* foi descrito em diferentes populações e também mostra uma ampla variação entre grupos étnicos distintos (Nelson *et al.*, 1995).

Três diferentes alelos de *GSTP1* foram descritos, sendo estes denominados *GSTP1\*A*, que é o alelo selvagem, *GSTP1\*B* e *GSTP1\*C*. A variante *GSTP1\*B* é um polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) resultante de uma transição A→G no nucleotídeo +313 do éxon 5, mudando o códon 105 de ATC (Ile) para GTC (Val) (Board *et al.*, 1990). 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 eletrofílicos 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 (Zimniak *et al.*, 1994; Johansson *et al.*, 1998).

Nesse sentido, é possível postular uma interação entre diferentes polimorfismos de *GSTs* e variáveis de exposição ambiental como moduladores da suscetibilidade ao desenvolvimento dos carcinomas de vias aerodigestivas superiores. Por esse motivo, no presente estudo foi investigada a associação entre polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* e o risco de HNSCC, além de potenciais interações gene-gene e gene-ambiente.

## 2. OBJETIVOS

### **Geral:**

- Analisar a associação de polimorfismos nos genes candidatos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* com o risco de desenvolvimento de carcinoma espinocelular de vias aerodigestivas superiores;

### **Específicos:**

- Avaliar a existência de potenciais interações gene-gene e gene-ambiente (particularmente com relação ao tabagismo) e suas implicações na modulação do risco de HNSCC;
- Avaliar a influência dos genes *GSTs* na progressão clínica do HNSCC, através da análise de associação entre os polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* e diferentes parâmetros clinicopatológicos de doença (estadio clínico, tamanho do tumor, grau histológico do tumor e ocorrência de metástases para linfonodos regionais).



### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Sujeitos de Pesquisa**

Os sujeitos de pesquisa do grupo caso foram recrutados na Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON) da Santa Casa de Misericórdia Itabuna, como também na Clínica Oncológica de Ilhéus (CLIONI), localizada no município de Ilhéus, BA no período de fevereiro de 2008 a agosto de 2009. Foram selecionados apenas pacientes com idade igual ou superior a 18 anos e que tiveram diagnóstico anatomopatológico confirmado para carcinoma espinocelular de vias aerodigestivas superiores. Controles saudáveis (n=67) foram recrutados no Banco de Sangue de Ilhéus e em laboratórios de anatomia patológica situados no município de Itabuna durante realização de exames de rotina não relacionados a câncer. Controles de base populacional (n=157) foram convocados durante a realização de eventos públicos promovidos pela secretaria de saúde do município de Itabuna. Os critérios de elegibilidade dos controles foram idade igual ou superior a 18 anos e ausência de história prévia de neoplasias malignas. Tanto os casos quanto os controles foram devidamente informados acerca da natureza e objetivos da pesquisa, sendo obtido por escrito o consentimento dos mesmos por meio da assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1). Informações relativas a sexo, idade, cor da pele autodeclarada, tabagismo, etilismo e hábitos alimentares foram obtidas através de um questionário sócio-econômico aplicado a ambos os grupos (Anexo 2). Dados referentes ao estadiamento clínico e ao grau histológico do tumor (apenas para os casos) foram obtidos por meio de pesquisa nos laudos médicos anexados aos prontuários dos pacientes. De cada sujeito arrolado no estudo foi colhido cerca de 3mL de sangue periférico para posterior extração de DNA. Tanto o TCLE quanto o questionário sócio-econômico foram previamente aprovados pelos

comitês de ética da Universidade Estadual de Santa Cruz e das unidades de saúde envolvidas nesse estudo.

### **3.2. Delineamento de Estudo**

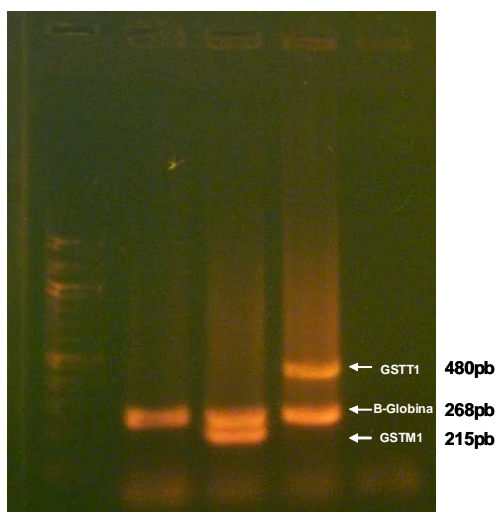
Foi conduzido um estudo caso-controle envolvendo 116 pacientes com diagnóstico confirmado de carcinoma espinocelular de vias aerodigestivas superiores e 224 controles saudáveis pareados por sexo, idade e cor da pele auto-declarada. Com relação ao tabagismo, foram obtidas informações da quantidade de cigarros fumados por dia e da duração do hábito (em anos). Foram considerados como sempre fumantes indivíduos que relataram consumir pelo menos um cigarro por dia durante o período mínimo de um ano, e como nunca fumantes aqueles não enquadrados nesse critério. Cálculos de pack-years foram realizados multiplicando-se o número de maços de cigarro consumidos por dia pelo tempo total de exposição em anos (1 pack-year equivale ao consumo de um maço de cigarros por dia durante o período de um ano). De acordo com esse critério, casos e controles foram categorizados em nunca fumantes (pack-year = 0), fumantes moderados (pack-year  $\leq$  20), e fumantes pesados (pack-year  $>$  20). Indivíduos foram classificados com relação ao consumo de álcool como nunca etilistas ou sempre etilistas (definidos como aqueles indivíduos que relataram ingerir bebidas alcoólicas com uma frequência igual ou superior a duas vezes na semana e por um período mínimo de um ano).

### **3.3. Extração de DNA**

Após a coleta de 3mL de sangue por punção venosa, o material biológico foi devidamente identificado e transportado para o Laboratório de Farmacogeômica e Epidemiologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, onde se procedeu a extração de DNA no período de até 72 horas. Os reagentes e protocolo utilizados foram obtidos do Kit Quiagen Flexigene®. Após a extração, o DNA foi armazenado em “freezer” a  $-20^{\circ}$  C.

### **3.4. Genotipagem dos Genes *GSTM1* e *GSTT1***

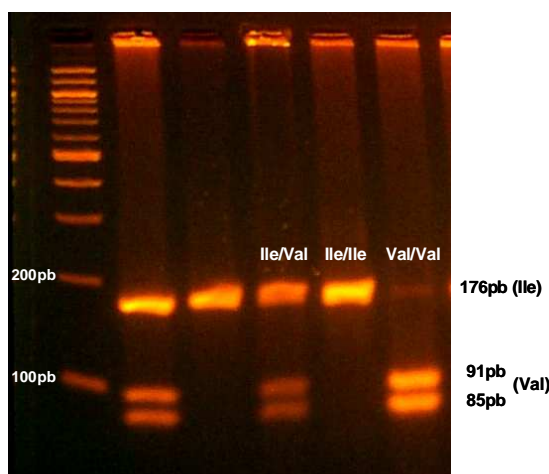
Os genes *GSTM1* e *GSTT1* foram amplificados em uma reação de PCR multiplex utilizando o gene da  $\beta$ -globina como controle interno da reação (Gattás *et al.*, 2004). Foi utilizado aproximadamente 100ng de DNA genômico em 25uL de reação final contendo Tris-HCl 10mM pH 8,3, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, dNTP, 1,25U de TaqDNA-polimerase e 10pmol dos respectivos primers (tabela 1). A mistura foi submetida a 95°C /5min para desnaturação inicial do DNA, seguido por 30 ciclos de 95°C/30seg., 60°C/1min., 72°C/1min., e concluído com um ciclo de extensão final a 72°C/10min. Cerca de 10 uL do produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Gel Red® ou Brometo de Etídeo, por 1 hora e 20 minutos a 95VOLT. Após a corrida, fotos digitalizadas foram obtidas através de sistema digital de armazenamento (EDAS 290, Kodak: cat. No.8486045). Os genótipos nulos (ambos os alelos com deleção) para os genes *GSTT1* e *GSTM1* foram identificados pela ausência dos fragmentos de amplificação de 480 pares de base (pb) e 215 pb, respectivamente (figura 3). A presença do fragmento de 268 pb corresponde à seqüência amplificada do gene  $\beta$ -globina e revela o sucesso da reação de amplificação.



**Figura 3-** PCR-Multiplex para os genes *GSTM1* e *GSTT1*. Primeira coluna (da esquerda para a direita): marcador de pares de bases (100pb). Indivíduos com genótipo nulo para os dois genes, *GSTT1* nulo e *GSTM1* nulo são ilustrados nas colunas 2, 3 e 4, respectivamente.

### 3.5. Genotipagem do gene *GSTP1* por PCR-RFLP

A reação de amplificação por PCR e a genotipagem do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) BsmI do gene *GSTP1* foi realizada de acordo com Leichsenring *et al.* (2006). Para um volume final de 25 µl de reação, foi utilizado tampão 10X (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4); MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; dNTPs 2 mM; 1,25 U de AmpliTaq DNA polimerase, cerca de 100ng de DNA genômico e 10pmol de cada primer (tabela 1). O ciclo de amplificação foi: 95°C/5min, seguido de 30 ciclos de 57°C/30s, 72°C/30s e 94°C/30s, com um ciclo final de extensão a 72°C/5min. Após a reação de amplificação, 20 µl do produto da PCR foram digeridos com 1U da enzima BsmI, a 55°C/6h. Os produtos de digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 3,0% submetido à eletroforese a 95V por 1 hora e 30 minutos. A ação da enzima BsmI pode gerar três produtos de digestão distintos como resultado (figura 4): um produto constante de 176 pb, referente ao genótipo homocigoto para o alelo selvagem (Ile/Ile), o qual não sofre ação da enzima BsmI, 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 BsmI, a qual cliva o produto inicial de 176 pb nesses dois fragmentos; e um produto com três bandas de 176, 91 e 85 pb, caso o genótipo seja heterocigoto (Ile/Val).



**Figura 4-** PCR-RFLP do gene *GSTP1*. Primeira coluna (da esquerda para a direita): marcador de pares de bases (100pb). Os genótipos heterocigoto (Ile/Val), homocigoto selvagem (Ile/Ile) e homocigoto mutante (Val/Val) para o polimorfismo Ile105Val de *GSTP1* são demonstrados nas colunas 4, 5 e 6, respectivamente.

