

**Mauricio Pereira Maniglia**

**Análise molecular de polimorfismos dos genes  
da família *GST* em pacientes com carcinoma  
espinocelular de cabeça e pescoço tratados com  
quimioterapia e/ou radioterapia**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de São José do Rio Preto para  
obtenção do Título de Doutor no  
Programa de Pós-graduação em Ciências  
da Saúde, Eixo temático: Medicina e  
Ciências Correlatas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eny Maria Goloni Bertollo

São José do Rio Preto  
2017

Maniglia, Mauricio Pereira

“Análise molecular de polimorfismos dos genes da família *GST* em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço tratados com quimioterapia e/ou radioterapia”.

São José do Rio Preto, 2017.

88 p

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eny Maria Goloni-Bertollo

1. Polimorfismo genético; 2. Xenobióticos; 3. Glutathione transferase; 4. Câncer de cabeça e pescoço; 5. Radioterapia; 6. Quimioterapia.

Mauricio Pereira Maniglia

**ANÁLISE MOLECULAR DE  
POLIMORFISMOS DOS GENES DA  
FAMÍLIA GST EM PACIENTES COM  
CARCINOMA ESPINOCELULAR DE  
CABEÇA E PESCOÇO TRATADOS COM  
QUIMIOTERAPIA E/OU RADIOTERAPIA**

**BANCA EXAMINADORA**

**TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
DOUTOR**

**Presidente e Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eny Maria Goloni  
Bertollo

**1º Examinador:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patricia Matos Biselli Chicote

**2º Examinador:** Prof. Dr. Fernando Drimel Molina

**3º Examinador:** Prof. Dr. Lucas Gomes Patrocinio

**4º Examinador:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flavia Cristina R. Lisoni

**1º Suplente:** Prof. Dr. José Victor Maniglia

**2º Suplente:** Prof. Dr. Atílio Maximino Fernandes

São José do Rio Preto, 28/11/2017.

## Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	01
2. Casuística e Métodos.....	08
2.1. Caracterização da amostra.....	09
2.2. Caracterização dos aspectos clínicos.....	11
2.3. Análise Molecular.....	12
2.3.1. Extração de DNA a partir de sangue total e quantificação das amostras por espectrofotometria.....	12
2.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex ( <i>Polymerase Chain Reaction – PCR</i> ).....	13
2.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição ( <i>Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism – PCR-RFLP</i> ).....	13
2.4. Análise estatística.....	15
3. Resultados.....	17
4. Discussão.....	27
5. Conclusões.....	37

6. Referências Bibliográficas.....	39
7. Anexos.....	51
Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	52
Anexo 2. Questionário para o grupo controle.....	53
Anexo 3. Questionário para o grupo caso.....	54
Anexo 4. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CEP).....	55
Anexo 5. Artigo científico: Molecular analysis of <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTP1</i> A313G and <i>GSTP1</i> C341T polymorphisms in head and neck squamous cell carcinoma treated with chemotherapy and/or radiotherapy.....	60

## ***Dedicatória***

### ***Aos meus pais José Victor e Regina***

*Pela minha vida e todo o cuidado comigo e meus irmãos; se esforçando para nos proporcionar a melhor educação e preparação para vida, pelos exemplos de suas vidas, dedicação ao trabalho, dignidade, e principalmente pelas muitas superações que vocês nos ensinaram a passar ao longo da vida.*

### ***Aos meus irmãos Luciano e Cláudia***

*Pela amizade verdadeira e incondicional, pelo apoio nos momentos bons e principalmente no mais difíceis.*

### ***À minha esposa Caroline***

*Por estar sempre ao meu lado há mais de 17 anos, desde a época da faculdade; estudando juntos e traçando nossos futuros nas residências médicas, passando por muitos momentos de realizações e felicidade e também pela maior dificuldade de nossa vida, uma grande perda, nossa primeira filha Valentina. Não foi fácil mas juntos criamos forças e conseguimos levar para nossa casa a Isabela e o Victor. Te amo muito.*

### ***Aos meus filhos Valentina, Isabela e Victor***

*Valentina, mesmo estando longe, você continua muito viva na nossa vida, te amo muito. Saudades. Isabela, nosso verdadeiro anjo, veio para salvar o papai e a mamãe da tristeza profunda; papai ama você, continue sendo esta pessoa maravilhosa e amada por todos. Victor, outro anjo em nossas vidas, iluminando nossas vidas, papai ama você.*

### ***À minha avó Fernanda Simões Pereira***

*Pelo amor e afeto demonstrados por toda a minha vida, sendo exemplo de como viver a vida de forma saudável, aos 94 anos com uma saúde impressionante. Obrigado por tudo.*

### ***Aos todos meus familiares e amigos***

*Pelos momentos de alegria e tristeza em que estivemos juntos.*

## ***Agradecimentos***

### ***À Deus***

*Por ajudar a passar os momentos difíceis, fazendo acreditar que algo de bom iria acontecer.*

### ***Ao Diretor Geral Prof. Dr. Dulcimar Donizete de Souza***

*Por dirigir a instituição com extrema competência, sempre estimulando melhorias com incentivos ao ensino acadêmico e estudos científicos .*

### ***Ao Diretor do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da FAMERP Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira***

*Pela organização realizada em conjunto com toda sua equipe. Pela receptividade de todos os funcionários, disponibilidade em informar e ajudar, agradecimento especial a todos que trabalham no curso de pós-graduação da Instituição.*

### ***À Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo***

*Por todas as orientações, por sua disponibilidade em ensinar e sua dedicação ao ensino; desenvolvendo um trabalho impressionante na Instituição, contribuindo com artigos científicos de alta qualidade. Pela receptividade.*

### ***À Profa. Dra. Patrícia Matos Biselli Chicote***

*Pela sua colaboração científica, paciência para ensinar, sempre disposta a ajudar e corrigir sendo fundamental para a conclusão deste trabalho.*

### ***À Profa. Dra. Anelise Russo***

*Pelas sua forma de ensinar, fazendo-me compreender de forma simples algo que julgava extremamente complexo, por todo o seu esforço e dedicação, sua ajuda foi essencial para a conclusão do trabalho.*

***À mestranda Gabriela***

*Pela disponibilidade em mostrar todo o funcionamento do laboratório Unidade de Pesquisa e Biologia Molecular – UPGEM da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP e pela paciência em me ensinar a extração do DNA através do sangue periférico.*

***Ao Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto***

*A todos os médicos docentes do serviço, aos residentes e enfermeiras pela colaboração no atendimento aos pacientes, e na obtenção das amostras colaborando com este trabalho.*

***Ao Hemocentro do Hospital de Base – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto***

*Pela colaboração, paciência na obtenção das amostras de sangue dos indivíduos doadores e disposição auxiliando nas coletas.*

***Aos pacientes do ambulatório e às pessoas doadoras de sangue***

*Por consentirem em participar da pesquisa e por acreditarem que com pesquisas muitas doenças podem ser melhor compreendidas e tratadas.*

***À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)***

*Pelo auxílio financeiro para compra do material necessário para realização desta pesquisa.*

***Aos membros da banca examinadora:***

*Pela disponibilidade e sugestões construtivas colaborando na correção da dissertação.*

***A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.***



*Epígrafe*

*“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.”*

*Albert Einstein*

---

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo do metabolismo de xenobióticos e suas principais enzimas.....	4
<b>Figura 2.</b> Fluxograma de trabalho do presente estudo.....	10
<b>Figura 3.</b> Curva de <i>Kaplan-Meier</i> para análise de recidiva dos pacientes submetidos a tratamento em relação aos polimorfismos <i>GSTMI</i> (A), <i>GSTT1</i> (B), <i>GSTP1</i> A313G (C) e <i>GSTP1</i> C341T (D). ....	25
<b>Figura 4.</b> Curva de <i>Kaplan-Meier</i> para análise de sobrevida dos pacientes submetidos a tratamento em relação ao polimorfismo <i>GSTMI</i> (A), <i>GSTT1</i> (B), <i>GSTP1</i> A313G (C) e <i>GSTP1</i> C341T (D). ....	26

## Lista de Tabelas e Quadros

<b>Tabela 1.</b> Grupamento de TNM por estadio de acordo com Manual de Oncologia 3 <sup>a</sup> ed., 2008, UICC 7 <sup>a</sup> ed., 2009 e AJCC 7 <sup>a</sup> ed., 2009.....	12
<b>Tabela 2.</b> Características sócio-demográficas, fatores de risco e polimorfismos <i>GSTT1</i> , <i>GSTMI</i> , <i>GSTP1</i> A313G e <i>GSTP1</i> C341T em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e controles.....	19
<b>Tabela 3.</b> Frequências dos haplótipos dos polimorfismos A313G e C341T do gene <i>GSTP1</i> em pacientes com CECP e controles.....	20
<b>Tabela 4.</b> Polimorfismos <i>GSTT1</i> , <i>GSTMI</i> , <i>GSTP1</i> A313G e <i>GSTP1</i> C341T em relação aos sítios primários dos tumores de câncer de cabeça e pescoço.....	22
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros clínico-histopatológicos em relação aos polimorfismos <i>GSTT1</i> , <i>GSTMI</i> , <i>GSTP1</i> A313G e <i>GSTP1</i> C341T em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.....	23
<b>Tabela 6.</b> Polimorfismos <i>GSTT1</i> , <i>GSTMI</i> , <i>GSTP1</i> A313G e <i>GSTP1</i> C341T em relação à recidiva e sobrevida de pacientes com câncer de cabeça e pescoço.....	24
<b>Quadro 1.</b> Comparação entre os dados do presente estudo e os dados dos estudos apresentados na discussão.....	34

## Lista de abreviaturas e símbolos

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AJCCC	<i>American Joint Committee for Cancer</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior
CECP	Carcinoma Espinocelular de Cabeça e Pescoço
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CYPs	Citocromo P450 ( <i>Cytocrome P450</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto ( <i>São José do Rio Preto Medical School</i> )
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
GP-Ps	Glicoproteínas-P ( <i>P-glycoproteins</i> )
GSTs	Glutathione-S-Transferases ( <i>Glutathione-S-transferases</i> )
HPV	<i>Human Papiloma Virus</i>
HWE	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> ( <i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i> )
INCA	Instituto Nacional do Câncer ( <i>Brazilian National Cancer Institute</i> )

---

MDR	<i>Multiple Drug Resistance</i>
mEH	Epóxide Hidrolase Microsomal ( <i>Microsomal epoxide hydrolases</i> )
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NATs	N-acetiltransferases ( <i>N-acetyltransferases</i> )
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
OATs	Transportadores Ânion Orgânico
OCTs	Transportadores Cátion Orgânico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction–Restriction</i> )
PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição ( <i>Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism – PCR-RFLP</i> )
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos ( <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> )
TNM	Tamanho do tumor; Comprometimento de linfonodos; Metástase à distância
UGTs	UDP-glucoroniltransferases
UICC	<i>International Union of Cancer Control</i>
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular

## RESUMO

**Introdução:** O câncer de cabeça e pescoço está entre os dez tipos de câncer mais frequentes no Brasil, assim, responsável por alto índice de mortalidade no país. Polimorfismos em genes de enzimas metabolizadores de xenobióticos como a família glutationa-S-transferases (GSTs) podem levar à diminuição da habilidade para inativar carcinógenos (substâncias de álcool e cigarro) ativados e aumentar o risco para o câncer, além de influenciar na resposta ao tratamento de quimioterapia e/ou radioterapia dessa doença. **Objetivo:** Investigar a associação entre os genótipos nulos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e os polimorfismos A313G e C341T do gene *GSTP1* e o câncer de cabeça e pescoço; verificar a associação entre esses polimorfismos e o sítio anatômico de ocorrência do tumor e características clinico-patológicas dos pacientes com este tipo de câncer tratados com quimioterapia e/ou radioterapia; avaliar a influência dos polimorfismos no tempo livre de recidiva e sobrevida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados com quimioterapia e/ou radioterapia. **Casuística e Métodos:** Foram incluídos no estudo retrospectivo caso-controle 711 indivíduos; 197 pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço pelo Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base de São José do Rio Preto (FAMERP/HB) e 514 indivíduos sem história de neoplasia provenientes do Hemocentro (FAMERP/HB). As variáveis analisadas foram: gênero, idade, hábitos tabagista e etilista, sítio anatômico do tumor, características clinico-patológicas do tumor e tratamento com quimioterapia e/ou radioterapia. A genotipagem dos polimorfismos foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *GSTM1* e *GSTT1*, e por PCR-Polimorfismos de Comprimentos de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) para os polimorfismos A313G e C341T do gene *GSTP1*. No gene *GSTP1* foram

avaliadas as frequências genótípicas dos polimorfismos A313G e C341T para o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE), por Teste Qui-quadrado e análise dos haplótipos. Teste de Regressão Logística Múltipla foi realizado para determinar o efeito das variáveis analisadas no câncer de cabeça e pescoço. **Resultados:** Frequências genótípicas dos polimorfismos *GSTP1* A313G e C341T se apresentaram em HWE em ambos grupos (caso e controle,  $p > 0,05$ ); os haplótipos *GSTP1 A313G/C341T* diferiram significativamente entre grupos caso e controle (Grupo caso: A313/C341,  $p = 0,013$ ; A313/T341,  $p = 0,019$ ; Grupo controle: G313/C341,  $p = 0,015$ ). Idade avançada ( $\geq 59$ ,  $p < 0,001$ ), gênero masculino ( $p = 0,040$ ), hábitos tabagista ( $p < 0,001$ ) e etilista ( $p < 0,001$ ), polimorfismos *GSTT1* ( $p < 0,001$ ), *GSTM1* ( $p < 0,001$ ), *GSTP1* A313G ( $p = 0,037$ ) mostraram significância no risco para câncer de cabeça e pescoço. O polimorfismo *GSTP1* C341T ( $p = 0,688$ ) não mostrou significância com o risco para este tipo de câncer. Os polimorfismos não foram associados com o sítio anatômico, características clinico-patológicas do tumor, tempo livre de recidiva e sobrevida dos pacientes ( $p > 0,05$ ). **Conclusão:** A presença do genótipo nulo *GSTM1* está associada com aumento do risco para o câncer de cabeça e pescoço, enquanto o genótipo nulo *GSTT1* e o polimorfismo *GSTP1* A313G contribuem para a redução do risco neste tipo tumoral. Os polimorfismos *GSTs* investigados não estão associados com características clinico-patológicas do tumor, tempo livre de recidiva ou sobrevida dos pacientes tratados com quimioterapia e/ou radioterapia. Estudos futuros com ampliação do grupo amostral poderão contribuir para o esclarecimento do papel dos polimorfismos em genes da família *GST* nas diferenças individuais dos pacientes em resposta aos tratamentos de quimioterapia e/ou radioterapia e identificar biomarcadores de suscetibilidade.

**Palavras chave:** Polimorfismo genético; Xenobióticos; Glutathione transferase; Câncer de cabeça e pescoço; Quimioterapia; Radioterapia.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Head and neck cancer are among the ten most common types of cancer in Brazil, accounting for a high mortality rate in the country. Polymorphisms in genes of xenobiotic metabolizing enzymes such as the glutathione-S-transferases (GSTs) family may lead to decreased ability to inactivate activated carcinogens (alcohol and cigarette substances) and increase the risk for cancer, in addition to influencing the response to treatment of chemotherapy and/or radiotherapy of this disease. **Objective:** To investigate the association between *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes and the A313G and C341T polymorphisms of the *GSTP1* gene and head and neck cancer; to verify the association between these polymorphisms and anatomical site of tumor occurrence and clinical-pathological characteristics of patients with this type of cancer treated with chemotherapy and/or radiotherapy; to evaluate the influence of polymorphisms in relapse-free and survival time of patients with head and neck cancer treated with chemotherapy and/or radiotherapy. **Patients and Methods:** In this retrospective case-control study, 711 subjects were included, 197 patients diagnosed with head and neck squamous cell carcinoma by Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery Service of Base Hospital, São José do Rio Preto (FAMERP/HB) and 514 individuals with no history of neoplasia from the Hemocenter (FAMERP/HB). The variables analyzed were: gender, age, smoking habit and alcohol consumption, anatomical site of tumor clinical-pathological features of the tumor and treatment with chemotherapy and/or radiotherapy. Genotyping of the polymorphisms was performed by Polymerase Chain



Reaction (PCR) for *GSTMI* and *GSTT1* and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) for A313G and C341T polymorphisms of the *GSTP1* gene. In the *GSTP1* gene genotype frequencies of the A313G and C341T polymorphisms were evaluated for Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE), Chi-square test and haplotype analysis. Multiple Logistic Regression Test was performed to determine the effect of the variables analyzed on head and neck cancer. **Results:** Genotypic frequencies of *GSTP1* A313G and C341T polymorphisms showed in HWE in both groups (case and control,  $p > 0.05$ ); the *GSTP1* A313G/C341T haplotypes differed significantly between case and control groups (Case group: A313/C341,  $p = 0.013$ ; A313/T341,  $p = 0.019$ ; Control group: G313/C341,  $p = 0.015$ ). Advanced age ( $\geq 59$ ,  $p < 0.001$ ), male gender ( $p = 0.040$ ), smoking habit ( $p < 0.001$ ), alcohol consumption ( $p < 0.001$ ), *GSTT1* ( $p < 0.001$ ), *GSTMI* ( $p < 0.001$ ), *GSTP1* A313G ( $p = 0.037$ ) polymorphisms showed significance in the risk for head and neck cancer. The *GSTP1* C341T polymorphism ( $p = 0.688$ ) did not show significance with the risk for this type of cancer. Polymorphisms were not associated with the anatomical site, clinical-pathological features of the tumor, relapse-free, and patient survival time ( $p > 0.05$ ). **Conclusion:** The presence of the null genotype *GSTMI* is associated with increased risk for head and neck cancer, while the null genotype *GSTT1* and *GSTP1* A313G contributes to the reduction of risk in this tumor type. The *GSTs* polymorphisms investigated are not associated with clinical-pathological features of the tumor, relapse-free or survival time of patients treated with chemotherapy and/or radiotherapy. Further studies with amplification of the sample group may contribute to the clarification of the role of polymorphisms in *GST* family genes in individual differences of patients in

response to chemotherapy and/or radiotherapy treatments and to identify biomarkers of susceptibility.

**Key words:** Genetic polymorphism, Xenobiotics, Glutathione transferase; Head and neck cancer, Chemotherapy, Radiotherapy.

## *1. INTRODUÇÃO*

---

## 1. INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) é um termo que engloba todas as neoplasias malignas localizadas na mucosa do trato aerodigestivo superior, estendendo-se desde a borda vermelha dos lábios até a cartilagem cricóide, incluindo a cavidade oral, partes nasal, oral e laríngea da faringe e laringe.<sup>(1-4)</sup>

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Iarc, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer no geral e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012 (INCA, 2017). No Brasil, a estimativa para os anos de 2016 e 2017 aponta para a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer. Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, estimam-se 420 mil casos novos de câncer.<sup>(5)</sup>

Os principais fatores de risco para o CECP incluem tabagismo, etilismo,<sup>(6,7)</sup> infecções por HPV, principalmente pelos tipos 16 e 18,<sup>(5,8-11)</sup> e exposição à radiação UVA solar (câncer de lábio).<sup>(5)</sup> Contudo, entre tais fatores, destacam-se o tabagismo e o etilismo.<sup>(5,12,13)</sup>

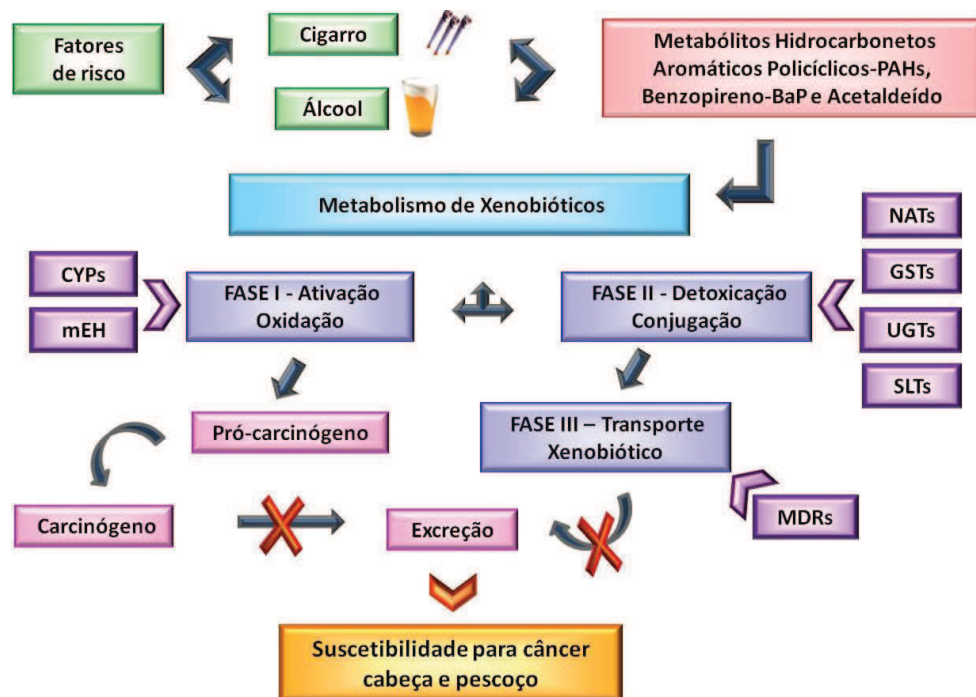
Os carcinógenos do cigarro e do álcool podem se ligar aos constituintes celulares e levar à formação de adutos de DNA.<sup>(13-16)</sup> Deste modo, o risco de desenvolver câncer de cavidade oral atribuído ao tabagismo e etilismo é de aproximadamente 65%. Além disso, pode-se observar sinergismo entre esses hábitos, o qual pode aumentar o risco para o câncer oral.<sup>(5)</sup>

Estudos mostram que polimorfismos nos genes que codificam as enzimas do metabolismo de drogas usadas na quimioterapia, podem causar variabilidade na resposta às drogas e modular o resultado do tratamento nos casos de CECP,<sup>(17-22)</sup> câncer de esôfago,<sup>(23)</sup> carcinoma de pulmão de células não pequenas,<sup>(24)</sup> câncer de mama,<sup>(25-27)</sup> e câncer colorretal.<sup>(28)</sup>

Em relação ao tratamento do câncer, tradicionalmente cirurgia, radioterapia e quimioterapia são as armas terapêuticas a disposição dos especialistas. A combinação e a ordem das mesmas depende de vários fatores.<sup>(29,30)</sup> O tratamento deve ser individualizado, devido à diferença na resposta ao tratamento como seus efeitos colaterais de indivíduo para indivíduo, causada pela variabilidade genética no metabolismo de drogas.<sup>(20,22)</sup> Além disso, deve-se levar em consideração o estágio, localização anatômica, tamanho do tumor, histologia e dados do paciente como idade, condição geral, ocupação e preferências.<sup>(5,29,30)</sup>

O metabolismo de drogas, também denominado de metabolismo de xenobióticos, envolve dois tipos de enzimas principais: as do metabolismo oxidativo mediado/Fase I, como citocromo P450 e mEH (*Microsomal epoxide hydrolase*) e as enzimas conjugadas/Fase II.<sup>(31)</sup> As reações da Fase II envolvem a conjugação com o substrato endógeno (glutathiona, sulfato, glicose, acetato) por meio das glutathiona-S-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos da Fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção.<sup>(32-34)</sup> A excreção de metabólitos para o controle homeostático e detoxificação de xenobióticos lipofílicos ocorre na Fase III.<sup>(35)</sup> As enzimas de Fase III são transportadores de membrana ativos, responsáveis pelo fluxo de compostos através das membranas celulares. As enzimas dessa fase incluem glicoproteína-P (GP-P),<sup>(36-38)</sup>

*ATP-binding cassette (ABC)*, *Solute carrier (SLC)*,<sup>(37)</sup> transportadores que secretam substâncias de carga elétrica positiva e negativa, Transportadores Cátion Orgânicos – OCTs, Transportadores Ânion Orgânicos – OATs.<sup>(36-39)</sup> As enzimas de fase III também podem participar na resistência de células tumorais a quimioterápicos, resultando no fenótipo conhecido como *Multiple Drug Resistance (MDR)*<sup>(37-38)</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema representativo do metabolismo de xenobióticos e suas principais enzimas – CYPs: Citocromos P450; mEH: Epóxide hidrolase microsossomal; NATs: N-acetiltransferases; GSTs: Glutathione-S-Transferases; UGTs: UDP-Glucoroniltransferases; SLTs: Sulfotransferases; “MDRs: Multiple Drug Resistences”.<sup>(39)</sup>

Variações genéticas das glutathionas S-transferases tem sido associadas a mudanças na atividade enzimática. Os genes da família *GST* são agrupados em oito classes baseado na estrutura, substrato específico e propriedades imunológicas: *alpha*, *mu*, *kappa*, *pi*, *sigma*, *theta*, *zeta* e *omega*.<sup>(40-42)</sup> O gene *GSTM1* (região cromossômica

1p13.1) é polimórfico na população humana e 20 a 50% dos indivíduos não expressam a enzima devido a uma deleção gênica em homozigose (*GSTM1\* 0*).<sup>(43)</sup> A frequência de indivíduos que não expressam a enzima é mais alta em caucasóides e asiáticos do que em africanos.<sup>(44)</sup> O gene *GSTT1* (região cromossômica 22q11.2) também é polimórfico na população humana, apresentando fenótipo nulo por deleção (*GSTT1\* 0*) e consequente perda completa da atividade enzimática. Aproximadamente 60% dos asiáticos, 40% dos africanos e 20% dos caucasóides não expressam esta enzima.<sup>(45,46)</sup>

O gene *GSTP1* é um gene polimórfico localizado no cromossomo 11 com duas substituições, uma no éxon 5 (A313G) e uma no éxon 6 (C341T), que resultam respectivamente nas substituições de aminoácidos Ile105Val e Ala114Val. Estas substituições causam alterações nas atividades catalíticas da enzima e podem estar associadas ao aumento de aduto de DNA, aumentando o risco de câncer.<sup>(47)</sup>

Ruwali e colaboradores no ano 2009 investigaram a influência genética dos polimorfismos *CYP2A6\*1B* e *CYP2A6\*4C* do gene *CYP2A6* e o polimorfismo A313G *GSTP1* no CECP e encontraram baixa resposta ao tratamento de quimioterapia com cisplatina, nos casos em que os genótipos variantes de *CYP2A6* ou genótipo selvagem AA313 *GSTP1* têm demonstrado o papel dos polimorfismos nestes genes em prever a resposta de um indivíduo à quimioterapia, e assim, podem contribuir na delimitação do tratamento quimioterápico apropriado.<sup>(22)</sup>

Fatores genéticos como polimorfismos em genes que codificam as enzimas da Fase I e da Fase II podem alterar sua expressão ou função, influenciar no metabolismo de drogas e modificar a ativação ou detoxificação de compostos carcinogênicos.<sup>(32-34,48)</sup>

Assim, estudos sobre a presença dos polimorfismos em indivíduos com diferença na resposta aos tratamentos de quimioterapia e consequentemente radioterapia, tempo de

recidiva livre e tempo de sobrevida são importantes para identificar biomarcadores para suscetibilidade ao CECP.



## OBJETIVOS

Considerando as evidências apresentadas, este estudo teve como objetivos:

1. Investigar a associação dos genótipos nulos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) A313G e C341T do gene *GSTP1* com o câncer de cabeça e pescoço;
2. Verificar a associação entre os polimorfismos e o sítio anatômico de ocorrência do tumor e características clínico-patológicas dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados com quimioterapia e/ou radioterapia.
3. Avaliar a influência dos polimorfismos no tempo livre de recidiva e sobrevida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados com quimioterapia e/ou radioterapia.

## 2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

## 2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 2. 1. Caracterização da amostra

No presente estudo retrospectivo caso-controle foram incluídos 711 indivíduos, 197 pacientes diagnosticados com CECP em acompanhamento no Ambulatório de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do complexo médico hospitalar FAMERP/FUNFARME, na cidade de São José do Rio Preto – SP foram incluídos no grupo caso e 514 indivíduos saudáveis sem histórico de neoplasia constituindo o grupo controle, provenientes do Hemocentro do Hospital de Base de São José do Rio Preto.

Todas as amostras foram obtidas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). Os dados de pacientes e controles foram coletados por meio de questionários padronizados (Anexos 2 e 3). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), parecer N° 697.896 (Anexo 4).

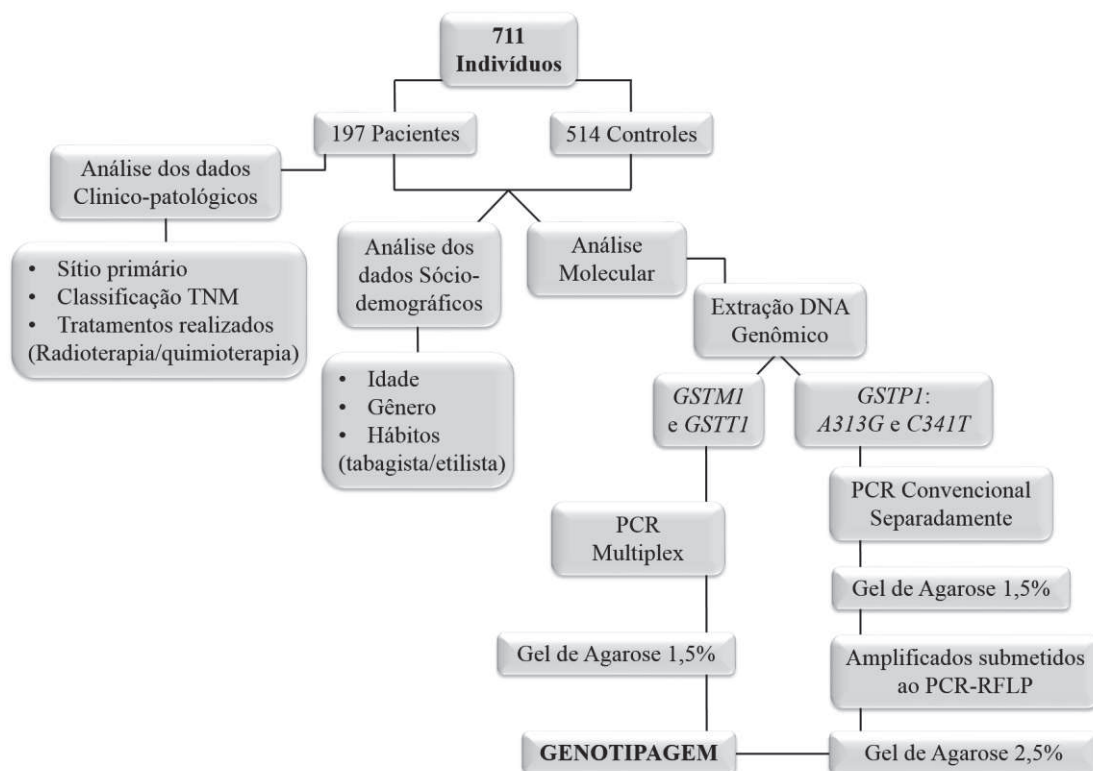
Os critérios de inclusão dos pacientes no grupo caso do estudo corresponderam a confirmação patológica por biópsia de tumores primários diagnosticados como carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP), tratados com quimioterapia e/ou radioterapia, no Hospital referência da região sudoeste do estado de São Paulo pelos serviços de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Oncologia da FAMERP/FUNFARME. Os critérios de exclusão do grupo caso foram os pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço de tipo histológico diferente do espinocelular e pacientes que não foram submetidos aos tratamentos de quimioterapia e/ou radioterapia.