**Tabela 1- Primers utilizados para genotipagem dos genes GSTs.**

Gene	Primer F	Primer R
<i>GSTM1</i>	5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'	5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'
<i>GSTT1</i>	5'-TCTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'	5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
<i>B-Globina</i>	5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'
<i>GSTP1</i>	5'-ACCCCAGGGCTCTATGGGAA-3'	5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3'

### 3.6. Análise estatística

Para avaliar diferenças de frequências genotípicas e alélicas entre casos e controles foram realizados testes de homogeneidade usando a estatística de  $\chi^2$ . O Teste Exato de Fisher foi aplicado com a mesma finalidade quando o valor esperado para uma das células da tabela de contingência foi inferior a 5. Cálculos de *Odds Ratio* (OR) com os respectivos intervalos de confiança de 95% (CI 95) foram obtidos para estimar o risco de HNSCC associado aos diferentes fatores de exposição genéticos e ambientais estudados. Um modelo de regressão logística condicional foi aplicado para avaliar o risco de HNSCC atribuído aos polimorfismos de *GSTs* após ajustes para sexo, cor da pele, idade, tabagismo e etilismo. Testes de independência entre polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* e variáveis clinicopatológicas (estadiamento, grau histológico, tamanho do tumor e presença de linfonodos positivos) foram conduzidos para a coorte dos casos através de  $\chi^2$  e do Teste Exato de Fisher, quando necessário. As frequências genotípicas observadas para o gene *GSTP1* foram testadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) entre casos e controles. Análises de interação gene – ambiente foram conduzidas a partir de variáveis estratificadas (genótipo x tabagismo) que foram introduzidas em modelos de regressão logística com outras variáveis selecionadas. Para testar a significância das interações observadas aplicou-se um teste de razão de verossimilhanças usando a distribuição de  $\chi^2$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas com o pacote estatístico SPSS versão 10.0 (SPSS, Chicago, Illinois) adotando-se um nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

As características gerais dos casos e controles são sumarizadas na tabela 2. A média de idade dos casos foi ligeiramente maior que a dos controles ( $60,8 \pm 12,5$  vs  $58,2 \pm 11,9$ , respectivamente) embora tal diferença não tenha sido significativa ( $p=0,053$ ). Com relação ao sexo e à cor da pele autodeclarada, as freqüências foram as mesmas entre casos e controles. A freqüência de tabagistas e etilistas foi significativamente maior entre os casos do que nos controles. Aqueles classificados como sempre fumantes tiveram uma chance de HNSCC 19,9 vezes maior em relação aos nunca fumantes (95% CI: 8,39 – 47,18,  $p<0,001$ ). Os casos também fumaram uma maior quantidade de cigarros do que os controles, sendo tal diferença estatisticamente significativa ( $32,70 \pm 26,64$  pack-years contra  $10,27 \pm 20,60$  pack-years,  $p<0,001$ ). Ademais, observou-se uma maior proporção de fumantes pesados (consumo de cigarro  $>20$  pack-years) entre os casos comparativamente aos controles (57,9% e 16,9%, respectivamente), existindo uma clara relação dose resposta entre o consumo de tabaco e o risco de HNSCC (tabela 3). Para os sempre etilistas, o risco de HNSCC foi 4,21 vezes maior em relação aos não etilistas (95% CI: 2,52 – 7,05,  $p< 0,001$ ). A análise do efeito combinado entre o tabagismo e o etilismo confirmou a existência de uma interação entre ambos no aumento do risco do HNSCC dentro de uma escala aditiva. A exposição simultânea a esses dois fatores resultou numa chance 23,37 vezes maior de desenvolvimento de HNSCC comparativamente aos nunca etilistas e nunca tabagistas (95% CI 8,94 – 61,06,  $p<0,001$ ).

Com relação ao sítio primário dos tumores, os carcinomas espinocelulares (CEC) de orofaringe e cavidade oral foram os mais incidentes (58,2%), seguidos pelos de laringe (31,3%) e hipofaringe (8,7%). Os dados de estadiamento demonstraram a predominância de pacientes em estágio avançado (estádios III e IV) de doença (89,1%), com apenas 10,9% dos pacientes tendo sido diagnosticados em

estágio inicial de doença (estádios I e II). Nenhum dos pacientes apresentou metástases a distância.

**Tabela 2. Características demográficas e de hábitos de vida entre casos e controles.**

<b>Variáveis</b>	<b>Casos (n = 116)</b>	<b>Controles (n = 224)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>P valor</b>
Gênero n (%)			–	–
Masculino	100 (86,2)	193 (86,2)		
Feminino	16 (13,8)	31 (13,8)		
Masculino + Feminino	116	224		
Idade (média +DP)	60,9 ± 12,5	58,2 ± 11,9	–	–
Cor da Pele n (%)				
Masculino	100	193	–	–
Branco	14 (14,0)	14 (14,0)		
Não Branco	86 (86,0)	166 (86,0)		
Female	16	31	–	–
Branco	3 (18,8)	6 (19,4)		
Não Branco	13 (81,2)	25 (80,6)		
Etilismo n (%)				
Nunca	27 (23,3)	110 (56,1)	1	
Sempre	89 (76,7)	86 (43,9)	4,21 (2,52 - 7,05)	<0,001
Tabagismo n (%)				
Nunca	6 (5,2)	114 (52,1)	1	
Sempre	110 (94,8)	105 (47,9)	19,90 (8,39 - 47,18)	<0,001
Tabagismo/ Etilismo n (%)				
Nunca/Nunca	5 (4,3)	81 (41,3)	1	
Sempre/Nunca	22 (19,0)	29 (14,8)	12,29 (4,26 - 35,46)	<0,001
Nunca/Sempre	1 (0,9)	25(12,8)	0,65 (0,07 - 5,81)	1,0
Sempre/Sempre	88 (75,8)	61 (31,1)	23,37 (8,94 - 61,06)	<0,001
Sítio Primário n (%)			–	–
Cavidade Oral e Orofaringe	67 (58,2)			
Hipofaringe	10 (8,7)			
Nasofaringe	1 (0,9)			
Laringe	36 (31,3)			
Primário Oculcto	1 (0,9)			
Estadiamento (UICC) n (%)			–	–
I + II	11 (10,9)			
III + IV	80 (89,1)			

**Tabela 3- Consumo de cigarros (em pack-years) entre casos e controles e associação com o risco de HNSCC.**

Pack-year	Casos n (%)	Controles n (%)	<sup>a</sup> OR (IC 95%)	pValor	<sup>b</sup> OR (IC 95%)	pValor
0	6 (6,3)	114 (56,4)	1	-	-	-
≤20	34 (35,8)	54 (23,7)	11,96 (4,73 - 30,20)	<0,001	1	-
>20	55 (57,9)	34 (16,8)	30,73 (12,18 - 77,55)	<0,001	2,57 (1,40 - 4,70)	0,002
Média ± DP	32,70 ± 26,64	10,27 ± 20,60	-	<0,001		

<sup>a</sup>OR não ajustada calculada usando não fumantes como referência.

<sup>b</sup>OR não ajustada calculada usando fumantes que consumiram até 20 pack-years como referência

As frequências genóticas de *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* entre casos e controles são descritas na tabela 4. O genótipo *GSTT1* *Nulo* apresentou uma maior frequência entre os controles quando comparados aos casos, o que resultou num efeito protetor estatisticamente significativo associado a esse genótipo (OR: 0,50; 95% CI: 0,27 - 0,93,  $p= 0,026$ ). No entanto, quando ajustada para idade, sexo, cor da pele, tabagismo e consumo de álcool, tal associação não se manteve significativa (OR ajustada: 0,61; 95% CI: 0,29 - 1,28,  $p= 0,193$ ). Já a frequência de *GSTM1* nulo foi ligeiramente maior entre os casos do que nos controles (44,8% versus 39,7%, respectivamente), sem resultar num aumento de risco de HNSCC significativamente associado a esse genótipo (OR: 1,23; 95% CI: 0,78 - 1,94,  $p= 0,366$ ). Para o gene *GSTP1*, as frequências genóticas foram similares entre casos e controles, não tendo sido identificados genótipos significativamente associados ao HNSCC como fatores de risco ou de proteção. Casos e controles também não diferiram entre si para os genótipos de *GSTP1* adotando-se um modelo genético dominante de doença, no qual os genótipos homocigoto selvagem (Val/Val) e heterocigoto (Ile/Val) são agrupados numa mesma categoria (OR não ajustada: 1,21; 95% CI: 0,77 – 1,90,  $p= 0,405$ ). As frequências genóticas de *GSTP1* observadas tanto para os casos quanto para os controles demonstraram estar em EHW ( $p= 0,997$  e  $p= 1,0$ , respectivamente), permitindo aplicar um modelo multiplicativo de doença, o qual considera apenas as frequências dos alelos mutante (Val) e selvagem (Ile) entre casos e controles. Também nesse caso não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos (OR: 1,22; 95% CI: 0,87 – 1,70,  $p= 0,245$ ).



**Tabela 4- Distribuição dos genótipos dos genes *GSTs* entre casos e controles e associação com o risco de HNSCC.**

Genótipo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR (IC 95%)	P valor	OR <sup>a</sup> (IC 95%)	P valor
<b><i>GSTM1</i></b>						
Positivo	64 (55,2)	135 (60,3)	1	–		
Nulo	52 (44,8)	89 (39,7)	1,23 (0,78 - 1,94)	0,366	1,36 (0,78 - 2,37)	0,282
<b><i>GSTT1</i></b>						
Positivo	100 (86,2)	170 (75,9)	1	–		
Nulo	16 (13,8)	54 (24,1)	0,50 (0,27 - 0,93)	<b>0,026</b>	0,61 (0,29 - 1,28)	0,193
<b><i>GSTP1</i></b>						
<i>Ile/Ile</i>	49 (42,2)	102 (47,0)	1	–		
<i>Ile/Val</i>	51 (44,0)	94 (43,3)	1,13 (0,70 - 1,82)	0,621	1,2 (0,50 - 2,81)	0,695
<i>Val/Val</i>	16 (13,8)	21 (9,7)	1,58 (0,76 - 3,30)	0,216	0,93 (0,39 - 2,20)	0,875
<i>Ile/Val ou Val/Val</i>	67 (57,8)	115 (53,0)	1,21 (0,77 - 1,90)	0,405	1,25 (0,71 - 2,20)	0,431
<i>Ile</i>	149 (64,2)	298 (68,7)	1	–		
<i>Val</i>	83 (35,8)	136 (31,3)	1,22 (0,87 - 1,70)	0,245		

<sup>a</sup> Ajustada para idade, gênero, cor da pele, tabagismo, etilismo e genótipos de *GSTs*.

As análises dos genótipos combinados de *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* são demonstradas na tabela 5. Como descrito na tabela, a combinação dos genótipos *GSTT1* nulo e *GSTP1* selvagem (*Ile/Ile*) foi observada em apenas 2,6% dos casos e em 10,1% dos controles. Considerando-se os indivíduos selvagens para ambos os genes como o grupo referência, essa combinação foi associada como um fator de proteção para o HNSCC (OR: 0,24; 95% IC: 0,07 – 0,83,  $p= 0,017$ ). Adicionalmente, quando o grupo genotípico *GSTT1* nulo e *GSTP1* *Ile/Ile* foi tomado como referência, verificou-se que a combinação *GSTT1* positivo e *GSTP1* polimórfico (*Ile/Val* ou *Val/Val*) foi associada como um fator de risco para o HNSCC (OR: 4,54; 95% CI: 1,3 – 15,87,  $p= 0,011$ ). A análise combinada dos genótipos de *GSTM1* e *GSTT1* mostrou que o grupo genotípico *GSTM1* positivo e *GSTT1* nulo foi mais freqüente entre os controles do que nos casos (13,4 versus 6,9%, respectivamente). Essa diferença, todavia, não foi estatisticamente significativa (OR: 0,5; 95% CI: 0,21 – 1,16,  $p= 0,103$ ). Ademais, considerando-se o grupo *GSTM1* positivo e *GSTT1* nulo como referência, observou-se um maior risco associado à combinação genotípica *GSTM1* nulo e *GSTT1* positivo (OR: 2,54; 95% CI: 1,06 – 6,05,  $p = 0,032$ ). Na análise conjunta dos três *loci*, a combinação *GSTM1* presente, *GSTT1* Nulo e *GSTP1* selvagem foi verificada em 6,5% dos controles e em nenhum dos casos, sendo tal diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,005$ ). Em virtude da célula nula, a OR não pôde ser calculada para esse grupo, o qual também demonstrou ser

um fator de proteção. Nenhuma outra combinação genotípica apresentou-se como fator de risco ou de proteção para o HNSCC (Tabela 5).