Para o grupo controle os critérios de inclusão foram indivíduos saudáveis com idade  $\geq 40$  anos independente do gênero e etnia sem câncer ou história de neoplasia na

família. Os critérios de exclusão do grupo controle foram indivíduos com queixas relacionadas à saúde, alterações em exames de hemograma, de doenças infecto-contagiosas, portadores de doenças crônicas e com história de câncer na família.

No estudo, foram considerados não fumantes os indivíduos que fumaram <100 cigarros na vida e etilista os indivíduos que consumiram mais de quatro doses por semana (uma dose corresponde: licor - 30mL; copo de vinho - 102mL, contendo 12% de álcool; ou lata de cerveja - 340mL).<sup>(49,50)</sup>

As atividades foram realizadas conforme apresentadas no fluxograma de trabalho (Figura 2).



**Figura 2.** Fluxograma de trabalho do presente estudo.

As variáveis analisadas foram gênero, idade, hábitos tabagista e etilista, sítio primário e características clínico-patológicas do tumor. O tratamento dos pacientes

incluiu radioterapia e/ou quimioterapia e os principais quimioterápicos utilizados foram cisplatina, metotrexato e 5-fluorouracil.

## 2. 2. Caracterização dos aspectos clínicos

De acordo com a classificação de Lee 2012, as neoplasias foram divididas para sítio primário em cavidade oral, faringe e laringe.<sup>(52)</sup> Os critérios do Comitê Americano de Câncer (*American Joint Committee for Cancer – AJCC*, 2009) e da União Internacional Contra o Câncer (*Union International Control Cancer – UICC*, 2002) para a classificação do tumor envolvem tamanho (T), presença de linfonodos adjacentes comprometidos (N) e presença de metástase (M).<sup>(52-54)</sup>

A classificação T foi dividida em tumores com pequena extensão (T1, T2) e com grande extensão (T3, T4). A classificação N foi dicotomizada em comprometimento de linfonodos negativo (N0) e positivo (N1, N2, N3). Os estádios foram divididos em não avançados (estádios I e II) e avançados (III e IV) apresentados na Tabela 1.<sup>(52-54)</sup>

O diagnóstico, sítio anatômico primário e a classificação do TNM e demais informações clínicas foram obtidas por meio de prontuário médico dos pacientes incluídos no estudo.

**Tabela 1.** Grupamento de TNM por estadio de acordo com Manual de Oncologia 3<sup>a</sup> ed., 2008, UICC 7<sup>a</sup> ed., 2009 e AJCC 7<sup>a</sup> ed., 2009.<sup>(52-54)</sup>

<b>Estádio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
0	T <sub>is</sub>	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IVA	T1-T3	N2	M0
	T4a	N0-2	M0
IVB	Qualquer T	N3	M0
	T4b	Qualquer N	M0
IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

### 2.3. Análise Molecular

#### 2.3.1. Extração de DNA a partir de sangue total e quantificação das amostras por espectrofotometria

O DNA genômico foi extraído de 8ml sangue periférico total, de acordo com a técnica de Salazar (1988).

As amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 260 nm e 280 nm. O grau de pureza das amostras foi verificado por meio das razões 260/280 e 260/230, que indica a presença de proteínas e outros contaminantes. Todas as amostras apresentaram pureza desejada.

### 2.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex (*Polymerase Chain Reaction – PCR*)

#### Polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1*

A análise dos polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* foi realizada pela técnica de PCR multiplex, usando o gene *CYP1A1* como controle positivo interno de amplificação com *primers* específicos (*GSTT1*-sense: 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' e anti-sense: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'; *CYP1A1*-sense: 5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT-3' e anti-sense: 5'-CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC-3' e *GSTM1*-sense: 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' e anti-sense: 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3').<sup>(55)</sup> A reação foi realizada em volume final de 50µL, contendo 0,2µM de cada primer (*GSTT1* e *GSTM1*), e 0,1mM de cada primer (*CYP1A1*), 0,4mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 10mM de Tris-HCl, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 1,5U da enzima Taq DNA polimerase e 200ng de DNA. A amplificação das sequências de DNA de interesse foram obtidas após 35 ciclos que compreenderam etapas de desnaturação do DNA a 94°C por dois minutos, anelamento dos primers a 59°C por um minuto e extensão das cadeias de DNA a 72°C por um minuto. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

### 2.3.3. Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (*Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism – PCR-RFLP*)

#### Polimorfismo A313G do gene *GSTP1*

A análise do polimorfismo *GSTP1* A313G foi realizada por PCR convencional utilizando-se os *primers* descritos por Harries et al. (1997) (Sense: 5'-ACCCAGGGCTCTATGGGAA-3'; Anti-sense: 5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3').<sup>(56)</sup> A reação foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10mM de Tris-HCl, 0,2 pmoles/µL de cada *primer*, 1,5U de Taq DNA polimerase, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, e 100 ng de DNA genômico. A amplificação foi obtida com desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos que compreenderam etapas de 94°C por 60 segundos para desnaturação do DNA, de 62°C por 3 minutos para anelamento dos *primers* e 72°C por 90 segundos para extensão das cadeias. Um último ciclo de 7 minutos a 72°C foi realizado para extensão final das cadeias. Os produtos de PCR de 176 pares de bases (pb) foram analisados à eletroforese em agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

Os produtos de PCR foram submetidos à digestão pela enzima *Bsmal* concluindo a segunda etapa da técnica PCR-RFLP. Os produtos de digestão enzimática foram analisados após eletroforese em agarose 2,0%, corado com brometo de etídeo. A presença de bandas de 91 e 85 pb, corresponde ao genótipo polimórfico GG, as bandas de 176, 91 e 85 pb correspondem ao genótipo heterozigoto AG e a banda de 176 pb, corresponde ao genótipo selvagem AA.

### **Polimorfismo C341T do gene *GSTP1***

A análise deste polimorfismo foi realizada por PCR convencional utilizando-se os *primers* descritos por Watson et al. em 1998 (Sense: 5'-GGGAGCAAGCAGAGGAGAAT-3'; Anti-sense: 5'-



CAGGTTGTAGTCAGCGAAGGAG-3').<sup>(57)</sup> A reação foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10mM de Tris-HCl, 0,2 pmoles/µL de cada *primer*, 1,5U de Taq DNA polimerase, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, e 100 ng de DNA genômico. A amplificação foi obtida com desnaturação inicial à 95°C por 12 minutos, seguida de 40 ciclos que compreenderam etapas de 95°C por 30 segundos para desnaturação do DNA, de 50°C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 60 segundos para extensão das cadeias. Um último ciclo de 5 minutos a 72°C foi realizado para extensão final das cadeias. Os produtos de PCR de 420 pares de bases (pb) foram analisados à eletroforese em agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

Os produtos de PCR foram submetidos à digestão pela enzima *AclI* para a segunda etapa da técnica PCR-RFLP. Os produtos de digestão enzimática foram analisados após eletroforese em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídeo. A presença de bandas de 365 e 55 pb corresponde ao genótipo polimórfico TT, as bandas de 365, 247, 118 e 55 pb correspondem ao genótipo heterozigoto CT e as bandas de 247, 118 e 55 pb corresponde ao genótipo selvagem CC.

#### **2.4. Análise estatística**

Os dados demográficos foram tabulados por porcentagem. As frequências genotípicas dos polimorfismos *GSTP1* A313G e C341T foram avaliadas para o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (*Hardy-Weinberg Equilibrium* - HWE) pelo Teste Qui-quadrado, utilizando o programa *BioEstat*, versão 5.0. A análise de haplótipos dos polimorfismos *GSTP1* A313G e C341T foi realizada utilizando o programa Haploview

versão 4.2. O Teste de Regressão Logística Múltipla utilizado o programa *Minitab* (versão 16) foi realizado para determinar o efeito das variáveis analisadas no câncer de cabeça e pescoço. A análise incluiu: idade (referência: < mediana do grupo caso), gênero (referência: feminino), hábito tabagista (referência: não fumantes) e hábito etilista (referência: não etilistas).

A influência dos polimorfismos nas características clínico-patológicas do tumor foi analisada por meio do Teste de Regressão Logística Binária. Em relação ao tamanho (T), os tumores foram classificados em T1 e T2 (pequena extensão) e T3 e T4 (grande extensão). De acordo com o comprometimento de linfonodos regionais (N) foi classificado em negativo (N0) e positivo (N1, N2 e N3). O tumor foi classificado em M0 (ausência de metástases à distância) e M1 (com metástases). O efeito dos polimorfismos no tempo de recidiva e sobrevida dos pacientes com CECP foi analisado por meio da Curva de *Kaplan Meier* e teste *Log Rank*. Os resultados foram apresentados em Odds Ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC – 95%). O nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p \leq 0,05$ ).

### *3. RESULTADOS*

---

### 3. RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão apresentados na forma de artigo científico no Anexo 5, nas normas da revista científica internacional *Oral Oncology* classificada como A2 atualmente pelo Qualis periódicos da CAPES, na qual será realizada a submissão para publicação.

O estudo analisou 197 pacientes e 514 controles. A mediana de idade foi de 59 anos, com variação de 34 a 83 anos no grupo caso e 44 anos, com variação de 24 a 90 anos no grupo controle. O gênero masculino foi predominante em ambos os grupos caso (90%) e controle (71,8%).

A Tabela 2 apresenta os resultados da análise de Regressão Logística Múltipla para as características sócio-demográficas, fatores de risco e polimorfismos. Idade  $\geq 59$  anos (OR = 11,66; IC 95% = 6,51 – 20,86;  $p < 0,001$ ) e gênero masculino (OR = 2,13; IC 95% = 1,03 – 4,38;  $p = 0,04$ ) mostraram-se como fatores de risco para esse tipo tumoral. Houve associação entre o hábito tabagista (OR = 11,00; IC 95% = 5,71 – 21,20;  $p < 0,001$ ) e consumo de álcool (OR = 4,14; IC 95% = 2,25 – 7,64;  $p < 0,001$ ) e maior risco de desenvolver CECP. Portadores do genótipo *GSTM1* nulo apresentaram maior risco de desenvolver a doença (OR = 4,27; IC 95% = 2,60 – 7,00;  $p < 0,001$ ). Por outro lado, o polimorfismo *GSTT1* apresentou associação com risco reduzido para o CECP (OR = 0,30; IC 95% = 0,18 – 0,51;  $p < 0,001$ ). O polimorfismo A313G do gene *GSTP1* também foi associado com diminuição do risco para CECP (OR = 0,60; IC 95% = 0,37 – 0,97;  $p = 0,037$ ).

As frequências genóticas dos polimorfismos *GSTP1* A313G e C341T estão em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos ( $p > 0,05$ ). Os polimorfismos *GSTP1* A313G e C341T apresentam desequilíbrio de ligação (*logarithm of odds* (LOD)

**Tabela 2.** Características sócio-demográficas, fatores de risco e polimorfismos *GSTT1*, *GSTMI*, *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e controles.

	Caso	Controle	OR <sup>+</sup>	IC 95% <sup>++</sup>	Valor de p
<b>Idade</b>					
< 59	97 (49%)	448(87%)		Referência	
≥ 59	100 (51%)	66 (13%)	11,66	6,51-20,86	< 0,001
<b>Gênero</b>					
Feminino	20 (10%)	145 (28%)		Referência	
Masculino	177 (90%)	369 (72%)	2,13	1,03– 4,38	0,040
<b>Tabagismo</b>					
Não	20 (10%)	309 (60%)		Referência	
Sim	177 (90%)	205 (40%)	11,00	5,71 – 21,20	< 0,001
<b>Etilismo</b>					
Não	28 (14%)	260 (51%)		Referência	
Sim	169 (86%)	254 (49%)	4,14	2,25 – 7,64	< 0,001
<b><i>GSTT1</i></b>					
Positivo	133 (67%)	402 (78%)		Referência	
Negativo	64 (33%)	112 (22%)	0,30	0,18 – 0,51	< 0,001
<b><i>GSTMI</i></b>					
Positivo	98 (50%)	275 (53%)		Referência	
Negativo	99 (50%)	239 (47%)	4,27	2,60 – 7,00	< 0,001
<b><i>GSTP1</i> A313G*</b>					
AA	101 (57%)	227 (44%)		Referência	
AG/GG	77 (43%)	287 (56%)	0,60	0,37 – 0,97	0,037
<b><i>GSTP1</i> C341T**</b>					
CC	173 (90%)	460 (89%)		Referência	
CT/TT	20 (10%)	54 (11%)	0,85	0,39 – 1,86	0,688

<sup>+</sup>OR = Odds Ratio. <sup>++</sup>IC 95% = Intervalo de confiança de 95%. \*A amplificação foi possível para 178 pacientes do grupo caso. \*\* A amplificação foi possível para 193 pacientes do grupo caso.

= 9,84; *Lewontin's D'* ( $D'$ ) = 0,657;  $X^2 = 0,053$ ). As frequências dos haplótipos *GSTPI* A313G/C341T diferiram significativamente entre os grupos caso e controle (Tabela 3). Os alelos selvagens para ambos os polimorfismos foram mais frequentes no grupo caso em relação ao grupo controle (0,72 *versus* 0,65;  $P = 0,013$ ). O haplótipo AT também apresentou maior frequência no grupo caso (0,03 *versus* 0,009;  $p = 0,019$ ). No grupo controle, o haplótipo GC foi mais frequente (0,23 *versus* 0,30;  $p = 0,015$ ).

**Tabela 3.** Frequências dos haplótipos dos polimorfismos A313G e C341T do gene *GSTPI* em pacientes com CECP e controles.

Polimorfismos <i>GSTPI</i> A313G / C341T			
Haplótipo	CECP	Controle	Valor de p
AC	0,72	0,65	0,013
GC	0,23	0,30	0,015
GT	0,03	0,05	0,085
AT	0,03	0,009	0,019

Em relação ao sítio anatômico, foram observados 44% de tumores na cavidade oral, 32% na laringe, 19% na faringe e 5% dos indivíduos possuíam tumor de origem desconhecida. Em relação ao tamanho do tumor, 57% apresentaram tumores de grande extensão. (não foi possível a classificação na categoria T para seis tumores). Em 55% dos casos não houve comprometimento de linfonodos regionais (N0) (não foi possível a classificação na categoria N para dois tumores). Apenas 3% dos pacientes apresentaram metástases à distância (M1). A classificação em estadios foi possível para 194 pacientes.

Analisando o tratamento dos pacientes foi observado que o mais comum foi a associação de radioterapia e quimioterapia (69%), contra 26% e 5% para radioterapia exclusiva e quimioterapia exclusiva, respectivamente.

O estudo não mostrou associação entre os polimorfismos estudados e o sítio primário do tumor (Tabela 4). Também não foi encontrada nenhuma associação entre os genótipos e as características clinico-patológicas do tumor (Tabela 5).

A análise pela Curva de *Kaplan-Meier* mostrou que o número de pacientes que apresentaram recidiva em 12 meses portadores dos polimorfismos *GSTM1*, ou *GSTT1*, ou *GSTP1* não foi diferente estatisticamente do número de pacientes não portadores (Tabela 6; Figura 3).

O tempo de sobrevida de portadores do alelo polimórficos *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T não foi significativamente diferente do tempo de sobrevida dos não portadores (Tabela 6; Figura 4).

**Tabela 4.** Polimorfismos *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T em relação aos sítios primários dos tumores de câncer de cabeça e pescoço.

	Cavidade oral n = 87 (44%)			Laringe n = 64 (32%)			Faringe n = 37 (19%)		
	n(%)	OR <sup>+</sup> (IC95%)	p	n(%)	OR <sup>+</sup> (IC95%)	p	n(%)	OR <sup>+</sup> (IC95%)	p
<b><i>GSTM1</i></b>									
positivo	43 (49)	Referência		33 (51)	Referência		19 (51)	Referência	
negativo	44 (51)	0,98 (0,53-1,83)	0,955	31 (49)	1,02 (0,51-2,04)	0,945	18 (49)	0,78 (0,36-1,73)	0,545
<b><i>GSTT1</i></b>									
positivo	63 (72)	Referência		48 (75)	Referência		27 (73)	Referência	
negativo	24 (28)	0,83 (0,41-1,67)	0,596	16 (25)	0,77(0,35-1,70)	0,513	10 (27)	0,97 (0,40-2,38)	0,947
<b><i>GSTP1</i> A313G*</b>									
A/A	46 (57,5)	Referência		28 (50)	Referência		22 (59)	Referência	
A/G e GG	34 (42,5)	0,89 (0,48-1,67)	0,727	28 (50)	1,47 (0,74-2,93)	0,269	11 (41)	0,66 (0,29-1,48)	0,312
<b><i>GSTP1</i> C341T*</b>									
C/C	76 (90,5)	Referência		57 (90,5)	Referência		33 (91,6)	Referência	
C/T	09 (9,5)	1,07 (0,39-2,92)	0,899	06 (9,5)	0,48 (0,14-1,65)	0,243	03 (8,4)	1,44 (0,43-4,82)	0,554

<sup>+</sup>Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e hábitos etilista e tabagista. \* A amplificação não foi possível para todos os pacientes.



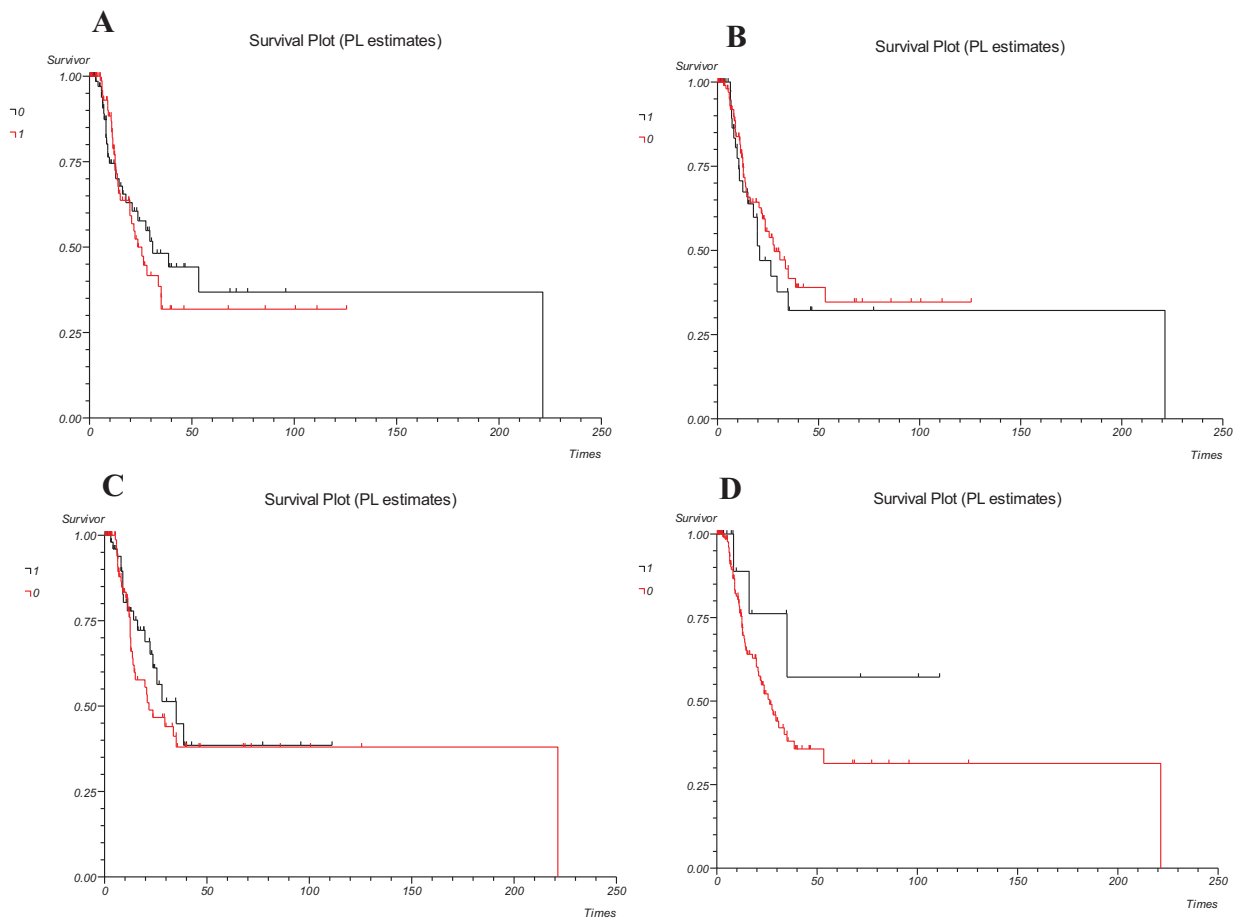
**Tabela 5.** Parâmetros clínico-histopatológicos em relação aos polimorfismos *GSTT1*, *GSTMI*, *GSTPI* A313G e *GSTPI* C341T em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

	Extensão Tumoral				Acometimento de linfonodos regionais				Progressão tumoral (TNM)			
	T1/T2 n(%)	T3/T4 n(%)	OR <sup>+</sup> (IC 95%)	p	N=0 n(%)	N≥1 n(%)	OR <sup>+</sup> (IC 95%)	p	Não avanzado n(%)	Avanzado n(%)	OR <sup>+</sup> (IC 95%)	p
<b><i>GSTMI</i></b>												
positivo	40 (51,3)	56 (49,5)	1,00		48 (44,8)	48 (54,5)	1,00		31 (50)	64 (48,5)	1,00	
negativo	38 (48,7)	57 (50,5)	1,06 (0,57-1,97)	0,86	59 (55,2)	40 (45,5)	0,74 (0,40-1,38)	0,35	31 (50)	68 (51,5)	1,15 (0,59-2,24)	0,673
<b><i>GSTT1</i></b>												
positivo	55 (70,5)	82 (72,6)	1,00		78 (72,8)	61 (69,3)	1,00		44 (70,9)	95 (71,9)	1,00	
negativo	23 (29,5)	31 (27,4)	0,82 (0,41-1,65)	0,58	29 (27,2)	27 (30,7)	1,23 (0,62-2,48)	0,55	18 (29,1)	37 (28,1)	1,22 (0,57-2,63)	0,605
<b><i>GSTPI</i> A313G*</b>												
A/A	42 (59)	55 (54,4)	1,00		55 (57,9)	46 (56)	1,00		34 (60,7)	67 (55,8)	1,00	
A/G e GG	29 (41)	46 (45,6)	1,16 (0,62-2,16)	0,65	40 (42,1)	36 (44)	1,13 (0,61-2,11)	0,70	22 (39,3)	53 (44,2)	1,05 (0,53-2,06)	0,896
<b><i>GSTPI</i> C341T**</b>												
C/C	71 (92)	98 (89)	1,00		91 (80,5)	80 (91)	1,00		56 (91,8)	114 (88,4)	1,00	
C/T	06 (8)	12 (11)	0,93 (0,34-2,54)	0,89	12 (19,5)	08 (9)	0,72 (0,26-2,00)	0,53	05 (8,2)	15 (11,6)	1,27 (0,40-3,98)	0,685

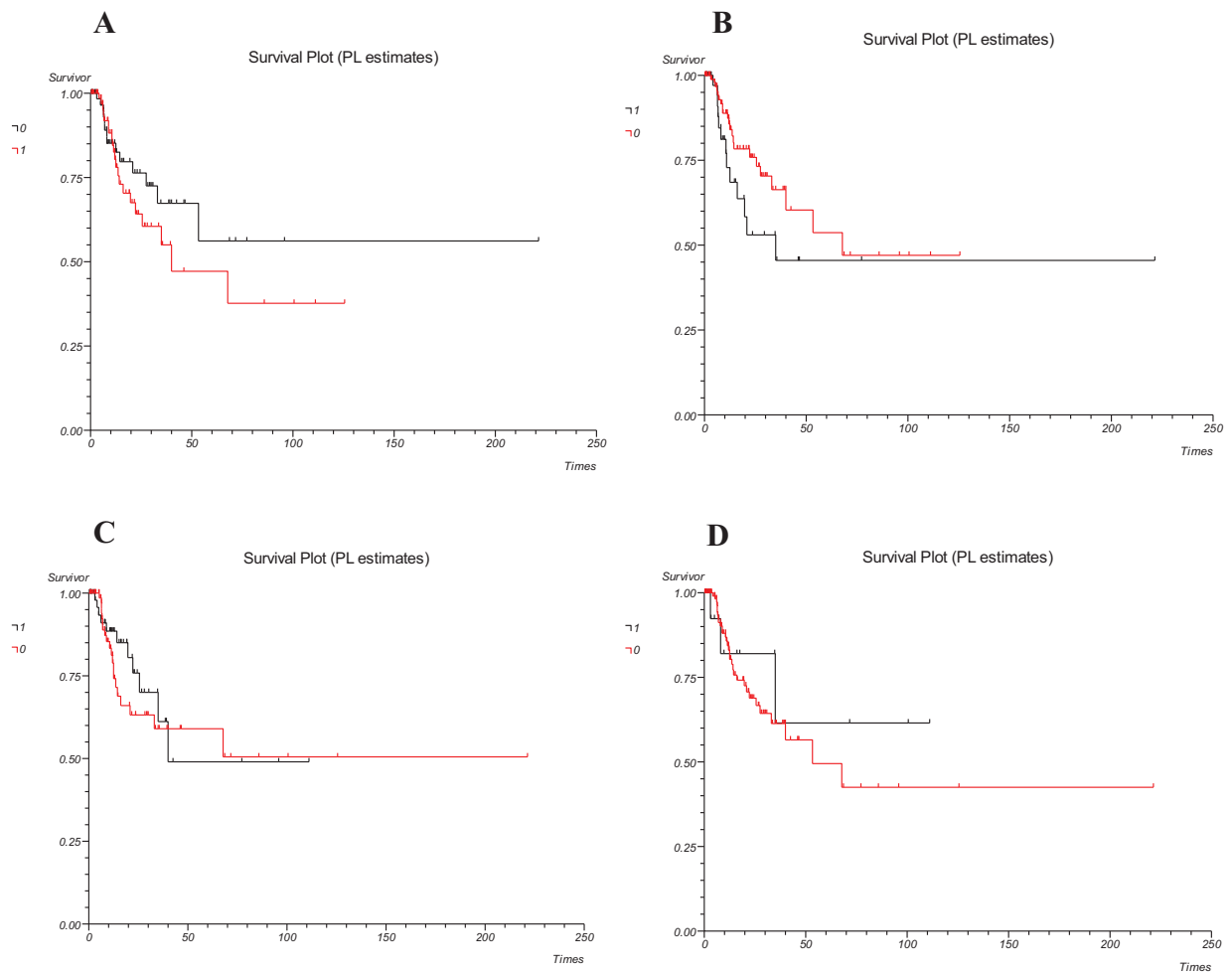
<sup>+</sup>Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e hábitos etilista e tabagista. \*A amplificação foi possível para 172 pacientes. \*\*A amplificação foi possível para 187 pacientes.

**Tabela 6.** Polimorfismos *GSTT1*, *GSTMI*, *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T em relação à recidiva e sobrevida de pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

<b>Polimorfismos</b>	<b>Recidiva (12 meses)</b>	<b>Valor de p <i>Log Rank</i></b>	<b>Sobrevida (12 meses)</b>	<b>Valor de p <i>Log Rank</i></b>
<b><i>GSTT1</i></b>				
Positivo	23%	0,467	85%	0,135
Negativo	30%		72%	
<b><i>GSTMI</i></b>				
Positivo	26%	0,717	85%	0,314
Negativo	22%		80%	
<b><i>GSTP1</i> A313G</b>				
AA	24%	0,450	78%	0,487
AG/GG	23%		88%	
<b><i>GSTP1</i> C341T</b>				
CC	25%	0,164	83%	0,566
CT/TT	12%		82%	



**Figura 3.** Curva de *Kaplan-Meier* para análise de recidiva dos pacientes submetidos a tratamento em relação aos polimorfismos *GSTM1* (A), *GSTT1* (B), *GSTP1 A313G* (C) e *GSTP1 C341T* (D).



**Figura 4.** Curva de *Kaplan-Meier* para análise de sobrevida dos pacientes submetidos a tratamento em relação ao polimorfismo *GSTM1* (A), *GSTT1* (B), *GSTP1* A313G (C) e *GSTP1* C341T (D).