**Tabela 5- Genótipos combinados dos genes GSTs entre casos e controles e risco associado de HNSCC.**

<b>Genótipos Combinados</b>	<b>Casos n (%)</b>	<b>Controles n (%)</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>P valor</b>	<b>OR<sup>a</sup> (95% CI)</b>	<b>P valor</b>
<i>GSTM1 e GSTT1</i>						
Positivo/Positivo	56 (48,3)	105 (46,9)	1	–	2,00 (0,86 - 4,76)	0,103
Nulo/Positivo	8 (6,9)	30 (13,4)	0,5 (0,21 - 1,16)	0,103	2,54 (1,06 - 6,05)	0,032
Nulo/Nulo	44 (37,9)	65 (29,0)	1,27 (0,77 - 2,09)	0,351	1,25 (0,41 - 3,81)	0,695
Positivo/Nulo	8 (6,9)	24 (10,7)	0,62 (0,26 - 1,48)	0,283	1	-
<i>GSTM1 and GSTP1</i>						
Positivo e Ile/Ile	30 (25,9)	69 (31,8)	1	–		
Nulo e Ile/Ile	19 (16,4)	33 (15,2)	1,32 (0,65 - 2,70)	0,437		
Positivo e Ile/Val ou Val/Val	34 (29,3)	61 (28,1)	1,28 (0,70 - 2,33)	0,417		
Nulo e Ile/Val ou Val/Val	33 (28,4)	54 (24,9)	1,4 (0,76 - 2,60)	0,273		
<i>GSTT1 e GSTP1</i>						
Positivo e Ile/Ile	46 (39,7)	80 (36,9)	1	–	4,16 (1,20 - 14,28)	0,017
Positivo e Ile/Val ou Val/Val	3 (2,6)	22 (10,1)	0,24 (0,07 - 0,83)	<b>0,017</b>	4,54 (1,13 - 15,87)	0,011
Nulo e Ile/Val ou Val/Val	54 (46,6)	87 (40,1)	1,07 (0,66 - 1,77)	0,763	3,40 ( 0,86 - 13,15)	0,07
Nulo e Ile/Ile	13 (11,2)	28 (12,9)	0,80 (0,38 - 1,71)	0,576	1	-
<i>GSTM1, GSTT1 e GSTP1</i>						
Positivo/Positivo e Ile/Ile	30 (25,9)	55 (25,3)	1	-		
Nulo/Nulo e Ile/Val ou Val/Val	5 (4,3)	15 (6,9)	0,61 (0,20 - 1,84)	0,38		
Positivo/Nulo e Ile/Val ou Val/Val	8 (6,9)	13 (6,0)	1,13 (0,42 - 3,02)	0,811		
Nulo/Positivo e Ile/Ile	16 (13,8)	25 (11,5)	1,17 (0,54 - 2,53)	0,684		
Positivo/Nulo e Ile/Ile	0	14 (6,5)	-	<b>0,005*</b>		
Nulo/Positivo e Ile/Val ou Val/Val	28 (24,1)	39 (18)	1,31 (0,68 - 2,54)	0,413		
Positivo/Positivo e Ile/Val ou Val/Val	26 (22,4)	48 (22,1)	0,99 (0,51 - 1,90)	0,983		
Nulo/Nulo e Ile/Ile	3 (2,6)	8 (3,7)	0,68 (0,17 - 2,78)	0,743*		

<sup>a</sup>OR calculada utilizando os genótipos GSTM1 positivo/GSTT1 nulo e GSTT1 nulo/GSTP1 Ile/Ile como referência.

Análises de interação gene-ambiente foram conduzidas a partir da estratificação de variáveis (pack-years x genótipos) que foram introduzidas em modelos de regressão logística multivariada com outras variáveis de risco selecionadas (Tabela 6). Ao analisar-se a interação entre o gene *GSTM1* e o tabagismo, verificou-se um aumento do risco de HNSCC para fumantes na faixa de  $\leq 20$  pack-years portadores do genótipo *GSTM1* nulo. A OR foi de 7,86 (95% CI: 2,25 – 27,52) nos indivíduos com *GSTM1* presente contra 16,41 (95% CI: 4,46 – 60,40), para os portadores de *GSTM1* nulo, respectivamente.

**Tabela 6- Interações gene-ambiente entre os genótipos de *GSTs* e o tabagismo na modificação do risco de HNSCC.**

Tabagismo, pack-years	<i>GSTM1</i> Positivo				<i>GSTM1</i> Nulo			
	Casos n (%)	Controles n (%)	OR <sup>a</sup> (IC 95%)	pValor	Casos	Controles	OR <sup>a</sup> (IC 95%)	pValor
Não								
Fumantes	4 (4,2)	69 (34,2)	1	-	2 (2,1)	45 (22,3)	0,81 (0,14 - 4,72)	0,817
≤20	16 (16,8)	32 (15,8)	7,86 (2,25 - 27,52)	0,001	18 (18,9)	22 (10,9)	16,41 (4,46 - 60,40)	<0,001
>20	31 (32,6)	22 (10,9)	19,35 (5,53 - 67,71)	<0,001	24 (25,3)	12 (5,9)	29,86 (7,85 - 113,60)	<0,001
	<i>GSTT1</i> Positivo				<i>GSTT1</i> Nulo			
	Casos n (%)	Controles n (%)	OR <sup>a</sup> (IC 95%)	pValor	Casos	Controles	OR <sup>a</sup> (IC 95%)	pValor
Não								
Fumantes	5 (5,3)	84 (41,6)	1	-	1 (1,1)	30 (14,9)	0,62 (0,07 - 5,66)	0,674
≤20	32 (33,7)	41 (20,3)	13,28 (4,30 - 41,0)	<0,001	2 (2,1)	13 (6,4)	2,40 (0,38 - 14,81)	0,349
>20	46 (48,4)	29 (14,4)	22,16 (7,07 - 69,42)	<0,001	9 (9,5)	5 (2,5)	22,55 (4,78 - 106,31)	<0,001
	<i>GSTP1</i> Ile/Ile				<i>GSTP1</i> Ile/Val or Val/Val			
	Casos n (%)	Controles n (%)	OR <sup>a</sup> (IC 95%)	pValor	Casos	Controles	OR <sup>a</sup> (IC 95%)	pValor
Não								
Fumantes	2 (2,1)	52 (26,5)	1	-	4 (4,2)	59 (30,1)	1,19 (0,33 - 11,04)	0,47
≤20	19 (20,0)	26 (13,3)	17,11 (3,45 - 84,86)	0,001	15 (15,8)	26 (13,3)	16,67 (3,28 - 84,61)	0,001
>20	20 (21,1)	13 (6,6)	31,04 (5,95 - 161,90)	<0,001	35 (36,8)	20 (10,2)	38,91 (7,81 - 193,90)	<0,001

<sup>a</sup>Ajustada para idade, sexo, cor da pele e etilismo.

O valor da OR de 16,41 é similar ao esperado considerando um efeito multiplicativo de interação entre esses dois fatores (OR: 15,50). Essa interação, entretanto, foi apenas marginalmente significativa no teste de razão de verossimilhanças ( $p= 0,078$ ). Já para os que consumiram >20 pack-years as ORs foram, respectivamente, de 19,35 (95% CI: 5,53 – 67,71) para os indivíduos com *GSTM1* presente e 29,86 (7,85 – 113,60) para os *GSTM1* nulo, diferença que também não se mostrou estatisticamente significativa ( $p= 0,390$ ). Novamente, a OR obtida de 29,86 é semelhante à OR multiplicativa esperada de 32,50. Foi observada uma interação significativa entre o gene *GSTT1* e o consumo de cigarros na faixa de ≤ 20 pack-years. Para os portadores do genótipo *GSTT1* nulo a OR foi de 2,4 (95% CI: 0,38 – 14,81), enquanto que naqueles com *GSTT1* presente a OR foi de 13,28 (95% CI: 4,03 – 41,0). Tal diferença mostrou-se estatisticamente significativa por meio do teste de razão de verossimilhanças usando a distribuição de  $\chi^2$  ( $p= 0,012$ ).

O gene *GSTP1*, por sua vez, não apresentou nenhuma interação significativa com o consumo de tabaco.

Na tabela 7 são descritas as freqüências genóticas de *GSTs* entre os casos estratificados de acordo com os seguintes parâmetros clínicos: estadio UICC, grau histológico, presença de linfonodos positivos e tamanho do tumor. Os polimorfismos de deleção completa dos *GSTM1* e *GSTT1* não foram significativamente associados com nenhum dos fenótipos clínicos avaliados. A freqüência dos genótipos variantes de *GSTP1* (Ile/Val ou Val/Val) foi maior entre pacientes com metástase para linfonodos regionais do que entre aqueles com linfonodos negativos (66,7 vs 47,2%, respectivamente). Tal diferença, contudo, não foi significativa (OR: 2,23; 95% CI: 0,94 - 5,30,  $p= 0,066$ ), muito provavelmente em virtude do tamanho reduzido da amostra. Uma maior freqüência do genótipo homozigoto mutante para *GSTP1* foi também observada entre os pacientes com CEC bem diferenciado em relação aos diagnosticados com tumores menos diferenciados (24,2 vs 9,8%, respectivamente). Novamente, essa diferença observada não foi estatisticamente significativa (OR: 0,31; 95% CI: 0,09 - 1,08,  $p= 0,061$ ).

Foram realizadas análises de associação entre o polimorfismo Ile105Val de *GSTP1* e os diferentes fenótipos clínicos considerando apenas os casos de tumores de cavidade oral e orofaringe. Os resultados são apresentados na tabela 8. O alelo Val105 foi marginalmente associado ao risco de metástases para linfonodos regionais (OR: 3,02; 95% CI: 0,93 – 9,82,  $p= 0,062$ ), enquanto que para os outros parâmetros não foram observadas diferenças significativas.

**Tabela 7 – Polimorfismos de GSTs e associação com os parâmetros clínicos no HNSCC.**

Genótipo	Variáveis Clínicas		OR (95% CI)	P valor
	Estádio n (%)			
	I + II	III + IV		
<i>GSTM1</i>				
Positivo	5 (43,3)	51 (56,7)	1	–
Nulo	6 (54,5)	39 (43,8)	0,64 (0,18 - 2,24)	0,533
<i>GSTT1</i>				
Positivo	11 (100)	76 (84,4)	1	–
Nulo	0 (0)	14 (15,6)	–	0,354
<i>GSTP1</i>				
<i>Ile/Ile</i>	5 (45,5)	40 (44,4)	1	–
<i>Ile/Val</i>	5 (45,5)	37 (41,1)	0,92 (0,25 - 3,45)	1,0
<i>Val/Val</i>	1 (9,0)	13 (14,4)	1,62 (0,17 - 15,20)	1,0
<i>Ile/Val ouVal/Val</i>	6 (54,5)	50 (55,6)	1,04 (0,29 - 3,66)	1,0
<b>Grau Histológico n (%)</b>				
	G1	G2 + G3		
<i>GSTM1</i>				
Positivo	16 (48,5)	37 (60,7)	1	–
Nulo	17 (51,5)	24 (39,3)	0,61 (0,26 - 1,43)	0,256
<i>GSTT1</i>				
Positivo	26 (78,8)	54 (88,5)	1	–
Nulo	7 (21,2)	7 (11,5)	0,48 (0,15 - 1,51)	0,234
<i>GSTP1</i>				
<i>Ile/Ile</i>	12 (36,4)	29 (47,5)	1	–
<i>Ile/Val</i>	13 (39,4)	26 (42,7)	0,53 (0,32 - 2,13)	0,695
<i>Val/Val</i>	8 (24,2)	6 (9,8)	0,31 (0,09 - 1,08)	0,061
<i>Ile/Val ouVal/Val</i>	21 (63,6)	32 (52,5)	0,63 (2,4 - 1,50)	0,297
<b>Linfonodos n (%)</b>				
	Positivo	Negativo		
<i>GSTM1</i>				
Positivo	31 (57,4)	19 (52,8)	1	–
Nulo	23 (42,6)	17 (47,2)	0,83 (0,35 - 1,93)	0,665
<i>GSTT1</i>				
Positivo	45 (83,3)	33 (91,7)	1	–
Nulo	9 (16,7)	3 (8,3)	2,20 (0,55 - 8,76)	0,349
<i>GSTP1</i>				
<i>Ile/Ile</i>	18 (33,3)	19 (52,8)	1	–
<i>Ile/Val</i>	26 (48,1)	14 (38,9)	1,96 (0,79 - 4,90)	0,147
<i>Val/Val</i>	10 (18,6)	3 (8,3)	3,52 (0,83 - 14,88)	0,077
<i>Ile/Val ouVal/Val</i>	36 (66,7)	17 (47,2)	2,23 (0,94 - 5,30)	0,066
<b>Tamanho do Tumor n (%)</b>				
	T1 + T2	T3 + T4		
<i>GSTM1</i>				
Positivo	10 (58,8)	39 (57,4)	1	–
Nulo	7 (41,2)	29 (42,6)	1,06 (0,36 - 3,12)	0,913
<i>GSTT1</i>				
Positivo	17 (100)	56 (82,4)	1	–
Nulo	0 (0,0)	12 (17,6)	–	0,113
<i>GSTP1</i>				
<i>Ile/Ile</i>	8 (47,1)	29 (42,6)	1	–
<i>Ile/Val</i>	7 (41,2)	29 (42,6)	1,14 (0,36 - 3,56)	0,818
<i>Val/Val</i>	2 (11,7)	10 (14,8)	1,38 (0,25 - 7,61)	1,0

**Tabela 8- Associação entre o polimorfismo Ile105Val de GSTP1 e os parâmetros clinicopatológicos no câncer oral.**

Genótipo	Variável Clínica		OR (IC 95%)	P valor
	Estádio UICC n (%)			
	I + II	III + IV		
<b>GSTP1</b>				
Ile/Ile	2 (50,0)	25 (44,6)	1	–
Ile/Val	2 (50,0)	23 (41,1)	0,92 (0,12 - 7,07)	1,0
Val/Val	0 (0,0)	8 (14,3)	–	1,0
Ile/Val or Val/Val	2 (50)	31 (55,4)	1,24 (0,16 - 9,43)	1,0
<b>Grau Histológico n (%)</b>				
	G1	G2 + G3		
<b>GSTP1</b>				
Ile/Ile	6 (33,3)	18 (51,4)	1	–
Ile/Val	8 (44,5)	13 (37,2)	0,54 (0,15 - 1,94)	0,344
Val/Val	4 (22,2)	4 (11,4)	0,33 (0,06 - 1,76)	0,218
Ile/Val or Val/Val	12 (66,7)	17 (48,6)	0,47 (0,14 - 1,54)	0,21
<b>Linfonodos n (%)</b>				
	Positivo	Negativo		
<b>GSTP1</b>				
Ile/Ile	10 (31,2)	11 (57,9)	1	–
Ile/Val	16 (50,0)	7(36,8)	2,51 (0,73 - 8,63)	0,139
Val/Val	6 (18,8)	1 (5,3)	6,6 (0,67 - 64,76)	0,184
Ile/Val or Val/Val	22 (68,8)	8 (42,1)	3,02 (0,93 - 9,82)	0,062
<b>Tamanho do Tumor n (%)</b>				
	T1 + T2	T3 + T4		
<b>GSTP1</b>				
Ile/Ile	5 (50,0)	16 (41,0)	1	–
Ile/Val	4 (40,0)	17 (43,6)	1,33 (0,30 - 5,84)	1,0
Val/Val	1 (10,0)	6 (15,4)	1,87 (0,18 - 19,52)	1,0
Ile/Val or Val/Val	5 (50,0)	23 (59,0)	1,44 (0,36 - 5,80)	0,726

## 5. DISCUSSÃO

O carcinoma espinocelular de vias aerodigestivas superiores está intrinsecamente associado ao consumo de tabaco e ao etilismo. Estudos têm sugerido que esses dois fatores atuam tanto independentemente quanto em sinergismo na etiopatogênese do HNSSC (Wight e Ogden, 1998). No presente estudo, a frequência de tabagistas entre os casos (94,8%) foi marcadamente maior do que nos controles (47,9%), aumentando em quase vinte vezes o risco de HNSSC. Ademais, quando os fumantes foram divididos em moderados ( $\leq 20$  pack-years) e pesados ( $> 20$  pack-years), verificou-se que o risco de HNSSC aumentou significativamente com o aumento do nível de exposição ao tabagismo. Por fim, o consumo de cigarros foi maior entre os casos comparativamente aos controles ( $30,94 \pm 27,22$  pack-years contra  $8,93 \pm 23,8$  pack-years,  $p < 0,001$ ).

Embora a ação carcinogênica do álcool não esteja completamente esclarecida, duas hipóteses comumente aceitas são a de que ele poderia atuar como um solvente para os carcinógenos do cigarro, facilitando sua penetração nos tecidos da vias aerodigestivas superiores, ou induzir diretamente danos ao DNA, através do seu metabólito primário acetaldeído (Boffetta e Hashibe, 2006). De fato, o consumo de álcool por si só elevou em quatro vezes o risco de carcinoma de vias aerodigestivas superiores na população aqui avaliada. Nossos dados, além de confirmarem a ação independentemente do tabagismo e do etilismo no aumento do risco desse tipo de câncer, demonstraram a existência de uma interação entre ambos dentro de uma escala aditiva, ou seja, o risco associado à exposição simultânea a esses dois fatores (OR: 23,37) foi similar ao esperado pela adição das ORs obtidas para cada um individualmente (OR: 24,11). Um resultado semelhante foi encontrado num estudo caso-controle muticêntrico de câncer esofágico conduzido numa população do sudeste brasileiro (Rossini *et al.*, 2007). Contudo, essa interação aditiva entre o álcool e o tabaco verificada em nosso estudo diverge

da relação multiplicativa entre esses dois fatores de risco relatada por outros autores (Choong e Vokes, 2008; Peters *et al.*, 2006). A mensuração das exposições ao tabagismo e ao etilismo na forma de variáveis dicotômicas (sempre/nunca), aplicada tanto no presente estudo quanto por Rossini *et al.* (2007), pode ajudar a explicar essa divergência de resultados, pois esse tipo de classificação acaba agrupando numa mesma categoria uma extensa faixa de tabagistas e etilistas que apresentam graus diferentes de exposição a esses fatores de risco, fato que reduz a acurácia das medidas de interação estimadas (Geisler e Olshan, 2001).

A distribuição dos tumores de vias aerodigestivas superiores por sítio primário observada no presente trabalho está em concordância com o relatado por outros autores em estudos similares realizados em populações brasileiras (Biselli *et al.*, 2006; Gattas *et al.*, 2006). Com relação ao grau de progressão da doença ao diagnóstico, a proporção de pacientes diagnosticados em estágio inicial e avançado (10,9% e 89,1%, respectivamente) está de acordo com os dados de estatística do HNSCC apurados em outras regiões do mundo (Choong e Vokes, 2008). A predominância de pacientes em estágio avançado de doença ao diagnóstico torna o prognóstico ruim de uma maneira geral, uma vez que a taxa de sobrevida de 5 anos reduz-se a cerca da metade em pacientes diagnosticados em estágios avançados relativamente àqueles que se apresentam ao diagnóstico em estágios iniciais de doença (Jemal *et al.*, 2008; McMahon e Chen, 2003). Por esse motivo, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese e progressão dessa neoplasia maligna poderia auxiliar a implementação de medidas sócio-educativas mais efetivas para a sua prevenção.

Embora o tabagismo seja reconhecidamente o principal fator de risco para essa enfermidade, ele não é uma causa suficiente e nem necessária ao seu desenvolvimento (Rothman e Greenland, 1998). Por outro lado, o consumo de tabaco pode integrar um complexo causal juntamente com outros fatores de risco ambientais e/ou inerentes ao próprio hospedeiro. Um desses fatores pode ser a variabilidade interindividual geneticamente determinada na metabolização de compostos carcinogênicos (Vineis e Martone, 1995). De fato, polimorfismos capazes de alterar a atividade de enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos poderiam conferir perfis diferenciados de susceptibilidade a esse tipo de carcinoma (Hashibe *et al.*, 2003). Por esse motivo, o presente trabalho teve por objetivo



também avaliar a associação entre polimorfismos nos genes candidatos *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* e o risco de desenvolvimento de HNSCC.

Um dos problemas dos estudos de associação genética que utilizam desenhos epidemiológicos do tipo caso-controle são as associações espúrias (resultados falso-positivos ou falso-negativos) decorrentes do efeito confundidor da estratificação ou subestrutura populacional (Cardon e Palmer, 2003). Uma população estratificada poderia ser definida como uma metapopulação formada por subgrupos de indivíduos, a exemplo de grupos étnicos distintos, que apresentam diferenças sistemáticas de frequências alélicas para diversos *loci* ao longo do genoma (Pritchard e Donnelly, 2001). Duas condições devem co-existir na população fonte dos casos e controles para que a estratificação populacional atue como uma variável confundidora, a saber: diferenças de frequências alélicas entre os subgrupos que compõem a população; e diferenças de prevalência da doença pesquisada entre esses subgrupos populacionais, o que levaria, na ausência de um adequado pareamento, a uma representação diferencial dos mesmos entre casos e controles. Nesse cenário, uma doença que seja mais prevalente numa subpopulação particular será positivamente associada com qualquer alelo que esteja em maior frequência nessa subpopulação, ainda que não haja qualquer relação causal entre o alelo em questão e a doença pesquisada (Pritchard e Donnelly, 2001)

Com relação à segunda condição acima referida, estudos vêm demonstrando uma relação entre a incidência de câncer e a ancestralidade. Na população norte-americana, por exemplo, observa-se uma maior incidência e mortalidade por câncer de pulmão, próstata, mama e de vias aerodigestivas superiores entre afroamericanos comparativamente aos indivíduos euroamericanos (Ademuyiwa e Olopade, 2003; Brawley, 2003; Gadgeel e Kalemkerian, 2003; Reddy *et al.*, 2003; Shavers *et al.*, 2003). Embora boa parte dessa diferença possa ser atribuída a fatores sócio-econômicos, como diferenças de estilo de vida, hábitos alimentares, e até mesmo de acesso aos serviços de saúde por parte de negros e brancos norte-americanos (Boyer *et al.*, 2000), diferenças genéticas entre esses grupos étnicos podem também exercer um papel importante. No presente estudo, a proporção de indivíduos não-brancos (negros e pardos) entre os casos (86%) foi maior que a frequência conjunta de não-brancos (75%) apurada para a população baiana (IBGE, 2002). Isso pode se dever ao fato de que no grupo caso houve um predomínio de indivíduos oriundos de classes sociais menos favorecidas financeiramente, a

exemplo de habitantes da zona rural e com baixo nível de escolaridade, condições socioeconômicas que guardam uma relação com o fenótipo de cor da pele não-branca na população avaliada. Apesar de não ser conhecida a existência de uma diferença na prevalência de HNSCC entre brancos e não brancos para a população baiana, o efeito da estratificação populacional não pode ser negligenciado na pesquisa de *loci* de susceptibilidade para essa doença, principalmente pelo fato dessa variável de confundimento ser provavelmente mais problemática em populações com uma história de miscigenação recente (Freedman *et al.*, 2004), como é o caso da aqui estudada. Adicionalmente a isso, os polimorfismos dos genes *GSTs* avaliados no presente trabalho demonstram uma significativa variação de distribuição entre os diferentes grupos étnicos originários da população brasileira (Di Pietro *et al.*, ; Garte *et al.*, 2001), fato que justificou o pareamento por cor da pele autodeclarada adotado na seleção do grupo controle.