## *4 DISCUSSÃO*

---

#### 4. DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que idade  $\geq 59$  anos, gênero masculino e os hábitos tabagista e etilista estão associados ao risco aumentado de desenvolver CECP. Nossos achados confirmam dados da literatura referente à epidemiologia do CECP, os quais relatam a predominância dos casos entre a quarta e sexta década de vida com proporção de cinco homens para uma mulher, e que hábito tabagista e consumo de álcool são fatores fortemente relacionados ao risco para este tipo de câncer.<sup>(5,12,22,58-62)</sup>

Em relação à frequência do gênero masculino, este aumento também foi observado em estudo brasileiro de Freire e colaboradores publicado recentemente em 2017. O estudo foi realizado com dados obtidos por meio do acesso ao site do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), fornecidos a cada Biênio pelo INCA – Ministério da Saúde e considerou que essa divergência pode ser atribuída à menor exposição aos compostos carcinogênicos provenientes dos hábitos tabagista e etilista entre as mulheres.<sup>(61)</sup>

Embora a proporção dos casos de câncer entre homens e mulheres têm sido modificada ao longo dos anos, pode-se observar aumento dos casos entre as mulheres devido ao aumento do consumo de cigarro e álcool,<sup>(63)</sup> as mulheres apresentaram maior frequência dos hábitos preventivos como alto consumo de frutas e vegetais na dieta comparado aos homens no câncer oral.<sup>(64)</sup>

Os dados da literatura destacam que o hábito tabagista é um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do CECP <sup>(5,14,65)</sup> confirmando nossos achados, nos quais 90% dos pacientes com CEPC possuíam hábito tabagista. O estudo realizado na Índia por Singh e colaboradores no ano de 2014 mostrou anomalias causadas pelo

cigarro fumado ou mascado na morfologia da mucosa oral podem levar ao carcinoma escamoso oral.<sup>(66)</sup>

As substâncias presentes no cigarro têm seu efeito carcinogênico potencializado com a presença das substâncias presentes nas bebidas alcoólicas, devido ao efeito permeabilizante do álcool atuando como um solvente da membrana celular que aumenta a capacidade de penetração das substâncias do cigarro nas células que por sua vez podem se ligar aos constituintes celulares formando adutos estáveis.<sup>(67)</sup> Deste modo, as substâncias carcinogênicas do cigarro desempenham efeito sinérgico em combinação com as substâncias do álcool potencializando assim o risco de carcinogênese de cabeça e pescoço.<sup>(5,13,14,68)</sup>

Os estudos de Dias *et al.* realizado em 2017 e Andrade *et al.* conduzido em 2015, ambos realizados no nordeste do Brasil evidenciaram aumento do risco do câncer oral em pacientes com sinergismo de hábitos tabagistas e etilistas comparado ao consumo de cigarro e álcool não sinérgico.<sup>(58,69)</sup> Ademais, o estudo de Dias e colaboradores mostrou que cerca de 96% dos pacientes com câncer oral analisados tiveram experiência com consumo de cigarro e bebida alcoólica, porém 43% desses casos relataram consumo não-sinérgico desses compostos.<sup>(58)</sup>

Em relação aos polimorfismos nos genes da família *GST*, neste estudo o genótipo nulo *GSTT1* foi menos frequente entre os pacientes e indivíduos saudáveis investigados, e pode influenciar no risco reduzido para desenvolver CECP. Do mesmo modo, os estudos que incluíram pacientes com CECP como o estudo de Brunialti e colaboradores, o qual encontrou menor frequência do genótipo nulo *GSTT1* (16,8%)<sup>(65)</sup> e o estudo de Silva e colaboradores consequentemente maior frequência do genótipo positivo *GSTT1*

entre indivíduos saudáveis (24,1%) comparado aos pacientes com câncer do trato aereodigestivo superior (13,8%).<sup>(70)</sup>

Além disso, quanto ao genótipo nulo *GSTMI*, este parece estar associado com câncer oral,<sup>(71)</sup> e está de acordo com nossas evidências sobre a associação do genótipo nulo *GSTMI* com CECP. Para o gene *GSTP1* nossos achados associaram pelo menos um alelo polimórfico do polimorfismo *GSTP1 A313G* (AG/GG) com CECP, já o estudo de Brunialti e colaboradores associaram apenas o genótipo heterozigoto AG desse polimorfismo com este tipo de câncer.

Considerando os polimorfismos do gene *GSTP1*, não foi possível associar o polimorfismo *GSTP1 C341T* com CECP, no entanto, essa associação foi confirmada para o polimorfismo *GSTP1 A313G*. Assim como, o estudo de Russo e colaboradores também realizado em brasileiros com CECP, mostrou que pelo menos um alelo polimórfico do polimorfismo *GSTP1 A313G*, genótipos AG/GG foram associados ao risco reduzido para desenvolver CECP,<sup>(17)</sup> concordando com nossas associações para este polimorfismo. Em relação aos haplótipos do gene *GSTP1 A313/C341* (alelos selvagens) e *A313/T341* (alelo selvagem/alelo polimórfico), estes demonstraram associação com o CECP no nosso grupo amostral. Esses dados foram confirmados para o polimorfismo *A313G* por meio da associação do haplótipo *G313/C341* (alelo polimórfico/alelo selvagem) com os indivíduos saudáveis deste estudo.

Ademais, o estudo de Ruwali e colaboradores mostrou que o genótipo homozigoto polimórfico *313-GG* do gene *GSTP1* mostrou 75% de melhora na resposta ao tratamento comparado com 25% pacientes de genótipo homozigoto selvagem *313-AA*.<sup>(22)</sup> Esses dados demonstram que os polimorfismos no gene *GSTP1* não só



modificaram o risco para CECP, mas também desempenharam um papel importante na determinação da resposta quimioterapêutica.<sup>(22)</sup>

O estudo de Brunialti e colaboradores relaciona os polimorfismos citados de genes *GSTs* com a detoxificação da cisplatina, quimioterápico usado para tratamento de carcinomas localmente avançados de CECP,<sup>(65)</sup> o qual está entre os mais utilizados no tratamento dos pacientes do presente estudo. No entanto, esse estudo não conseguiu estabelecer essas associações estatisticamente e relata que estudos com número amostral maior poderão mostrar melhor a relação entre resposta à esse quimioterápico e os polimorfismos *GSTs*.<sup>(65)</sup> Por outro lado, o estudo de Dhawan e colaboradores (2013) associaram os genótipos nulos de *GSTM1* com toxicidade observada devido ao quimioterápico cisplatina.<sup>(19)</sup>

No grupo amostral investigado pelo presente estudo realizado na região sudeste do Brasil no estado de São Paulo, o tratamento mais comum para CECP foi a associação de radioterapia e quimioterapia. Em comparação aos resultados obtidos no grupo amostral (77 pacientes) analisado pelo estudo de Dias e colaboradores realizado no ano de 2017, o qual também foi conduzido em população brasileira, porém na região do nordeste do país, os resultados mostraram que procedimentos cirúrgicos em abordagens isoladas ou em associação com radioterapia e quimioterapia foram os tratamentos mais frequentes para câncer oral.<sup>(58)</sup>

Nossos achados não mostraram uma relação entre a sobrevida global e os genótipos estudados, assim como o estudo de Brunialti e colaboradores.<sup>(65)</sup> O estudo brasileiro de Soares e colaboradores realizado em 2017, corrobora com os achados relacionados à sobrevida e o gene *GSTP1*, porém este estudo investigou a expressão desse gene.<sup>(72)</sup> Ademais, há relatos de tendência à significância ( $p=0.053$ ) entre o

polimorfismo de deleção de *GSTT1* e a sobrevida livre de progressão no adenocarcinoma gastroesofágico.<sup>(73)</sup>

A associação de radioterapia e/ou quimioterapia no tratamento de CECP é evidenciada pela literatura.<sup>(62,74,75)</sup> Esses tratamentos são indicados quando há impossibilidade de realizar a cirurgia no local do câncer, como no caso do tumores avançados que acometem regiões importantes entre os sítios desse tipo de câncer. Além disso, pode-se observar na rotina ambulatorial e nos resultados de outros estudos que os tumores avançados são mais frequentes,<sup>(13,62)</sup> assim como os achados do presente estudo. Estudos relatam que o diagnóstico tardio de CECP pode acontecer devido à ausência de sintomas na maioria das lesões iniciais, além de falta de conhecimento de diagnóstico diferencial por parte de alguns profissionais de saúde, contribuindo para o diagnóstico tardio com tumores em estágios avançados (T3 e T4), já com indicações de radioterapia e/ou quimioterapia.<sup>(74-76)</sup>

A expressão de *GST*, em células cancerosas representa um fator importante em fenótipo mais agressivo e resistente. Deste modo, altos níveis de expressão de *GST* foram utilizados para direcionar seletivamente o tratamento do tumor com drogas ativadas por meio de enzimas *GST*. Essas estratégias com GST-ativado (TLK286) e pró-fármacos baseados em arsênio confirmam o potencial dos conjugados de Glutathione reduzida (GSH) como medicamentos anticancerígenos.<sup>(77)</sup>

No presente estudo não foi possível estabelecer associação entre os polimorfismos e sítio anatômico primário, características clinico-patológicas do tumor, tempo livre de recidiva e sobrevida dos pacientes com CECP. Em relação ao sítio anatômico primário estudo anterior com pacientes CECP brasileiros encontrou associação do *GSTT1* nulo com risco aumentado para laringe e diminuído para faringe, assim, mostrou que este

polimorfismo pode modular o risco para desenvolver CECp nestes sítios anatômicos. Este estudo brasileiro também não encontrou associação dos polimorfismos *GSTs* investigados com as outras características clinico-patológicas do tumor.<sup>(17)</sup>

As enzimas *GSTs* desempenham papel crucial no desenvolvimento da resistência à agentes anticancerígenos e podem modular as vias de sinalização que controlam a proliferação, diferenciação e apoptose celular. Essas funções específicas das *GSTs* podem levar ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e à identificação de alguns candidatos interessantes para o desenvolvimento pré-clínico e clínico do câncer.<sup>(78)</sup>

O resumo da comparação entre os achados do presente estudo e os dados da literatura pode ser observado no Quadro 1.

**Quadro 1.** Comparação entre os dados do presente estudo e os dados dos estudos apresentados na discussão.

Referência Autor, ano (N°)	País	Tamanho amostral (N)		Gênero – N (%)				Idade Média ± DP		Hábito Tabagista – N (%)				Hábito Etílista – N (%)				Tratamento – N (%)			Polimorfismos
				Feminino		Masculino				Não		Sim		Não		Sim		RT	QT	RT e QT	
		Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle						
Warnakulasuriya et al., 2005 (68)	Inglaterra	Revisão de literatura																			
Brunialti, 2009 (66)	Brasil	95	-	8 (8,4)	-	87 (91,6)	-	59*	-	6 (6,3)	-	89 (93,7)	-	15 (15,8)	-	80 (84,2)	-	-	89 (93,7)	-	GSTT1, GSTM1 e GSTP1 A313G
Goekurt et al., 2009 (77)	Alemanha	134	-	42 (31)	-	92 (69)	-	64*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	134 (100)	-	GSTT1, GSTM1 e GSTP1 A313G
Petersen, 2009 (69)	Suíça	Revisão de literatura																			
Ruwali et al., 2009 (22)	Índia	350	350	-	-	350 (100)	350 (100)	53 ±8	52 ±10	50 (14,3)	169 (48,3)	300 (85,7)	181 (51,7)	-	-	-	-	-	-	250 (100)	GSTP1 A313G
Santos et al., 2010 (75)	Brasil	74	-	22 (29,7)	-	52 (70,3)	-	57,22 ±14,01	-	17 (23)	-	57 (77)	-	43 (58)	-	31 (42)	-	-	-	-	-
Casati et al., 2012 (61)	Brasil	154,7 46	-	46,42 4 (30)	-	108,32 2 (70)	-	54,5*	-	23,367 (15,1)	-	131,379 (84,9)	-	46,424 (30)	-	108,322 (70)	-	-	-	-	-
Ruback et al., 2012 (13)	Brasil	995	-	202 (20,3)	-	793 (79,7)	-	60,48*	-	247 (24,8)	-	747 (75,2)	-	415 (41,7)	-	579 (58,3)	-	129 (14,2)	18 (1,9)	59 (6,5)	-
Santos et al., 2012 (74)	Brasil	50	-	19 (38)	-	31 (62)	-	63*	-	5 (10)	-	45 (90)	-	31 (42)	-	29 (58)	-	(32,5)	-	(30)	-
Dhawan et al., 2013 (19)	Índia	23	-	4 (17,4)	-	19 (82,6)	-	-	-	0 (0)	-	23 (100)	-	-	-	-	-	-	23 (100)	-	GSTT1, GSTM1 e GSTP1 A313G
Galbiatti et al., 2013 (12)	Brasil	Revisão de literatura																			
Russo et al., 2013 (17)	Brasil	261	514	32 (12,3)	145 (28,2)	229 (87,7)	369 (71,8)	48*	-	40 (15,3)	309 (60,1)	221 (84,7)	205 (39,9)	70 (26,8)	260 (50,6)	191 (73,2)	254 (49,4)	-	-	-	GSTT1, GSTM1, GSTP1 A313G e C341T
Machiels et al., 2014 (73)	Bélgica	Revisão de literatura																			

Referência Autor, ano (N°)	País	Tamanho amostral (N)		Gênero – N (%)				Idade Média ± DP		Hábito Tabagista – N (%)				Hábito Etílista – N (%)				Tratamento – N (%)			Polimorfismos	
				Feminino		Masculino				Não		Sim		Não		Sim		RT	QT	RT e QT		
		Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle	Caso	Controle							
Ramsay et al., 2014 (78)	Austrália	Revisão de literatura																				
Silva et al., 2014 (71)	Brasil	116	224	16 (13,8)	31 (13,8)	100 (86,2)	193 (86,2)	60,9 ±12,5	58,2 ±11,9	6 (5,2)	114 (52,1)	110 (94,8)	105 (47,9)	27 (23,3)	110 (56,1)	89 (76,7)	86 (43,9)	-	-	-	GSTT1, GSTMI e GSTP1 A313G	
Singh et al., 2014 (67)	Índia	75	-	23 (30,7)	-	52 (69,3)	-	45*	-	25 (33,3)	-	50 (66,7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Andrade et al., 2015 (70)	Brasil	127	254	35 (27,6)	70 (27,6)	92 (72,4)	184 (72,4)	60,66 ±13,51		13 (10,2)	127 (50,0)	114 (89,8)	127 (50,0)	27 (21,3)	113 (44,5)	100 (78,7)	141 (55,5)	-	-	-	-	
Liu et al., 2015 (72)	China	Revisão sistemática e Meta-análise																				
Mogilner & Elishoov, 2015 (14)	Israel	Revisão de literatura																				
Singh et al., 2015 (79)	Índia	Revisão de literatura																				
Turati et al., 2015 (65)	Itália	Revisão de literatura																				
Osazuwa et al., 2016 (64)	Estados Unidos	22,16 2	-	6.582 (29,7)	-	15.580 (70,3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,43 8 (47,1)	-	-	-	
Dias et al., 2017 (59)	Brasil	77	-	21 (27)	-	56 (73)	-	-	-	5 (6)	-	72 (94)	-	5 (6)	-	72 (94)	-	8 (11)	1 (1)	8 (11)	-	
Freire et al., 2017 (62)	Brasil	Revisão de literatura																				
INCA, 2017 (5)	Brasil	Estimativa Brasileira de Câncer																				
Rocha et al., 2017 (63)	Brasil	28	-	10 (35,7)	-	18 (64,3)	-	59,78 ±12,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28 (100)	-	-	-	
Soares et al., 2017 (76)	Brasil	94	Estudo de expressão gênica																			
Wopken et al., 2017 (60)	Países Baixos /Europa	Revisão de literatura																				
Presente estudo	Brasil	197	514	20 (10)	145 (28)	177 (90)	369 (72)	59*	44	20 (10)	309 (60)	177 (90)	205 (40)	28 (14)	260 (51)	169 (86)	254 (49)	51 (26)	10 (5)	135 (69)	GSTT1, GSTMI, GSTP1 A313G e C341T	

RT: Radioterapia; QT: Quimioterapia; DP: Desvio Padrão; \*Ausência do valor de desvio padrão da idade.

## *5 CONCLUSÕES*

## 5. CONCLUSÕES

1. A presença do genótipo nulo *GSTMI* está associada com aumento do risco para o câncer de cabeça e pescoço, enquanto o genótipo nulo *GSTTI* e o polimorfismo *GSTPI* A313G contribuem para a redução do risco deste tipo tumoral.
2. Os polimorfismos dos genes *GSTMI*, *GSTTI* e *GSTPI* não estão associados com o sítio anatômico de ocorrência do tumor, extensão tumoral, acometimento de linfonodos regionais e progressão tumoral.
3. Os polimorfismos não estão associados com o tempo livre de recidiva ou tempo de sobrevida dos pacientes tratados com quimioterapia e/ou radioterapia.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Inglehart RC, Scanlon CS1, D'Silva NJ2. Reviewing and reconsidering invasion assays in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2014;50(12):1137-43.
2. Gao J, Panizza B, Johnson NW, Coman S, Clough AR. Basic consideration of research strategies for head and neck cancer. *Front Med.* 2012;6(4):339-53.
3. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Current Opinion in Oncology*, 21, 94–200, 2009.
4. Döbrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev*, 17, 24-9, 2005.
5. Instituto Nacional do Câncer – <http://www.inca.gov.br>. Acessado em 11/08/2017.
6. Calzada AP, St. John MA, Abemayor E, Wong DTW. Molecular Pathology of Head and Neck Cancer. *Molecular Surgical Pathology.* 2013; 307-323.
7. Rothenberg SM, Ellisen LW. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest.* 2012;122(6):1951-7.
8. Mirghani H, Sturgis EM, Aupérin A, Monsonego J, Blanchard P. Is there an increased risk of cancer among spouses of patients with an HPV-related cancer: A systematic review. *Oral Oncol.* 2017;67:138-145.
9. Blitzer GC, Smith MA, Harris SL, Kimple RJ. Review of the clinical and biologic aspects of human papillomavirus-positive squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014;88(4):761-70.
10. Kimple RJ, Harari PM, Torres AD, Yang RZ, Soriano BJ, Yu M, et al., Development and Characterization of HPV-Positive and HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Tumorgrafts. *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):855-64.

11. Calabrese L, Ostuni A, Ansarin M, Giugliano G, Maffini F, Alterio D, Rocca MC, Petralia G, Bruschini R, Chiesa F. Future challenges in head and neck cancer: from the bench to the bedside? Association of Radiotherapy and Oncology of the Mediterranean Area (AROME). *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;84:Suppl 1:e90-6.
12. Galbiatti AL, Padovani-Junior JA, Maníglia JV, Rodrigues CD, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2013;79(2):239-47.
13. Ruback MJ, Galbiatti AL, Arantes LM, Marucci GH, Russo A, Ruiz-Cintra MT, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Clinical and epidemiological characteristics of patients in the head and neck surgery department of a university hospital. *Sao Paulo Med J*. 2012;130(5):307-13.
14. Mogilner R, Elishoov H. Oral cancer--not only a disease of elder patients with risk factors. *Refuat Hapeh Vehashinayim*. 2015 Jan;32(1):46-8, 63.
15. Singh PP, Chandra A, Mahdi F, Roy A, Sharma P. Reconvence and Reconnect the Antioxidant Hypothesis in Human Health and Disease. *Ind J Clin Biochem* 2010;25(3):225–243.
16. Licitra L, Rossini C, Bossi P, Locati L. Advances in the changing patterns of aetiology of head and neck cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;14:95-9.
17. Russo A, Francelin PR, Galbiatti AL, Raposo LS, Maníglia JV, Pavarino EC, et al. Association between GSTP1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms involved in xenobiotic metabolism and head and neck cancer development. *Mol Biol Rep* 2013;40:4181-8.

18. Troy JD, Weissfeld JL, Diergaarde B, Youk AO, Buch SC, Romkes M, Grandis JR. Polymorphisms in NAT2 and GSTP1 are associated with survival in oral and oropharyngeal cancer. *Cancer Epidemiology*. 2013;37:505-511.
19. Dhawan D, Panchal H, Shukla S, Padh H. Genetic variability & chemotoxicity of 5-fluorouracil & cisplatin in head & neck cancer patients: a preliminary study. *Indian Journal of Medical Research*. 2013;137:125-129.
20. Shukla P, Gupta D, Pant MC, Parmar D. CYP 2D6 polymorphism: A predictor of susceptibility and response to chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2012;8(1):40-45.
21. Ekhart C, Rodenhuis S, Smits PHM, Beijnen JH, Huitema ADR. An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. *Cancer Treatment Reviews*. 2009;35:18-31.
22. Ruwali M, Pant MC, Shah PP, Mishra BN, Parmar D. Polymorphism in cytochrome P450 2A6 and glutathione S-transferase P1 modifies head and neck cancer risk and treatment outcome. *Mutation Research*. 2009;669:36-41.
23. Okuno T, Tamura T, Yamamori M, Chayahara N, Yamada T, Miki I, Okamura N, Kadowaki Y, Shirasaka D, Aoyama N, Nakamura T, Okumura K, Azuma T, Kasuga M, Sakaeda T. Favorable Genetic Polymorphisms Predictive of Clinical Outcome of Chemoradiotherapy for Stage II/III Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Japanese. *American Journal of Clinical Oncology*. 2007;30(3):252-257.
24. Lu C, Spitz MR, Zhao H, Dong Q, Truong M, Chang JY, Blumenschein Jr GR, Hong WK, Wu X. Association between Glutathione S-Transferase  $\pi$  Polymorphisms

- and Survival in Patients with Advanced Nonsmall Cell Lung Carcinoma. *Cancer*. 2006; 106(2): 441-447.
25. Svergun NM, Khranovska NM, Syvak LA, Gubareva HO, Lialkin SA, Askolskyy AV, Maidanevych NM. 38p \* genetic polymorphisms of mthfr and gstp1 is associated with chemotherapy related toxicity in breast cancer patients. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. 2014;25:Suppl 1: i13.
26. Ge J, Tian AX, Wang QS, Kong PZ, Yu Y, Li XQ, Cao XC, Feng YM. The GSTP1 105Val Allele Increases Breast Cancer Risk and Aggressiveness but Enhances Response to Cyclophosphamide Chemotherapy in North China. *Plos One*. 2013;8(6):1-9.
27. Oliveira AL, Rodrigues FFO, Santos RE, Aoki T, Rocha MN, Longui CA, Melo MB. GSTT1, GSTM1, and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in locally advanced breast cancer. *Genetics and Molecular Research*. 2010;9(2):1045-1053.
28. Kitade H, Shimasake T, Igarashi S, Sakuma H, Mori M, Tomosugi N, Nakai M. Long-term administration and efficacy of oxaliplatin with no neurotoxicity in a patient with rectal cancer: Association between neurotoxicity and the GSTP1 polymorphism. *Oncology Letters*. 2014;7:1499-1502.
29. Sociedade Brasileira de Cancerologia. Câncer de Cabeça e Pescoço. Sociedade Brasileira de Cancerologia - <http://www.sbcancer.org.br/>. Acessado em 11/07/2014.
30. Tupchong L., Engin K. Tumores de cabeça e pescoço. In: UICC. Manual de oncologia clínica. São Paulo: Fundação oncocentro de São Paulo; 1999,270-90.

31. Lacko M, Ophuis MBO, Peters WHM, Mannil JJ. Genetic polymorphisms of smoking-related carcinogen detoxifying enzymes and head and neck cancer susceptibility. *Anticancer Research* 2009;29:753-62.
32. Marchewka Z, Piwowar A, Ruzik S, Długosz A. Glutathione S - transferases class Pi and Mi and their significance in oncology. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017;71(0):541-550.
33. Galal AM, Walker LA, Khan IA. Induction of GST and related events by dietary phytochemicals: sources, chemistry, and possible contribution to chemoprevention. *Curr Top Med Chem*. 2015;14(24):2802-21.
34. Jancova P, Anzenbacherb P, Anzenbacherovaa E (2010) Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 154(2):103-116.
35. Bock KW. Homeostatic control of xeno- and endobiotics in the drug-metabolizing enzyme system. *Biochem Pharmacol*. 2014;90(1):1-6.
36. Juliano, R. L., and Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 1976; 455(1): 152-162.
37. Pal D, Kwatra D, Minocha M, Paturi DK, Budda B, Mitra AK. Efflux transporters- and cytochrome P-450-mediated interactions between drugs of abuse and antiretrovirals. *Life Sci*. 2010; 23;88(21-22):959-71.
38. Omiecinski CJ, Vanden Heuvel JP, Perdew GH, Peters JM. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol Sci*. 2011;1:49-75.

39. Russo, A. Avaliação de polimorfismos de genes metabolizadores de xenobióticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço [Dissertação]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2011.
40. Ginsberg G, Smolenski S, Hattis D, Guyton KZ, Johns DO, Sonawane B. Genetic Polymorphism in Glutathione Transferases (GST): Population distribution of GSTM1, T1, and P1 conjugating activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2009;12(5-6):389-439.
41. Hayes, J. D., Flanagan, J. U., and Jowsey, I. R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005;45:51–88.
42. Whalen, R., and Boyer, T. Human glutathione S-transferase. *Semin. Liver Dis.* 1998;18:345–358.
43. Seigard J, Ekstrom G. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect* 1999;20:743–748
44. Roth MJ, Dowsey Sm, Wang G, Tangea JA, Zhou B, Rathnasinghe D. association between GSTM1\*0 and squamous dysplasia of the esophagus in the region of Linscian. *Cancer Lett* 2000;156:73-81.
45. Ye Z, Song H, Higgins JP, Pharoah P, Donesh J. Five Glutathione transferase gene variant in 23, 452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. *Plos Med.* 2006;7:91.
46. Zheng T, Holford TR, Zhahm SH, Owens PH, Boyle P, Zhang Y, Wise JP, Stephenson LP, Ali-Osman F. Cigarette smoking glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Causes Control.* 2002;13:637-45.

47. Hatagima A, Costa ECB, Marques CFS, Koifman RJ, Boffetta P, Koifman S. Glutathione S-transferase polymorphisms and oral cancer: A case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncology* 2008;44:200-7.
48. Cury NM, Russo A, Galbiatti AL, Ruiz MT, Raposo LS, Maniglia JV, et al. Polymorphisms of the CYP1A1 and CYP2E1 genes in head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol Biol Rep* 2012;39(2):1055-63.
49. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang M-J, Sidransky JJD. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000;60:3155-3159.
50. Kjaerhein K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancer: a prospective study of 10.900 Norwegian men. *Cancer Causes and Control* 1998;9:99-108, 10.1023/A:1008809706062.
51. Lee KJ. *Essential otorhinolaryngology*. 10<sup>a</sup> ed New Haven, CT: McGraw-Hill Education / Medical; 2012.
52. Sobin L, Gospodarowicz MK, Wittekind C, eds. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th Edition: UICC; 2009.
53. American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer Staging Manual* 7th ed. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. eds. New York: Springer; 2009.
54. Lessa GS, De Moraes ED, Carvalho EC, Agra I. Quimioterapia nos tumores de cabeça e pescoço. Em Guimarães, JRQ. *Manual de oncologia*, 3<sup>a</sup> ed. Editora BBS, São Paulo, 2008; p. 1333 e 1334.

55. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.* 1996;107:229-33.
56. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione-S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis.* 1997;18:641-4.
57. Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relation to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis.* 1998;19(2):275-80.
58. Dias AKS, Diniz MF, Grangeiro MTV, de Araujo TLC, Feitosa DAS. Epidemiological profile of diagnosed injuries in bucal cancer: study of a brazilian population. *Int J Inf Res Rev* 2017;4(7):4315-4319.
59. Wopken K, Bijl HP, Langendijk JA. Prognostic factors for tube feeding dependence after curative (chemo-) radiation in head and neck cancer: A systematic review of literature. *Radiother Oncol.* 2017 Sep 21. pii: S0167-8140(17)32545-8.
60. Casati MFM, Vasconcelos JA, Vergnhanini GS, Contreiro PF, da Graça TB, Kanda JL, Akerman M, de Matos LL. Epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço no Brasil: estudo transversal de base populacional (*Head and neck cancer epidemiology in Brazil: populational based cross-sectional study*). *Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço* 2012;41(4):186-191.
61. Freire JCP, Nóbrega MTC, Freire SCP, Ribeiro ED. Incidence of Malignant Oral Neoplasms in Brazilian Regions. *REFACS* 2017; 5(Supl.1):141-145.



62. Rocha BQC, Eneas L, Oliveira RG, Junqueira RB, Verner FS. Epidemiological aspects of patients with head and neck neoplasms undergoing radiotherapy in Juiz de Fora - MG. *HU Revista*, Juiz de Fora 2017;43(1):71-75.
63. Osazuwa-Peters N., Massa ST, Christopher KM, Walker RJ, Varvares, MA. Race and sex disparities in long-term survival of oral and oropharyngeal cancer in the United States. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2016;142(2):521-528.
64. Turati F, Rossi M, Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. *Br J Nutr.* 2015;113:Suppl 2:S102-10.
65. Brunialti, KCS. Correlação entre osteopontina sérica e polimorfismos nos genes GSTT1, GSTP1, ERCC1(118), XPD (751) com prognóstico e sobrevida em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço [Tese]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2009.
66. Singh M, Sircar K, Tandon A, Chowdhry A, Popli DB. The role of tobacco as an etiological agent for oral cancer: Cytomorphometrical analysis of the buccal mucosa in tobacco users. *Dental research journal* 2014;11(6):649-655.
67. Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral Oncol* 2005;41:244–260.
68. Petersen, P. E. Oral cancer prevention and control—The approach of the World Health Organization. *Oral oncology* 2009;45(4):454-460.
69. Andrade JOM., Santos CADST, Oliveira MC. Fatores associados ao câncer de boca: um estudo de caso-controle em uma população do Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 2015;18(4):894-905.

70. Silva TM, Marques CR, Marques Filho MF, Marques AB, Di Pietro G, Rios-Santos F. Association of the GSTT1 polymorphism in upper aerodigestive tract cancer with tobacco smoking. *Genet Mol Res.* 2014 Jan 21;13(1):528-37.
71. Liu H, Jia J, Mao X, Lin Z. Association of CYP1A1 and GSTM1 Polymorphisms With Oral Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore).* 2015 Jul;94(27):e895.
72. Soares PO, Maluf Cury P, Mendoza López RV, Cernea CR, Fukuyama EE, Livingstone Alves Figueiredo D, et al. HEAD AND NECK GENOME PROJECT–GENCAPO. GTSP1 expression in non-smoker and non-drinker patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182600.
73. Goekkurt E, Al-Batran SE, Hartmann JT, Mogck U, Schuch G, Kramer M, Jaeger E, Bokemeyer C, Ehninger G, Stoehlmacher J. Pharmacogenetic analyses of a phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil and leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a study of the arbeitsgemeinschaft internistische onkologie. *J Clin Oncol.* 2009;27(17):2863-73.
74. Machiels JP, Lambrecht M, Hanin FX, Duprez T, Gregoire V, Schmitz S, Hamoir M. Advances in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck. *F1000Prime Rep.* 2014;6:44.
75. Santos VCB. et al. Câncer de boca: análise do tempo decorrido da detecção ao início do tratamento em centro de Oncologia de Maceió. *Revista Brasileira de Odontologia, Rio de Janeiro* 2012;69(2):159-64.
76. Santos LCO; Batista OM; Cangussu MCT. Characterization of oral cancer diagnostic delay in the state of Alagoas. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, São Paulo* 2010;76(4):416-22.

77. Ramsay EE, Dilda PJ. Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors. *Front Pharmacol.* 2014;5:181.
78. Singh S . Cytoprotective and regulatory functions of glutathione Stransferases in cancer cell proliferation and cell death. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;75(1):1-15.