A população brasileira é resultado da miscigenação entre europeus, africanos e ameríndios (Carvalho-Silva *et al.*, 2001), sendo que no estado da Bahia a contribuição africana é marcante, com o predomínio de indivíduos afrodescendentes (IBGE, 2002). Estudos têm demonstrado que a frequência do genótipo nulo de *GSTM1* varia entre esses diferentes grupos étnicos, indo de 42 a 60% entre europeus e de 16 a 36% entre africanos (Garte *et al.*, 2001). Em ameríndios brasileiros foi relatado que a frequência de *GSTM1* nulo variou de 0 a 42%, enquanto que para brancos e não brancos esses valores ficaram em torno de 49% a 55% e 33 a 36%, respectivamente (Arruda *et al.*, 1998; Rossini *et al.*, 2002; Gattas *et al.*, 2004; Klautau-Guimarães *et al.*, 2005; Magno *et al.*, 2009). A frequência de *GSTM1* nulo encontrada no grupo controle (39,7%) está de acordo com esses relatos, dado o alto grau de miscigenação que é característico da população sul-baiana (Carvalho-Silva *et al.*, 2001). O genótipo *GSTT1* nulo, por sua vez, apresenta mais baixa incidência entre caucasóides, com a frequência variando de 13% a 26% (Garte *et al.*, 2001), enquanto que em africanos e afrodescendentes a distribuição desse genótipo varia de 17 a 44% (Di Pietro *et al.*, 2010). Entre ameríndios brasileiros as frequências relatadas para esse genótipo variaram de 0 a 33% (Klautau-Guimarães *et al.*, 2005, Arruda *et al.*, 1998). A frequência do genótipo *GSTT1* nulo observada nos controles foi de 24,1%, a qual também é condizente com o anteriormente descrito para outras populações brasileiras, incluindo algumas oriundas do estado da Bahia (Arruda *et al.*, 1998; Gattás *et al.*, 2004, Magno *et al.*,

2009). Ademais, as freqüências genóticas observadas para os genes *GSTT1* e *GSTM1* no grupo controle se coadunam com aquelas descritas para a população da região sul baiana, na qual os casos e controles do presente estudo foram recrutados (Magno *et al.*, 2009). O polimorfismo Ile105Val do gene *GSTP1*, por sua vez, não parece apresentar o mesmo padrão de diferenças de distribuição entre grupos étnicos distintos como o observado para os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* (Rossini *et al.*, 2007). Também para esse gene as freqüências alélicas e genóticas observadas nos controles estiveram de acordo com o previamente descrito para a população em estudo (Magno *et al.*, 2009).

O polimorfismo de deleção completa do gene *GSTM1* nulo tem sido associado ao aumento do risco para diferentes tipos de cânceres, como o de pulmão (Lee *et al.*, 2006), esôfago (Lu *et al.*, 2005), bexiga (Yuan *et al.*, 2008) e de cabeça e pescoço (Sato *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2008). A hipótese biológica aventada para explicar essa associação é a de que a completa ausência de expressão enzimática verificada em indivíduos *GSTM1* nulos resultaria numa menor capacidade de detoxificação de compostos potencialmente danosos ao DNA, acarretando um putativo aumento do risco de neoplasias malignas (Soya *et al.*, 2007). Essa hipótese é reforçada pela observação de que fumantes, assim como trabalhadores expostos a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, portadores do genótipo *GSTM1* nulo apresentaram maiores níveis de adutos no DNA e uma maior quantidade de micronúcleos relativamente àqueles com genótipo *GSTM1* selvagem, sugerindo o envolvimento desse polimorfismo na susceptibilidade aos efeitos genotóxicos e clastogênicos induzidos por carcinógenos (Rojas *et al.*, 2000; Lodovici *et al.*, 2004; Ketelslegers *et al.*, 2006; Palma *et al.*, 2007). No caso específico da associação desse polimorfismo com o HNSCC, os resultados obtidos para diferentes populações mundiais têm sido divergentes e inconclusivos, com alguns estudos relatando uma fraca ou moderada associação e outros não encontrando nenhuma elevação do risco significativamente associada a esse genótipo (Geisler e Olshan, 2001; Hashibe *et al.*, 2003).

Os dados apresentados no presente estudo não revelaram a existência de uma associação entre o genótipo *GSTM1* nulo e o risco de HNSCC. Um resultado similar foi verificado em outros estudos conduzidos em populações da região sudeste do Brasil que avaliaram o risco desse tipo de carcinoma em relação ao polimorfismo de deleção completa de *GSTM1* (Biselli *et al.*, 2006; Hatagima *et al.*,

2008). Esses resultados, contudo, divergem do que foi encontrado por outros autores em estudos caso-controle também conduzidos em populações do sudeste brasileiro (Drummond *et al.*, 2004; Gattas *et al.*, 2006) . Essa divergência de resultados sugere que fatores étnico-geográficos, além da heterogeneidade de hábitos de vida e alimentares existentes entre essas populações, possam modificar o impacto desse polimorfismo sobre o risco de doença.

O polimorfismo de deleção completa para o gene *GSTT1*, por sua vez, tem sido associado como um fator de risco para o HNSCC por alguns autores (Drummond *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2008; Soya *et al.*, 2007) e como fator de proteção em outros estudos (Evans *et al.*, 2004; Oude Ophuis *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2006). Esses resultados divergentes podem ser resultado do papel dual das enzimas GSTs de classe teta (GST  $\theta$ ), as quais, diferentemente das outras classes de GSTs, podem catalisar tanto a bioativação quanto a detoxificação de xenobióticos (Landi, 2000). Desse modo, o papel desse polimorfismo na modulação do risco de câncer poderia estar sujeito ao balanço entre os níveis de exposição aos substratos carcinogênicos que são detoxificados ou bioativados a partir da ação dessas enzimas. Além disso, alelos associados como fatores de risco para uma doença em uma dada população podem ter o efeito contrário em outra, e seu impacto na modificação do risco de doença pode ser exercido apenas na presença de variáveis de exposição ambientais específicas (Quigley e Balmain, 2009).

No presente estudo o genótipo *GSTT1* nulo foi mais prevalente entre os controles comparativamente aos casos, diferença que se mostrou estatisticamente significativa. O papel protetor desse genótipo foi demonstrado em diferentes tipos de tumores, como no câncer oral (Anantharaman *et al.*, 2007), esofágico (Rossini *et al.*, 2007), de bexiga (Kim *et al.*, 2002) e coloretal (Huang *et al.*, 2006). Foi demonstrado que trabalhadores com o genótipo *GSTT1* nulo expostos a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos apresentaram menor concentração de 8-oxiguanina, principal biomarcador de danos oxidativos ao DNA, quando comparados àqueles que foram *GTST1* positivos (Garte *et al.*, 2007). Além disso, indivíduos portadores de *GSTT1* nulo apresentaram menores quantidades de adutos induzidos por PAH's do que aqueles com *GSTT1* presente, embora tal diferença não tenha sido estatisticamente significativa (Ludovici *et al.*, 2004). Ademais, um estudo de metanálise revelou que indivíduos *GSTT1* nulos apresentaram mais baixas frequências de micronúcleos relativamente aos *GSTT1* positivos (Kirsch-Volders *et al.*, 2006). Por último, a

enzima *GSTT1* é capaz de atuar em vias de ativação de alguns carcinógenos, a exemplo do cloreto de metil (Sherratt *et al.*, 1998). Esse composto é empregado na fabricação de tintas e plásticos, e através da ação de *GSTT1* é convertido no intermediário instável eletrofílico S-clorometilglutaciona, que após sofrer hidrólise origina o formaldeído como produto final, um conhecido carcinógeno para humanos. Acredita-se que essa via de ativação mediada por *GSTT1* esteja envolvida no processo de carcinogênese induzida por cloreto de metil em camundongos (Pemble *et al.*, 1994; Sherratt *et al.*, 1998). Embora o cloreto de metil não esteja associado à fumaça do cigarro, é provável que esta contenha outros compostos capazes de originar agentes carcinogênicos após sofrerem bioativação mediada por *GSTT1* (Evans *et al.*, 2003).

Já o papel do SNP 313 A→G de *GSTP1* sobre o risco de desenvolvimento de HNSCC não é claro, existindo uma tendência dos estudos publicados até o momento em relatarem uma associação moderada ou inexistente do alelo polimórfico (Val) com o risco de doença (Hashibe *et al.*, 2003; Lazarus e Park, 2000). A troca de uma adenina por uma guanina no nucleotídeo 313 do códon 105 leva à substituição de uma isoleucina por uma valina na cadeia aminoacídica (Ile105Val), o que modifica o sítio de ligação da enzima a substratos hidrofóbicos (sítio H) e reduz de duas a três vezes a sua estabilidade térmica (Johansson *et al.*, 1998; Zimniak *et al.*, 1994). Como consequência, os indivíduos portadores dessa forma variante teriam uma menor capacidade de detoxificação de agentes carcinógenos que são substratos de *GSTP1* (Ryberg *et al.*, 1997; Watson *et al.*, 1998).

No presente trabalho esse polimorfismo não foi significativamente associado ao risco de HNSCC quando se adotou um modelo genético geral de doença, no qual os genótipos são considerados independentemente na avaliação do risco. O mesmo resultado foi verificado aplicando-se um modelo genético dominante, em que os genótipos heterozigoto e homozigoto mutante são agrupados em uma mesma categoria e comparados ao genótipo selvagem com relação ao risco de doença. Nenhuma associação significativa foi observada também adotando-se um modelo genético multiplicativo, que leva em consideração apenas as diferenças de frequências dos alelos selvagem (Ile) e mutante (Val) entre casos e controles. Esses resultados estão de acordo com o que foi relatado por outros autores em estudos de associação entre o polimorfismo Ile105Val de *GSTP1* e o risco de câncer oral em populações oriundas do sudeste brasileiro (Hatagima *et al.*, 2008; Leichsenring *et*

*al.*, 2006). No entanto, Rossini *et al.* (2007) descreveram que o alelo mutante de *GSTP1* foi implicado como um fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma espinocelular esofágico num estudo multicêntrico envolvendo pacientes do sul e sudeste brasileiros.

Uma vez que os genes *GSTs* aqui avaliados compartilham alguns substratos em comum, essas enzimas poderiam ser consideradas, ao menos em parte, como sendo funcionalmente redundantes (Gronau *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2005). Desse modo, os polimorfismos analisados para esses diferentes *loci* candidatos seriam mais informativos quando avaliados dentro de um modelo multigênico de doença (Hashibe *et al.*, 2003). Por essa razão, foram conduzidas análises de interação gene-gene através da combinação dos diferentes genótipos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*. Na análise de interação entre os genes *GSTM1* e *GSTT1* verificou-se que a combinação genotípica potencialmente mais perigosa (*GSTM1* nulo e *GSTT1* positivo) apresentou um risco significativamente maior em relação àquela que se configurou com sendo a mais protetora (*GSTM1* positivo e *GSTT1* nulo). Além disso, o alelo *GSTT1* positivo não conferiu um aumento significativo de risco para aqueles indivíduos que carregam simultaneamente ao menos uma cópia funcional de *GSTM1*. Esses resultados sugerem a existência de uma interação entre esses dois *loci* na modulação da susceptibilidade ao HNSCC. Uma hipótese explicativa é a de que os putativos pré-carcinógenos presentes na fumaça do cigarro e bioativados por *GSTT1* seriam detoxificados via *GSTM1*.

Na análise envolvendo os genes *GSTT1* e *GSTP1* constatou-se que indivíduos *GSTT1* positivos tiveram um aumento do risco em relação ao grupo referência (*GSTT1* nulo e *GSTP1* Ile/Ile) independentemente do genótipo de *GSTP1* que eles co-carregam. Esse dado demonstra o papel independente do genótipo *GSTT1* positivo no aumento da susceptibilidade ao HNSCC quando considerado conjuntamente com os genótipos de *GSTP1*. Por fim, nenhuma combinação de risco ou proteção foi verificada na análise agrupada dos genes *GSTM1* e *GSTP1*.

Análises de interação englobando os três genes simultaneamente foram conduzidas através da criação de grupos genotípicos formados pela combinação tripla dos genótipos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*. É interessante observar que o grupo genotípico que se configurou como sendo o mais protetor na análise conjunta desses três *loci* (*GSTM1* positivo, *GSTT1* nulo e *GSTP1* Ile/Ile) não foi verificado em nenhum dos casos, quando no teste global o valor esperado assumindo-se a

hipótese nula de independência seria de cinco casos. Ademais, o grupo genotípico de menor frequência nos controles (*GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e *GSTP1* Ile/Ile) foi observado numa porcentagem bem similar entre os casos. Isso reforça a hipótese de que a diferença observada para a combinação genotípica de menor risco entre casos e controles se deva mais a um verdadeiro papel protetor exercido por esses genótipos do que a um efeito de chance resultante do tamanho da amostra.

Nas características complexas ou multifatoriais, como é o caso do HNSCC, o fenótipo de interesse é resultante da interação entre diferentes fatores de exposição genéticos e ambientais. Assim, a pesquisa de uma associação marginal entre polimorfismos candidatos e o desfecho de doença pode mascarar interações biológicas existentes entre genes de susceptibilidade e outros fatores de risco (Rothman e Greenland, 1998). Desse modo, foram realizadas análises de interação gene – ambiente para avaliar o potencial efeito dos polimorfismos dos genes *GSTs* como modificadores do risco de doença na presença de níveis específicos de exposição ao tabagismo.

Nas análises de associação estratificadas por níveis de consumo de cigarro, o genótipo *GSTM1* nulo apresentou uma tendência, embora não significativa, de elevação do risco comparativamente à sua contraparte *GSTM1* positiva tanto para os fumantes leves ( $\leq 20$  pack-years) quanto para os pesados ( $> 20$  pack-years). Ademais, a interação entre esse genótipo e as diferentes faixas de consumo de cigarro se deu dentro de uma escala multiplicativa, ou seja, o risco resultante da combinação do genótipo *GSTM1* nulo com os diferentes níveis de exposição ao tabagismo foi similar ao esperado multiplicando-se as ORs obtidas para cada um desses fatores individualmente. Soya *et al.* (2007) observaram um efeito significativo de interação entre esse genótipo e o consumo de tabaco também em uma escala multiplicativa, sendo que nesse caso a forma de exposição foi diferente, já que os pacientes tinham por hábito mascar, e não fumar, tabaco.

Foi verificada uma associação significativa entre o genótipo *GSTT1* nulo e o consumo de cigarros apenas para fumantes moderados, com esse genótipo conferindo uma redução do risco de HNSCC em relação aos indivíduos que foram *GSTT1* positivos. Para fumantes pesados e não fumantes, todavia, esse genótipo não foi implicado como um modificador de risco considerável. Esses achados são compatíveis com a hipótese de que polimorfismos em genes envolvidos na metabolização de xenobióticos seriam mais importantes para a modulação da

susceptibilidade ao câncer sob menores níveis de exposição a carcinógenos (Vineis e Martone, 1995). Na população aqui avaliada, portanto, os fumantes leves e portadores do genótipo *GSTT1* positivo poderiam representar um tal grupo geneticamente mais propenso ao desenvolvimento de HNSCC. Além disso, considerando um limite de saturação da atividade dessas enzimas, seria de esperar que sob altos níveis de exposição a substratos carcinogênicos esses polimorfismos deixassem de atuar como modificadores significativos de risco. Em suma, esses resultados sugerem que a influência do genótipo *GSTT1* nulo sobre o risco de HNSCC seria modificada pela presença ou ausência, como também pelo nível de exposição ao tabagismo.

O polimorfismo Ile105Val de *GSTP1*, por sua vez, não demonstrou qualquer efeito de interação significativo com o tabagismo nas análises estratificadas pelas diferentes categorias de fumantes.

A expressão das enzimas *GSTs* é elevada durante o desenvolvimento de processos neoplásicos (Hayes *et al.*, 2005). O aumento da atividade total de *GST* foi também demonstrado no HNSCC comparativamente aos tecidos normais do trato aerodigestivo superior (Bentz *et al.*, 2000; Mulder *et al.*, 1995; Parise *et al.*, 1994). Foi relatado também um aumento gradativo da atividade total dessas enzimas correspondente ao grau de severidade de lesões pré-neoplásicas da mucosa oral, com o maior nível expressão sendo verificado no carcinoma de células escamosas dessa região (Chen e Lin, 1997). Essa elevação da atividade de *GST* em tecidos neoplásicos e pré-neoplásicos pode ser uma resposta ao próprio dano celular induzido durante as múltiplas etapas do processo carcinogênico (Bongers *et al.*, 1995). De acordo com essa hipótese, a progressão de alterações pré-neoplásicas para lesões neoplásicas mais avançadas poderia ser prevenida através do aumento dos níveis de *GST* (Bongers *et al.*, 1995). Os polimorfismos dos genes *GSTs* aqui estudados, portanto, podem estar associados à progressão clinicopatológica do HNSCC, dado que pacientes portadores de formas alélicas defectivas para esses genes poderiam apresentar perfis diferenciados de metabolização de compostos mutagênicos comparativamente às suas contrapartes selvagens.

Desse modo, análises de associação entre polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* e diferentes parâmetros clínicos de doença foram realizadas com o objetivo de verificar a possível implicação desses genes na progressão do HNSCC. Os polimorfismos de deleção completa de *GSTM1* e *GSTT1* não demonstraram



nenhuma associação significativa com o tamanho do tumor, grau histológico, envolvimento de linfonodos regionais ou estadió clínico. Um mesmo resultado foi relatado num estudo que avaliou a associação desses polimorfismos com as características clinicopatológicas do carcinoma oral de células escamosas em uma população da Tailândia (Chen *et al.*, 2009). Entretanto, num outro estudo de câncer oral também conduzido em uma população tailandesa, foi relatado que o genótipo *GSTM1* nulo foi associado com o aumento do risco de metástases para linfonodos regionais (Liu *et al.*, 2005). Uma associação do polimorfismo *GSTT1* nulo com o tamanho do tumor no HNSCC foi descrita para uma população alemã, com nenhuma diferença estatística sendo verificada entre os genótipos de *GSTM1* e *GSTP1* em relação aos outros parâmetros clínicos avaliados (Matthias *et al.*, 1999).

O alelo Val105 de *GSTP1*, por sua vez, foi associado a uma elevação do risco de metástases para linfonodos regionais, embora essa associação tenha sido apenas marginalmente significativa. Diversos fatores de estresse estão envolvidos no microambiente tumoral, a exemplo de hipóxia, acidose e super-produção de radicais livres (Xie e Huang, 2003). Particularmente a produção de radicais livres, os quais são citotóxicos para o tumor, pode ser considerada um importante mecanismo homeostático do hospedeiro contra a transformação maligna. Contudo, as lesões induzidas por esses radicais que não resultam em morte celular podem estimular a expansão clonal e a aquisição de propriedades malignas pelo tumor. Por essa razão, os radicais livres poderiam promover o desenvolvimento e a progressão de neoplasias malignas, incluindo a aquisição de propriedades metastáticas pelas células tumorais, através da indução de mutações, aumento da instabilidade genômica e expressão aberrante de diversos genes, dentre eles aqueles que codificam para proteínas relacionadas à metástase (Wink *et al.*, 1998; Xie e Huang, 2003). Dado que as enzimas GSTs atuam na detoxificação de metabólitos gerados a partir do estresse oxidativo, a exemplo de intermediários genotóxicos derivados da peroxidação de lipídeos (Hayes *et al.*, 2005), a menor atividade catalítica da variante Val105 de *GSTP1* tornaria as células tumorais mais propensas a sofrerem danos críticos ao DNA provocados direta ou indiretamente por radicais livres, o que poderia explicar a tendência de associação observada entre esse polimorfismo e a ocorrência de metástases para linfonodos regionais. Essa hipótese é reforçada pela observação de que a expressão de óxido nítrico (NO), o qual parece atuar tanto em processos de controle quanto nos de promoção da evolução de células metastáticas

(Xie e Huang, 2003), é fortemente correlacionada com a expressão de *GSTP1* no carcinoma de células escamosas das vias aerodigestivas superiores (Bentz *et al.*, 2000). A mesma tendência de associação entre o polimorfismo Val105 de *GSTP1* e metástases para linfonodos regionais foi verificada quando a análise foi restrita aos casos de câncer oral. Como o gene *GSTP1* é predominantemente expresso na mucosa oral e orofaríngea (Chen e Lin, 1997), esses dados sugerem um envolvimento sítio-específico desse polimorfismo na modulação do risco de positividade para linfonodos regionais.

Pacientes homozigotos mutantes para o alelo Val105 apresentaram uma maior chance de desenvolverem carcinomas bem diferenciados (G1) comparativamente àqueles que foram homozigotos selvagens. Novamente, tal diferença não foi estatisticamente significativa. Diferentemente do que foi observado para os linfonodos positivos, essa mesma tendência de associação não foi evidenciada na análise restrita aos carcinomas orais. Uma vez que o papel protetor do alelo mutante de *GSTP1* sobre o grau de diferenciação histológica do tumor é desconhecido, um efeito de casualidade não pode ser descartado na interpretação desse resultado.

## 6. CONCLUSÕES

- O genótipo *GSTT1* nulo apresentou-se como um fator de proteção para o desenvolvimento de HNSCC na população avaliada, em especial para fumantes que consumiram até 20 pack-years;
- Os polimorfismos *GSTM1* nulo e Ile105Val de *GSTP1* não foram significativamente associados ao risco de HNSCC;
- As análises de interação gene-gene revelaram a existência de combinações genotípicas entre *loci* de *GST* que foram significativamente associadas como fatores de risco ou de proteção para essa neoplasia maligna;
- Uma tendência de associação entre o genótipo polimórfico de *GSTP1* e a ocorrência de metástases para linfonodos regionais foi observada tanto na análise envolvendo todos os casos de HNSCC, quanto na restrita aos casos de câncer oral, o que sugere um possível envolvimento sítio-específico desse polimorfismo na modulação do risco de positividade para linfonodos regionais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ademuyiwa FO, Olopade OI (2003) Racial differences in genetic factors associated with breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 22(1):47-53.
- Anantharaman D, Chaubal PM, Kannan S, Bhisey RA, Mahimkar MB (2007) Susceptibility to oral cancer by genetic polymorphisms at CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 loci among Indians: tobacco exposure as a risk modulator. *Carcinogenesis* 28(7):1455-62.
- Arruda VR, Grignolli CE, Goncalves MS, Soares MC, Menezes R, Saad ST, Costa FF (1998) Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clin Genet* 54(3):210-4.
- Bentz BG, Haines GK, 3rd, Radosevich JA (2000) Glutathione S-transferase pi in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 110(10 Pt 1):1642-7.
- Biselli JM, de Angelo Calsaverini Leal RC, Ruiz MT, Goloni-Bertollo EM, Maniglia JV, Rossit AR, Pavarino-Bertelli EC (2006) GSTT1 and GSTM1 polymorphism in cigarette smokers with head and neck squamous cell carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol* 72(5):654-8.