## *7. ANEXOS*

---

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 466/12)

**Título da Pesquisa: Análise molecular de quatro polimorfismos dos genes da família GST em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço tratados com quimioterapia e/ou radioterapia**

**Pesquisadora Responsável:** Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo - UPGEM: Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular da FAMERP;

**A)** Este estudo tem como objetivos: 1) Coletar informações da história e obter dados clínicos dos prontuários médicos dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço atendidos no Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base / Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. 2) Analisar alterações em genes (material hereditário) com a finalidade de esclarecer o papel de fatores genéticos no desenvolvimento do tumor;

**B)** Para este estudo serão utilizados dois grupos de pessoas: 1) pacientes com câncer de cabeça e pescoço; 2) indivíduos do grupo controle, não portadores do tumor;

**C)** O estudo será feito utilizando-se sangue, que será colhido com seringa descartável por enfermeira e o risco da colheita pode incluir inchaço e vermelhidão no local, sem qualquer outro risco para minha saúde;

**D)** O material (sangue) será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, minha privacidade e identidade serão preservadas;

**E)** O material genético (DNA), ou seja hereditário, extraído do sangue será armazenado no laboratório, compondo um banco de amostras biológicas, podendo ser utilizado em futuros estudos;

**F)** Todas as informações por mim fornecidas por meio do questionário e os resultados serão mantidos em sigilo e que, estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas;

**G)** Se eu concordar em participar desta pesquisa e se eu concordar com a retirada e uso do meu sangue, do modo descrito acima, não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se eu não concordar, em doar o sangue para a pesquisa ou decidir retirar meu consentimento em qualquer momento, minha decisão não influenciará, de nenhum modo, o meu tratamento;

**H)** Esse estudo é importante porque pode colaborar para conhecimento científico dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do tumor.

Declaro que, após ter convenientemente esclarecido pelo pesquisador, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo sem que tenha sido submetido a qualquer tipo de pressão.

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

Nome do(a) participante:

Representante legal:

RG do prontuário médico:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelos endereços abaixo indicados.

Nome do(a) pesquisador:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Inscrição no Conselho Regional: .....

Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo – Departamento de Biologia Molecular

Av. Brigadeiro Faria Lima, no. 5416

FAMERP - Faculdade de Medicina de S.J. Rio Preto

São José do Rio Preto, SP - CEP 15090-000 Fone: (17) 3201-5720 e-mail: [eny.goloni@famerp.br](mailto:eny.goloni@famerp.br)

*Em caso de dúvidas contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, telefone: (0xx17) 3201-5700, ramal 5813*

**Questionário para o grupo controle**  
**Biomarcadores para o câncer de cabeça e pescoço**

**História Pessoal ou Familiar de Neoplasias/Doenças:.....**Heredograma no verso.

**Dados Gerais e demográficos:**

Nome.....

RG.....Sexo.....

Local e data de nascimento .....

Endereço:

Rua.....Nº.....fone.....

Bairro.....Cidade.....CEP.....

Etnia.....Ocupação.....Escolaridade.....

Data da coleta:.....

Dados do Tumor:

Local do tumor.....

Tumor primário ( ) Sim ( ) Não

Local:.....

Recidiva ( ) Sim ( ) Não

Local:.....

Início do diagnóstico câncer: mês( ) ano ( )

Tipo:.....

**Fatores de Risco**

Exposição ao tabaco (acima de 100 Cigarros/vida – 1 maço=20cigarros)

Início.....duração.....tipo.....

Consumo diário.....

Consumo de bebidas alcoólicas (acima de 4 doses por semana – 1 garrafa de cerveja ou 2 latas)

Início.....duração.....tipo.....

Consumo semanal / tipo.....

**Responsável pela entrevista: .....**

**Questionário para o grupo caso**  
**Biomarcadores para o câncer de cabeça e pescoço**

**Dados Gerais e demográficos:**

Nome.....sexo.....

Prontuário..... Local e data de nascimento .....

Endereço:

Rua.....Nº.....fone.....

Bairro.....Cidade.....CEP.....

Etnia.....Ocupação.....Escolaridade.....

Data da coleta:.....

**Dados do Tumor:****Última consulta:.....**

Local do tumor.....1ª Consulta:.....

TNM Clínico.....Patológico.....

Tumor primário ( ) Sim ( ) Não

Local:.....

Recidiva ( ) Sim ( ) Não

Local:.....

Início do diagnóstico câncer: mês ( ) ano ( )

Tipo:.....

Cirurgia.....Data.....

Fez radioterapia ( ) Sim ( ) Não

Data/Período.....

Fez quimioterapia ( ) Sim ( ) Não

Data/Período.....

**Fatores de Risco**Exposição ao tabaco (acima de 100 Cigarros/vida)

Início.....duração.....tipo.....consumo diário.....

Consumo de bebidas alcoólicas (acima de 4 doses por semana – 1 garrafa de cerveja ou 2 latas)

Início.....duração.....tipo.....consumo semanal / tipo.....

**História Familiar de Neoplasias:.....**

Heredograma no verso.

Responsável pela entrevista: .....



**FACULDADE DE MEDICINA DE  
 SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-  
 FAMERP - SP**



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise molecular de quatro polimorfismos dos genes da família GST em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço tratados com quimioterapia e/ou radioterapia

**Pesquisador:** Ery Maria Goloni-Bertollo

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 1

**CAAE:** 31602714.2.0000.5415

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP - SP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 697.896

**Data da Relatoria:** 10/06/2014

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo caso-controle que tem como objetivo analisar genótipos nulos dos genes GSTM1 e GSTT1 e os polimorfismos A313G e

C341T do gene GSTP1 em 100 pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados com de quimioterapia e/ou radioterapia e comparar a frequência desses polimorfismos encontrada em 300 indivíduos sem história de neoplasia, e verificar a associação destes polimorfismos com os fatores de risco e características histopatológicas dos pacientes. O câncer de cabeça e pescoço é importante causa de mortalidade no Brasil. Fatores genéticos como polimorfismos em genes que codificam as enzimas da fase I e da fase II podem alterar sua expressão ou função, influenciar no metabolismo de drogas e modificar a ativação ou detoxificação de compostos carcinogênicos. Assim, estudos sobre a associação dos polimorfismos e sua influência na resposta aos tratamentos de quimioterapia e consequentemente radioterapia são importantes para identificar biomarcadores para susceptibilidade de predisposição para o HNSCC. Os resultados poderão contribuir para o esclarecimento do papel de fatores genéticos nas diferenças de resposta aos tratamentos de quimioterapia e/ou radioterapia e

**Endereço:** BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416

**Bairro:** VILA SAO JOAO **CEP:** 15.090-000

**UF:** SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO

**Telefone:** (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** bepfamerp@famerp.br





FACULDADE DE MEDICINA DE  
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-  
FAMERP - SP



Continuação do Parecer: 697.896

identificar biomarcadores de suscetibilidade.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Investigar a frequência dos genótipos nulos dos genes GSTM1 e GSTT1 e polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) A313G e C341T do gene

GSTP1 em pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados com quimioterapia e/ou radioterapia, comparando-a com aquela observada em uma população controle;

**Objetivo Secundário:**

Avaliar a associação dos polimorfismos com os hábitos tabagista e etilista, gênero e idade no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço tratados com quimioterapia e/ou radioterapia; Verificar a associação entre os polimorfismos e as características clínico-patológicas (tratamento de quimioterapia e/ou radioterapia, sítios primários de ocorrência, extensão do tumor, comprometimento de linfonodos, agressividade do tumor).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Metodologia Proposta:**

1. CASUÍSTICA: Serão estudados 100 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, e serão procedentes do Serviço de Otorrinolaringologia e

Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base / Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, independente do sexo, da idade

e da etnia. Também serão investigados 300 indivíduos sem história de neoplasia do Hemocentro da Faculdade de Medicina/ Hospital de Base de

São José do Rio Preto- SP. Os indivíduos serão incluídos no estudo após a obtenção de um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(TCLE) (Anexo 1) e todas as informações serão obtidas por meio de questionário padronizado (Anexo 2) e mantidas em sigilo. Os pacientes serão

incluídos no estudo após o diagnóstico histopatológico de carcinoma espinocelular. a) Análise dos dados demográficos e clínicos: As variáveis

analisadas incluirão idade, gênero, hábitos tabagista e etilista. Informações sobre o tabagismo e etilismo serão limitadas quanto ao uso ou não de

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416.

Bairro: VILA SÃO JOÃO CEP: 15.090-000

UF: SP Município: SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Telefone: (17)3201-5813 Fax: (17)3201-5813 E-mail: oepfamerp@famerp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE  
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-  
FAMERP - SP



Continuação do Parecer: 697.896

tabaco e álcool. Serão considerados tabagistas indivíduos que consomem cerca de 100 cigarros durante toda a vida e etilistas aqueles que bebem

mais que quatro drinques por semana (Kjaerhein et al., 1998; Ahrendt et al., 2000). b) Tratamento de quimioterapia e/ou radioterapia: Os

quimioterápicos mais utilizados pela equipe médica do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia e cabeça e pescoço são: cisplatina,

metotrexato e 5-fluorouracil. Na maioria das vezes há associação da quimioterapia e radioterapia.c) Sítios primários de tumor: Os tumores serão

classificados quanto à localização anatômica em cavidade oral, faringe e laringe, de acordo com Lee, 2003. d) Classificação dos tumores malignos

(TNM): Os tumores serão classificados de acordo com os parâmetros do Instituto Nacional do Câncer (2004) e da UICC- União Internacional Contra

o Câncer (2002) em três critérios: tamanho do tumor (T), presença de linfonodos regionais comprometidos (N) e presença de metástase à distância

(M) (Sobin & Wittekind, 2000). Os dados clínicos serão de responsabilidade do Prof. Dr. José Victor Maniglia e do Dr. Luis Sérgio Raposo, cirurgiões

e pesquisadores do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.2.

**MÉTODOS:**a) Extração de DNA a partir de sangue total: O DNA genômico será extraído a partir de sangue periférico de acordo com a técnica de

Miller et al., 1988 com modificações. b) Análise molecular: Polimorfismos GSTM1 e GSTT1: será realizada pela técnica de reação em cadeia da

polimerase (PCR) multiplex, usando-se o gene CYP1A1 como controle positivo interno da amplificação com os primers específicos (GSTM1-sense:

5'-GAACTCCCTGAAAAG CTAAAGC-3' e anti-sense: 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'; CYP1A1-sense: 5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT-

3' e anti-sense: 5'-CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC-3' e GSTT1-sense: 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' e anti-sense: 5'-

TCACCGGATCATGGCCAGCA-3' (Abdel-Rahman et al., 1996). Os produtos de PCR serão submetidos à eletroforese em agarose 1,5%, corado

com brometo de etídeo. Polimorfismo A313G do gene GSTP1: será realizada por PCR utilizando-se os primers descritos por Harries e colaboradores

em 1997 (Sense: 5'-ACCCAGGGCTCTATGGGAA-3'; Anti-sense: 5'-TGAGGGCACAAAGAAGCCOCT-

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416

Bairro: VILA SÃO JOÃO

CEP: 15.090-000

UF: SP

Município: SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Telefone: (17)3201-5813

Fax: (17)3201-5813

E-mail: ceptamerp@famerp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE  
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-  
FAMERP - SP



Continuação do Parecer: 697.896

3'). Os produtos de PCR serão submetidos à digestão pela enzima BsmI (Harriss et al., 1997). Os produtos de digestão enzimática serão submetidos à eletroforese em agarose 2,0%, corado com brometo de etídeo. Polimorfismo C341T do gene GSTP1: será realizada por PCR utilizando-se os primers descritos por Watson e colaboradores em 1998 (Sense: 5'-GGGAGCAAGCAGAGGAGAAT-3'; Anti-sense: 5'-CAGGTTGTAGTCAGCGAAGGAG-3'). Os produtos de PCR serão submetidos à digestão pela enzima AclI. Os produtos de digestão enzimática serão submetidos à eletroforese em agarose 2,5%, corado com brometo de etídeo (Watson et al., 1998).

#### Critério de Inclusão:

Serão estudados 100 pacientes com diagnóstico histopatológico de câncer de cabeça e pescoço, procedentes do Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base / Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, independente do gênero, da idade e da etnia. Também serão incluídos no estudo 300 indivíduos sem história de neoplasia do Hemocentro da Faculdade de Medicina/ Hospital de Base de São José do Rio Preto- SP. Os indivíduos serão incluídos no estudo após a obtenção de um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1) e todas as informações serão obtidas por meio de questionário padronizado (Anexo 2) e mantidas em sigilo.

#### Critério de Exclusão:

Serão excluídos do estudo: todos os indivíduos que não aceitarem ou não assinarem o TCLE, os indivíduos do grupo controle com histórico de neoplasia e outras doenças crônicas e os pacientes sem diagnóstico de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço ou portadores de outras neoplasias ou doenças crônicas

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

##### Riscos:

Os riscos são mínimos, apenas relacionados a coleta de sangue que pode causar um hematoma e ficar dolorido.

##### Benefícios:

A identificação de associação desses polimorfismos com o desenvolvimento de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço poderá auxiliar no

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416

Bairro: VILA SÃO JOÃO

CEP: 15.090-000

UF: SP

Município: SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Telefone: (17)3201-5813

Fax: (17)3201-5813

E-mail: [cepfamerp@famerp.br](mailto:cepfamerp@famerp.br)



FACULDADE DE MEDICINA DE  
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-  
FAMERP - SP



Continuação do Parecer: 697.896

entendimento dos mecanismos envolvidos no processo neoplásico e resposta aos tratamentos de quimioterapia e/ou radioterapia, além de contribuir para um diagnóstico precoce e melhoria do tratamento.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Estão presentes e de acordo com a legislação vigente brasileira

**Recomendações:**

Enviar ao CEP, se aplicável, novas versões dos termos de apresentação obrigatória.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Enviar ao CEP, se aplicável, novas versões dos termos de apresentação obrigatória.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto Aprovado.

SAO JOSE DO RIO PRETO, 25 de Junho de 2014

---

Assinado por:  
Fernando Batigália  
(Coordenador)

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416  
Bairro: VILA SAO JOAO CEP: 15.090-000  
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO  
Telefone: (17)3201-5813 Fax: (17)3201-5813 E-mail: ceptamerp@famerp.br

**Molecular analysis of *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* A313G and *GSTP1* C341T polymorphisms in head and neck squamous cell carcinoma treated with chemotherapy and/or radiotherapy**

Mauricio Pereira Maniglia<sup>1</sup>, Anelise Russo<sup>1</sup>, Patrícia Matos Biselli Chicote<sup>1</sup>, Gabriela Helena Rodrigues<sup>1</sup>, José Victor Maniglia<sup>2</sup>, Érika Cristina Pavarino<sup>1</sup>, Eny Maria Goloni Bertollo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular: Biological and Genetics and Molecular Biology Research Unit – UPGEM, São José do Rio Preto Medical School – FAMERP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, São José do Rio Preto Medical School – FAMERP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

**Corresponding author address: Eny Maria Goloni-Bertollo, PhD; Anelise Russo**

Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto  
– FAMERP.

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416

Zip code: 15090-000

São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Phone: +55 17 3201-5720.