- Board P, Coggan M, Johnston P, Ross V, Suzuki T, Webb G (1990) Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. *Pharmacol Ther* 48(3):357-69.
- Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermini LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffon MC, Kamath AV, Rosner MH, Chruncyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J (2000) Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem* 275(32):24798-806.
- Boccia S, Cadoni G, Sayed-Tabatabaei FA, Volante M, Arzani D, De Lauretis A, Cattal C, Almadori G, van Duijn CM, Paludetti G, Ricciardi G (2008) CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, EPHX1 exons 3 and 4, and NAT2 polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 134(1):93-100.
- Boffetta P, Hashibe M (2006) Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 7(2):149-56.
- Bongers V, Snow GB, Braakhuis BJ (1995) The role of glutathione S-transferases in head and neck squamous cell carcinogenesis. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 31B(6):349-54.
- Boyer KL, Ford MB, Judkins, AF, Levin, B (2000) *Oncologia na Clínica Geral*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Brawley OW (2003) Population categorization and cancer statistics. *Cancer Metastasis Rev* 22(1):11-9.
- Cardon LR, Palmer LJ (2003) Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 361(9357):598-604.
- Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD (2001) The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* 68(1):281-6.

- Chen MK, Tsai HT, Chung TT, Su SC, Kao TY, Tseng HC, Liu TH, Chiou HL, Yang SF (2009) Glutathione S-transferase P1 and alpha gene variants; role in susceptibility and tumor size development of oral cancer. *Head Neck*.
- Chen YK, Lin LM (1997) Evaluation of glutathione S-transferase activity in human buccal epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg* 26(3):205-9.
- Choong N, Vokes E (2008) Expanding role of the medical oncologist in the management of head and neck cancer. *CA Cancer J Clin* 58(1):32-53.
- Coggan M, Whitbread L, Whittington A, Board P (1998) Structure and organization of the human theta-class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex. *Biochem J* 334 ( Pt 3):617-23.
- Di Pietro G, Magno LA, Rios-Santos F Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 6(2):153-70.
- Drummond SN, De Marco L, Noronha JC, Gomez RS (2004) GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 40(1):52-5.
- Drummond SN, Gomez RS, Motta Noronha JC, Pordeus IA, Barbosa AA, De Marco L (2005) Association between GSTT-1 gene deletion and the susceptibility to oral squamous cell carcinoma in cigarette-smoking subjects. *Oral Oncol* 41(5):515-9.
- Evans AJ, Henner WD, Eilers KM, Montalto MA, Wersinger EM, Andersen PE, Cohen JI, Everts EC, McWilliams JE, Beer TM (2004) Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck* 26(1):63-70.
- Freedman ML, Reich D, Penney KL, McDonald GJ, Mignault AA, Patterson N, Gabriel SB, Topol EJ, Smoller JW, Pato CN, Pato MT, Petryshen TL, Kolonel LN, Lander ES, Sklar P, Henderson B, Hirschhorn JN, Altshuler D (2004)

Assessing the impact of population stratification on genetic association studies. *Nat Genet* 36(4):388-93.

Gadgeel SM, Kalemkerian GP (2003) Racial differences in lung cancer. *Cancer Metastasis Rev* 22(1):39-46.

Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stucker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC, Taioli E (2001) Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10(12):1239-48.

Garte S, Taioli E, Popov T, Kalina I, Sram R, Farmer P (2007) Role of GSTT1 deletion in DNA oxidative damage by exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in humans. *Int J Cancer* 120(11):2499-503.

Gattas GJ, de Carvalho MB, Siraque MS, Curioni OA, Kohler P, Eluf-Neto J, Wunsch-Filho V (2006) Genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. *Head Neck* 28(9):819-26.

Gattas GJ, Kato M, Soares-Vieira JA, Siraque MS, Kohler P, Gomes L, Rego MA, Bydlowski SP (2004) Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 37(4):451-8.

- Geisler SA, Olshan AF (2001) GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE review. *Am J Epidemiol* 154(2):95-105.
- Gronau S, Koenig-Greger D, Jerg M, Riechelmann H (2003) Gene polymorphisms in detoxification enzymes as susceptibility factor for head and neck cancer? *Otolaryngol Head Neck Surg* 128(5):674-80.
- Guan S, Huang M, Chan E, Chen X, Duan W, Zhou SF (2006) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2B6 gene in Han Chinese. *Eur J Pharm Sci* 29(1):14-21.
- Hashibe M, Brennan P, Strange RC, Bhisey R, Cascorbi I, Lazarus P, Oude Ophuis MB, Benhamou S, Foulkes WD, Katoh T, Coutelle C, Romkes M, Gaspari L, Taioli E, Boffetta P (2003) Meta- and pooled analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12(12):1509-17.
- Hatagima A, Costa EC, Marques CF, Koifman RJ, Boffetta P, Koifman S (2008) Glutathione S-transferase polymorphisms and oral cancer: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol* 44(2):200-7.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51-88.
- Hirvonen A (1995) Genetic factors in individual responses to environmental exposures. *J Occup Environ Med* 37(1):37-43.
- Huang K, Sandler RS, Millikan RC, Schroeder JC, North KE, Hu J (2006) GSTM1 and GSTT1 polymorphisms, cigarette smoking, and risk of colon cancer: a population-based case-control study in North Carolina (United States). *Cancer Causes Control* 17(4):385-94.



Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2002). Ano 2000 Census Data. <http://www.ibge.gov.br>, Brasil.

Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2010) *Estimativa 2010 da Incidência de Câncer no Brasil*. <http://www.inca.gov.br>, Brasil.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008) Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 58(2):71-96.

Johansson AS, Stenberg G, Widersten M, Mannervik B (1998) Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1-1 governed by the H-site residue 105. *J Mol Biol* 278(3):687-98.

Ketelslegers HB, Gottschalk RW, Godschalk RW, Knaapen AM, van Schooten FJ, Vlietinck RF, Kleinjans JC, van Delft JH (2006) Interindividual variations in DNA adduct levels assessed by analysis of multiple genetic polymorphisms in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(4):624-9.

Kim WJ, Kim H, Kim CH, Lee MS, Oh BR, Lee HM, Katoh T (2002) GSTT1-null genotype is a protective factor against bladder cancer. *Urology* 60(5):913-8.

Kirsch-Volders M, Mateuca RA, Roelants M, Tremp A, Zeiger E, Bonassi S, Holland N, Chang WP, Aka PV, Deboeck M, Godderis L, Haufroid V, Ishikawa H, Laffon B, Marcos R, Migliore L, Norppa H, Teixeira JP, Zijno A, Fenech M (2006) The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(5):1038-42.

Klautau-Guimaraes MN, Hiragi CO, D'ascensão RF, Oliveira SF, Grisolia CK, Hatagima A, Ferrari I (2005) Distribution of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null phenotypes in Brazilian Amerindians. *Genet. Mol. Biol.* 28(1): 32-5.

- Knowler WC, Williams RC, Pettitt DJ, Steinberg AG (1988) Gm3;5,13,14 and type 2 diabetes mellitus: an association in American Indians with genetic admixture. *Am J Hum Genet* 43(4):520-6.
- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005) Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(2):467-75.
- Landi S (2000) Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res* 463(3):247-83.
- Lazarus P, Park JY (2000) Metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 36(5):421-31.
- Lee KM, Kang D, Lee SJ, Park SK, Lee KH, Choi JY, Kim SU, Choi H, Choi SH, Kim YW, Hong YC, Cho SH (2006) Interactive effect of genetic polymorphism of glutathione S-transferase M1 and smoking on squamous cell lung cancer risk in Korea. *Oncol Rep* 16(5):1035-9.
- Leichsenring A, Losi-Guembarovski R, Maciel ME, Losi-Guembarovski A, Oliveira BW, Ramos G, Cavalcanti TC, Bicalho MG, Cavalli IJ, Colus IM, Ribeiro EM (2006) CYP1A1 and GSTP1 polymorphisms in an oral cancer case-control study. *Braz J Med Biol Res* 39(12):1569-74.
- Liu CJ, Chang CS, Lui MT, Dang CW, Shih YH, Chang KW (2005) Association of GST genotypes with age of onset and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 34(8):473-7.
- Lodovici M, Luceri C, Guglielmi F, Bacci C, Akpan V, Fonnesu ML, Boddi V, Dolara P (2004) Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, and mEH. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13(8):1342-8.

- Lu XM, Zhang YM, Lin RY, Arzi G, Wang X, Zhang YL, Zhang Y, Wang Y, Wen H (2005) Relationship between genetic polymorphisms of metabolizing enzymes CYP2E1, GSTM1 and Kazakh's esophageal squamous cell cancer in Xinjiang, China. *World J Gastroenterol* 11(24):3651-4.
- Magno LA, Talbot J, Talbot T, Borges Santos AM, Souza RP, Marin LJ, Moreli ML, de Melo PR, Correa RX, Rios Santos F, Di Pietro G (2009) Glutathione s-transferase variants in a brazilian population. *Pharmacology* 83(4):231-6.
- Matthias C, Jahnke V, Jones PW, Hoban PR, Aldersea JE, Worrall SF, Fryer AA, Strange RC (1999) Cyclin D1, glutathione S-transferase, and cytochrome P450 genotypes and outcome in patients with upper aerodigestive tract cancers: assessment of the importance of individual genes using multivariate analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8(9):815-23.
- McCarty KM, Ryan L, Houseman EA, Williams PL, Miller DP, Quamruzzaman Q, Rahman M, Mahiuddin G, Smith T, Gonzalez E, Su L, Christiani DC (2007) A case-control study of GST polymorphisms and arsenic related skin lesions. *Environ Health* 6:5.
- McMahon S, Chen AY (2003) Head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 22(1):21-4.
- Mitrunen K, Jourenkova N, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S, Vainio H, Uusitupa M, Hirvonen A (2001) Glutathione S-transferase M1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10(3):229-36.
- Mulder TP, Manni JJ, Roelofs HM, Peters WH, Wiersma A (1995) Glutathione S-transferases and glutathione in human head and neck cancer. *Carcinogenesis* 16(3):619-24.
- Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, Lee BK, Spitz MR, Wang M, Xu X, et al. (1995) Ethnic differences in the prevalence of

the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* 16(5):1243-5.

Oude Ophuis MB, Manni JJ, Peters WH (2006) Glutathione S-transferase T1 null polymorphism and the risk for head and neck cancer. *Acta Otolaryngol* 126(3):311-7.

Palma S, Cornetta T, Padua L, Cozzi R, Appolloni M, Ievoli E, Testa A (2007) Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on genotoxic effects induced by tobacco smoke. *Mutat Res* 633(1):1-12.

Parise O, Jr., Janot F, Luboinski B, Massaad L, Albin N, Toussaint C, Verjus MA, Bonnay M, Gouyette A, Chabot GG (1994) Thymidylate synthase activity, folates, and glutathione system in head and neck carcinoma and adjacent tissues. *Head Neck* 16(2):158-64.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55(2):74-108.

Pearson WR, Vorachek WR, Xu SJ, Berger R, Hart I, Vannais D, Patterson D (1993) Identification of class-mu glutathione transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. *Am J Hum Genet* 53(1):220-33.

Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB (1994) Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300 (Pt 1):271-6.

Peters ES, McClean MD, Marsit CJ, Lockett B, Kelsey KT (2006) Glutathione S-transferase polymorphisms and the synergy of alcohol and tobacco in oral, pharyngeal, and laryngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(11):2196-202.

- Pollock RE, Doroshon JH, Khayat D, Nakao A, O'Sullivan B (2006) *Manual de Oncologia Clínica da UICC*. 8ª ed. Wiley - Fundação Oncocentro, São Paulo.
- Pritchard JK, Donnelly P (2001) Case-control studies of association in structured or admixed populations. *Theor Popul Biol* 60(3):227-37.
- Pritchard JK, Rosenberg NA (1999) Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet* 65(1):220-8.
- Quigley D, Balmain A (2009) Systems genetics analysis of cancer susceptibility: from mouse models to humans. *Nat Rev Genet* 10(9):651-7.
- Reddy S, Shapiro M, Morton R, Jr., Brawley OW (2003) Prostate cancer in black and white Americans. *Cancer Metastasis Rev* 22(1):83-6.
- Rojas M, Cascorbi I, Alexandrov K, Kriek E, Auburtin G, Mayer L, Kopp-Schneider A, Roots I, Bartsch H (2000) Modulation of benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. *Carcinogenesis* 21(1):35-41.
- Rossini A, Rapozo DC, Amorim LM, Macedo JM, Medina R, Neto JF, Gallo CV, Pinto LF (2002) Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet Mol Res* 1(3):233-40.
- Rossini A, Rapozo DC, Soares Lima SC, Guimaraes DP, Ferreira MA, Teixeira R, Krueel CD, Barros SG, Andreollo NA, Acatauassu R, Matos HJ, Albano RM, Pinto LF (2007) Polymorphisms of GSTP1 and GSTT1, but not of CYP2A6, CYP2E1 or GSTM1, modify the risk for esophageal cancer in a western population. *Carcinogenesis* 28(12):2537-42.
- Rothman KJ, Greenland S (1998) *Modern epidemiology*. 2ª ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

- Ryberg D, Skaug V, Hewer A, Phillips DH, Harries LW, Wolf CR, Ogreid D, Ulvik A, Vu P, Haugen A (1997) Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis* 18(7):1285-9.
- Sampayo-Reyes A, Zakharyan RA (2006) Tocopherol esters inhibit human glutathione S-transferase omega. *Acta Biochim Pol* 53(3):547-52.
- Sato M, Sato T, Izumo T, Amagasa T (2000) Genetically high susceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined genotyping of CYP1A1 and GSTM1 genes. *Oral Oncol* 36(3):267-71.
- Schnakenberg E, Fabig KR, Stanulla M, Strobl N, Lustig M, Fabig N, Schloot W (2007) A cross-sectional study of self-reported chemical-related sensitivity is associated with gene variants of drug-metabolizing enzymes. *Environ Health* 6:6.
- Scully C, Bedi R (2000) Ethnicity and oral cancer. *Lancet Oncol* 1(1):37-42.
- Shavers VL, Harlan LC, Winn D, Davis WW (2003) Racial/ethnic patterns of care for cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, sinuses, and salivary glands. *Cancer Metastasis Rev* 22(1):25-38.
- Sherratt PJ, Manson MM, Thomson AM, Hissink EA, Neal GE, van Bladeren PJ, Green T, Hayes JD (1998) Increased bioactivation of dihaloalkanes in rat liver due to induction of class theta glutathione S-transferase T1-1. *Biochem J* 335 ( Pt 3):619-30.
- Singh M, Shah PP, Singh AP, Ruwali M, Mathur N, Pant MC, Parmar D (2008) Association of genetic polymorphisms in glutathione S-transferases and susceptibility to head and neck cancer. *Mutat Res* 638(1-2):184-94.

- Soya SS, Vinod T, Reddy KS, Gopalakrishnan S, Adithan C (2007) Genetic polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) and upper aerodigestive tract cancer risk among smokers, tobacco chewers and alcoholics in an Indian population. *Eur J Cancer* 43(18):2698-706.
- Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA (2001) Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 482(1-2):21-6.
- Tae K, Lee HS, Park BJ, Park CW, Kim KR, Cho HY, Kim LH, Park BL, Shin HD (2004) Association of DNA repair gene XRCC1 polymorphisms with head and neck cancer in Korean population. *Int J Cancer* 111(5):805-8.
- Vineis P, Martone T (1995) Genetic-environmental interactions and low-level exposure to carcinogens. *Epidemiology* 6(4):455-7.
- Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA (1998) Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 19(2):275-80.
- Wight AJ, Ogden GR (1998) Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer--a review. *Oral Oncol* 34(6):441-7.
- Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB (1998) The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 19(5):711-21.
- Xie K, Huang S (2003) Regulation of cancer metastasis by stress pathways. *Clin Exp Metastasis* 20(1):31-43.
- Yuan JM, Chan KK, Coetzee GA, Castelao JE, Watson MA, Bell DA, Wang R, Yu MC (2008) Genetic determinants in the metabolism of bladder carcinogens in relation to risk of bladder cancer. *Carcinogenesis* 29(7):1386-93.

Zimniak P, Nanduri B, Pikula S, Bandorowicz-Pikula J, Singhal SS, Srivastava SK, Awasthi S, Awasthi YC (1994) Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem* 224(3):893-9.



## ANEXO 1

### UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ - UESC TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Prezado(a) Senhor(a),

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), de uma pesquisa científica. No caso de aceitar esse convite, você deverá responder a esse questionário e autorizar o exame de uma amostra de sangue. Você terá liberdade para pedir esclarecimentos sobre qualquer questão, bem como desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Sua desistência não acarretará nenhuma penalidade a você. Como responsável por esse estudo, tenho o compromisso de manter em segredo todos os dados pessoais, bem como compensá-lo caso sofra algum prejuízo físico ou moral causado pela pesquisa. Essa pesquisa tem como objetivo estudar as diferenças que existem no DNA das células do sangue (características que vem dos pais) dos participantes voluntários. Tentaremos encontrar informações importantes no seu DNA, para que se possam controlar, de maneira mais cuidadosa, os fatores de risco para o carcinoma das vias aerodigestivas superiores, principalmente para os indivíduos que se mostraram, de acordo com os resultados da pesquisa, com maior tendência a desenvolver algumas doenças. Uma pequena amostra de sangue (cerca de 3 mililitros) será colhida do(a) senhor(a) por um profissional treinado, sem que haja desconforto, apenas uma “picadinha”, toda essa quantidade de sangue será usada em nosso estudo, e desta forma, nenhuma outra pesquisa, não autorizada pelo senhor(a) será realizada com essa amostra. O restante do seu sangue será descartado em lixo apropriado, para que não seja usado em outras pesquisas sem a sua autorização. Aquilo que for encontrado nesse trabalho será divulgado por envio de carta a sua residência, se assim o desejar, e publicado ao final do trabalho, mantendo em sigilo o nome dos participantes; também não serão feitas perguntas que causem qualquer constrangimento ao entrevistado. As amostras serão congeladas e os resultados dos exames ficarão no Laboratório de Farmacologia da UESC até a análise, sob a responsabilidade do Professor Giuliano Di Pietro, telefone: 73 3680-5327; e somente os professores participantes desse estudo terão acesso às amostras e/ou resultados. Ao final da pesquisa, as informações e as amostras restantes serão descartadas. Cada voluntário participante terá acesso apenas ao seu resultado. A qualquer momento o(a) senhor(a) poderá solicitar e acompanhar a destruição das suas amostras/dados de sangue/DNA dos nossos Banco de Amostras/Dados, entrando em contato com o pesquisador responsável. Assim se estiver claro para o senhor(a) ao finalidade dessa pesquisa e se concorda em participar, peço que assine este documento. Meus sinceros agradecimento por sua colaboração.

**Giuliano Di Pietro** (Professor responsável pelo Banco de Amostras e Resultados, telefone: **73 3680-5327**)

( ) não ( ) autorizo o envio dos resultados ao meu endereço, via carta.

Eu \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_, aceito participar da pesquisa **intitulada “Correlação de Polimorfismos Genéticos das Enzimas NAT2 e GST no carcinoma das vias aerodigestivas superiores.”**, tendo sido devidamente informado e esclarecido, como disposto acima.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_  
Local                      dia   mês   ano

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário

## ANEXO 2



### PROJETO: ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES NAT2 E GST COM O CARCINOMA DAS VIAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES.

Questionário N° \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Entrevistador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banco de Sangue: \_\_\_\_\_

N° no banco de sangue:

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### Dados do Entrevistado

Nome completo: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_ anos

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Sexo: Masculino Feminino

Naturalidade: \_\_\_\_\_

Raça: Branca Negra ou Parda Índia ou mestiça de índio Asiático

Outras: \_\_\_\_\_

Estado civil: Solteiro Casado União consensual Outros

#### Filiação:

Nome de mãe: \_\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_

Raça: Branca Negra ou Pardo Índia ou mestiça de índio Asiático

Genitores: Avó: Branca Negra ou parda Índia ou mestiça de índio Asiático

Avô: Branca Negra ou parda Índia ou mestiça de índio Asiático

Nome do pai: \_\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_

Raça: Branca Negra ou parda Índia ou mestiça de índio Asiático

Genitores: Avó Branca Negra ou parda Índia ou mestiça de índio Asiático

Avô: Branca Negra ou parda Índia ou mestiça de índio Asiático

#### Grau de Escolaridade do voluntário:

Analfabeto 1º grau completo 2º grau incompleto

Assina apenas o nome 1º grau incompleto Superior completo

Alfabetizado 2º grau completo Superior incompleto

#### Ocupação:

Atual: \_\_\_\_\_

Ocupações Anteriores: Trabalhador Rural \_\_\_\_\_ (Tempo: \_\_\_\_\_)

Manipulação de Agrotóxico: Sim Não (Frequência: \_\_\_\_\_)

Indústria ou empresa: \_\_\_\_\_ (Tempo: \_\_\_\_\_)

Exposição a agentes químicos: Sim Não (Frequência \_\_\_\_\_)

Outros: \_\_\_\_\_ (Tempo: \_\_\_\_\_)

Exposição a carcinógenos Sim Não (Frequência \_\_\_\_\_)

Residência: Zona rural Zona urbana

Endereço e Tel:

\_\_\_\_\_

#### Dados Socioeconômicos e Culturais:

Hábitos de vida:

*Etilismo:* Sim Não Ex-etilistas: Sim Não  
O que bebe \_\_\_\_\_  
Quantidade (Doses/dia) \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
Há quanto tempo \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

*Tabagismo:* Sim Não Ex-tabagistas: Sim  
Não  
Se sim: Quantidade /Dia \_\_\_\_\_  
Quantidade/Dia \_\_\_\_\_  
Há quanto tempo \_\_\_\_\_  
Por quanto tempo \_\_\_\_\_

**Hábitos Alimentares:**

1- Diariamente 3- Semanalmente 5- Raramente  
2- 3 vezes por semana 4- Mensalmente 6- Não se aplica

**Churrasco**

**Carne Cozida**

**Legumes e vegetais (*tipos mais consumidos*):**

**Frituras**

**Embutidos e Defumados**

**Frutas (*tipos mais consumidos*):** \_\_\_\_\_

Câncer aerodigestivo (tipo): \_\_\_\_\_ Tempo do diagnóstico: \_\_\_\_\_

Estadiamento: \_\_\_\_\_ Histopatologia: \_\_\_\_\_

Histórico patológico do indivíduo:

- *Tuberculose* Sim Não Não sabe informar  
Uso de antibiótico \_\_\_\_\_  
- *Hanseníase* Sim Não Não sabe informar  
Uso de antibiótico \_\_\_\_\_  
- *Câncer* Sim Não Não sabe informar

Histórico de doenças na família:

- *Tuberculose* Sim Não Não sabe informar  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_  
- *Hanseníase* Sim Não Não sabe informar  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_  
- *Câncer* Sim Não Não sabe informar  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_