E-mail: eny.goloni@famerp.br;

**Word Count:**

## ABSTRACT

*Objective:* To investigate the association between the *GSTMI* and *GSTT1* null genotypes and the A313G and C341T polymorphisms of *GSTP1* gene in patients and head and neck cancer-case group compared to healthy individuals-control group; to verify the association of these polymorphisms with risk factors and clinical-pathological features, relapse-free and survival time of this patients treated with chemotherapy and/or radiotherapy. *Materials and Methods:* In this retrospective case-control study 711 subjects were included (197=cases and 514=controls). The variables analyzed were: gender, age, smoking habit and alcohol consumption, clinical-pathological features of the tumor, treatment with chemotherapy and/or radiotherapy. Genotyping of *GSTMI* and *GSTT1* was performed by PCR and PCR-RFLP for *GSTP1* A313G and C341T. Hardy-Weinberg Equilibrium-HWE, Chi-square, haplotype analysis (for *GSTP1* A313G and C341T) and Multiple Logistic Regression were evaluated in statistical analyses. *Results:* Significance in the risk for head and neck cancer were found in genotypic frequencies of *GSTP1* A313G and C341T (in HWE for both groups  $p>0.05$ ); the haplotypes A313/C341- $p=0.013$  and A313/T341- $p=0.019$  in case group, and G313/C341- $p=0.015$  in control group; advanced age- $p<0.001$ , males- $p=0.040$ , smoking habit- $p<0.001$ , alcohol consumption- $p<0.001$ , *GSTT1*- $p<0.001$ , *GSTMI*- $p<0.001$ , *GSTP1* A313G- $p=0.037$ . The *GSTP1* C341T polymorphism, tumor-pathological characteristics, treatments, relapse-free and survival time were not significant. *Conclusion:* The presence of *GSTMI* null is associated with increased risk for head and neck cancer, while *GSTT1* null and *GSTP1* A313G polymorphism contribute to the reduction. Future studies with larger casuistry may contribute to clarification of the role of polymorphisms in *GST* family genes in individual patient differences for response to chemotherapy and/or radiotherapy and to identify biomarkers of susceptibility.

*Key words:* Genetic polymorphism, Xenobiotics, Glutathione transferase; Head and neck cancer, Chemotherapy, Radiotherapy.

## Introdução

No Brasil, o câncer é importante problema de saúde e estima-se para os anos de 2016 e 2017, a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer [1]. Dentre os tipos de câncer, o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) engloba todas as neoplasias malignas localizadas na mucosa do trato aerodigestivo superior, incluindo a cavidade oral, partes nasal, oral e laríngea da faringe e laringe [2,3].

A etiologia do câncer é multifatorial e dentre os principais fatores de risco ambientais para o CECP destacam-se tabagismo, etilismo [4,5], infecções por HPV, principalmente pelos tipos 16 e 18 [1,6,7], e exposição à radiação UVA solar (câncer de lábio) [1]. Destacam-se os hábitos tabagista e o etilista [1,8,9], pois o risco de desenvolver câncer de cavidade oral atribuído à esses hábitos é maior devido ao sinergismo que ocorre entre esses hábitos, o qual pode aumentar o risco para câncer oral [1].

Em relação aos fatores genéticos, estudos mostram que polimorfismos nos genes que codificam as enzimas do metabolismo de drogas usadas na quimioterapia, podem causar variabilidade na resposta às drogas e modular o resultado do tratamento nos casos de CECP [10-14]. Deste modo, o tratamento individualizado pode melhorar a resposta do pacientes ao tratamento [12,14]. Tradicionalmente o tratamento do câncer corresponde à cirurgia, radioterapia e quimioterapia [15,16].

O metabolismo de drogas ou metabolismo de xenobióticos, envolve dois tipos de enzimas principais: as enzimas conjugadas/Fase II [17] que envolvem a conjugação com o substrato endógeno (glutathiona, sulfato, glicose, acetato) por meio das glutathiona-S-transferases (GSTs), as quais agem como enzimas inativadoras dos produtos da Fase I/metabolismo oxidativo mediado por citocromo P450 e mEH (*Microsomal epoxide hydrolase*), tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção [18-20] para o controle homeostático e detoxificação de xenobióticos lipofílicos que ocorre na Fase III [21].

Variações genéticas das glutathionas S-transferases tem sido associadas a mudanças na atividade enzimática [22-24]. Os genes *GSTM1* e *GSTT1* podem ser polimórficos na população humana e 20 a 50% dos indivíduos não expressam a enzima

devido a uma deleção gênica em homozigose (*GSTMI* nulo e *GSTT1* nulo) [25-27]. Ademais, o gene *GSTP1* apresenta dois polimorfismos de substituição A313G e C341T, que resultam respectivamente nas substituições de aminoácidos Ile105Val e Ala114Val, as quais causam alterações nas atividades catalíticas da enzima e podem estar associadas ao aumento de aduto de DNA, aumentando o risco de câncer [28]. Além disso, foi encontrada baixa resposta ao tratamento de quimioterapia com cisplatina, nos casos com genótipo selvagem *GSTP1* AA313 mostrando o possível papel desses polimorfismos na resposta de um indivíduo à quimioterapia [14].

Os polimorfismos em genes que codificam as enzimas da fase II podem alterar sua função, influenciar no metabolismo de drogas e modificar a detoxificação de compostos carcinogênicos [18-20,29-31]. Assim, investigações dos polimorfismos em indivíduos são importantes para identificar biomarcadores de suscetibilidade ao CECP. Considerando as evidências apresentadas, este estudo teve como objetivos investigar a associação dos genótipos nulos *GSTMI* e *GSTT1* e polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) A313G e C341T do gene *GSTP1* com o câncer de cabeça e pescoço e verificar a associação entre os polimorfismos e o sítio anatômico de ocorrência do tumor, características clínico-patológicas, tempo livre de recidiva e sobrevida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados com quimioterapia e/ou radioterapia.

## **Pacientes e Métodos**

### *Caracterização da amostra*

No presente estudo retrospectivo caso-controle foram incluídos 711 indivíduos, 197 pacientes diagnosticados com CECP em acompanhamento no Ambulatório de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do complexo médico hospitalar FAMERP/FUNFARME, na cidade de São José do Rio Preto – SP foram incluídos no grupo caso e 514 indivíduos saudáveis sem histórico de neoplasia constituindo o grupo controle provenientes do Hemocentro do Hospital de Base de São José do Rio Preto. Os dados de pacientes e controles foram coletados por meio de questionários padronizados. Todas as amostras foram obtidas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e



Esclarecido. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), parecer N° 697.896.

Os critérios de inclusão do grupo caso foram confirmação patológica por biópsia de tumores primários como carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) tratados com quimioterapia e/ou radioterapia realizado no Hospital de referência da região de Sudoeste do estado de São Paulo pelo serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço FAMERP/FUNFARME. Os critérios de exclusão do grupo caso foram os pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço de tipo histológico diferente do espinocelular e pacientes que não foram submetidos aos tratamentos de quimioterapia e/ou radioterapia.

Para o grupo controle os critérios de inclusão foram indivíduos saudáveis com idade  $\geq 40$  anos independente do gênero e etnia sem câncer ou história de neoplasia na família. Os critérios de exclusão do grupo controle foram indivíduos com queixas relacionadas à saúde, alterações em exames de hemograma, de doenças infecto-contagiosas, portadores de doenças crônicas e com história de câncer na família.

No estudo, foram considerados não fumantes os indivíduos que fumaram  $< 100$  cigarros na vida e etilista os indivíduos que consumiram mais de quatro doses por semana (uma dose corresponde: licor - 30mL; copo de vinho - 102mL, contendo 12% de álcool; ou lata de cerveja - 340mL) [32-33].

As variáveis analisadas foram gênero, idade, hábitos tabagista e etilista, e sítio primário e características histopatológicas do tumor. O tratamento dos pacientes incluiu radioterapia e/ou quimioterapia e os principais quimioterápicos utilizados foram cisplatina, metotrexato e 5-fluorouracil.

#### *Caracterização dos aspectos clínicos*

De acordo com a classificação de Lee 2012, as neoplasias foram divididas para sítio primário em cavidade oral, faringe e laringe. Os critérios do Comitê Americano de Câncer (*American Joint Committee for Cancer – AJCC*, 2009) e da União Internacional Contra o Câncer (*Union International Control Cancer – UICC*, 2002) para a classificação do tumor envolvem tamanho (T), presença de linfonodos adjacentes comprometidos (N) e presença de metástase (M) [34-37]. A classificação T foi dividida

em tumores com pequena extensão (T1, T2) e com grande extensão (T3, T4). A classificação N foi dicotomizada em comprometimento de linfonodos negativo (N0) e positivo (N1, N2, N3). Os estádios foram divididos em não avançados (estádios I e II) e avançados (III e IV) [35-37].

O diagnóstico, sítio anatômico primário e a classificação do TNM e demais informações clínicas foram obtidas por meio de prontuário médico dos pacientes incluídos no estudo e avaliados pelo médico autor do estudo (médico otorrinolaringologista e cirurgião de cabeça e pescoço).

### *Análise Molecular*

*Polimorfismos GSTT1 e GSTM1:* A análise dos polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) multiplex, usando o gene *CYP1A1* como controle positivo interno de amplificação com *primers* [38]. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

*Polimorfismo A313G do gene GSTP1:* A análise deste polimorfismo *GSTP1* A313G foi realizada por PCR convencional utilizando-se os *primers* descritos por Harries et al. (1997) [39]. Os produtos de PCR de 176 pares de bases (pb) foram analisados à eletroforese em agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Seguido de digestão com enzima *BsmI* concluindo a segunda etapa da técnica Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (*Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism – PCR-RFLP*). Para visualizar o resultado e genotipar foi realizada eletroforese em agarose 2,0%, corado com brometo de etídeo. A presença de bandas de 91 e 85 pb, corresponde ao genótipo polimórfico GG, as bandas de 176, 91 e 85 pb correspondem ao genótipo heterozigoto AG e a banda de 176 pb corresponde ao genótipo selvagem AA.

*Polimorfismo C341T do gene GSTP1:* A análise deste polimorfismo foi realizada por PCR convencional utilizando-se os *primers* descritos por Watson e colaboradores em 1998 [40]. Os produtos de PCR de 420 pares de bases (pb) foram analisados à eletroforese em agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Após, foi realizada a digestão com enzima *AcI* para a segunda etapa da técnica PCR-RFLP. Os produtos de

digestão enzimática foram analisados após eletroforese em agarose 2,5%, corado com brometo de etídeo. Na genotipagem a presença de bandas de 365 e 55 pb correspondem ao genótipo polimórfico TT, as bandas de 365, 247, 118 e 55 pb correspondem ao genótipo heterozigoto CT e as bandas de 247, 118 e 55 pb correspondem ao genótipo selvagem CC.

A avaliação molecular foi repetida em 10% das amostras para confirmação da genotipagem dos genótipos dos polimorfismos estudados.

### *Análise estatística*

Os dados demográficos foram tabulados por porcentagem. As frequências genótípicas dos polimorfismos *GSTP1* A313G e C341T foram avaliadas para o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HW) pelo Teste Qui-quadrado, utilizando o programa *BioEstat*, versão 5.0. A análise de haplótipos dos polimorfismos *GSTP1* A313G e C341T foi realizada utilizando o programa *Haploview* versão 4.2. O Teste de Regressão Logística Múltipla utilizando o programa *Minitab* (versão 16) foi realizado para determinar o efeito das variáveis analisadas no câncer de cabeça e pescoço. A análise incluiu: idade (referência: <mediana do grupo caso), gênero (referência: feminino), hábito tabagista (referência: não fumantes) e hábito etilista (referência: não etilistas).

A influência dos polimorfismos nas características clínico-patológicas do tumor foram analisadas por meio do Teste de Regressão Logística Binária. Em relação ao tamanho (T), os tumores foram classificados em T1 e T2 (pequena extensão) e T3 e T4 (grande extensão). De acordo com o comprometimento de linfonodos regionais (N) foi classificado em negativo (N0) e positivo (N1, N2 e N3). O tumor foi classificado em M0 (ausência de metástases à distância) e M1 (com metástases). O efeito dos polimorfismos no tempo de recidiva e sobrevida dos pacientes com CECP foi analisado por meio da Curva de *Kaplan Meier* e teste *Log Rank*. Os resultados foram apresentados em Odds Ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC – 95%). O nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## **Resultados**

O estudo analisou 197 pacientes e 514 controles. A mediana de idade foi de 59 anos, com variação de 34 a 83 anos no grupo caso e 44 anos, com variação de 24 a 90 anos no grupo controle. O gênero masculino foi predominante em ambos os grupos caso (90%) e controle (71,8%).

A Tabela 1 apresenta os resultados da análise de Regressão Logística Multipla para as características sócio-demográficas, fatores de risco e polimorfismos. Idade  $\geq 59$  anos (OR = 11,66; IC 95% = 6,51 – 20,86;  $p < 0,001$ ) e gênero masculino (OR = 2,13; IC 95% = 1,03 – 4,38;  $p = 0,04$ ) se mostraram fatores de risco para esse tipo tumoral. Houve associação entre o habito tabagista (OR = 11,00; IC 95% = 5,71 – 21,20;  $p < 0,001$ ) e consumo de álcool (OR = 4,14; IC 95% = 2,25 – 7,64;  $p < 0,001$ ) e maior risco de desenvolver CECP. Portadores do genótipo *GSTMI* nulo apresentaram maior risco de desenvolver a doença (OR = 4,27; IC 95% = 2,60 – 7,00;  $p < 0,001$ ). Por outro lado, o polimorfismo *GSTT1* apresentou associação com risco reduzido para o CECP (OR = 0,30; IC 95% = 0,18 – 0,51;  $p < 0,001$ ). O polimorfismo A313G do gene *GSTP1* também foi associado com diminuição do risco para CECP (OR = 0,60; IC 95% = 0,37 – 0,97;  $p = 0,037$ ).

As frequências genótípicas dos polimorfismos *GSTP1* A313G e C341T estão em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos ( $p > 0,05$ ). Os polimorfismos *GSTP1* A313G e C341T apresentam desequilíbrio de ligação (*logarithm of odds* (LOD) = 9,84; *Lewontin's D'* ( $D'$ ) = 0,657;  $X^2 = 0,053$ ). As frequências dos haplótipos *GSTP1* A313G/C341T diferiram significativamente entre os grupos caso e controle (Tabela 2). Os alelos selvagens para ambos os polimorfismos foram mais frequentes no grupo caso em relação ao grupo controle (0,72 *versus* 0,65;  $P = 0,013$ ). O haplótipo AT também apresentou maior frequência no grupo caso (0,03 *versus* 0,009;  $p = 0,019$ ). No grupo controle, o haplótipo GC foi mais frequente (0,23 *versus* 0,30;  $p = 0,015$ ).

Em relação ao sítio anatômico, foram observados 44% de tumores na cavidade oral, 32% na laringe, 19% na faringe e 5% dos indivíduos possuíam tumor de origem desconhecida. Em relação ao tamanho do tumor, 57% apresentaram tumores de grande extensão (não foi possível a classificação na categoria T para seis tumores). Em 55% dos casos não houve comprometimento de linfonodos regionais (N0) (não foi possível a classificação na categoria N para dois tumores). Apenas 3% dos pacientes apresentaram

metástases à distância (M1). A classificação em estadios foi possível para 194 pacientes.

Analisando o tratamento dos pacientes foi observado que o mais comum foi a associação de radioterapia e quimioterapia (69%), contra 26% e 5% para radioterapia exclusiva e quimioterapia exclusiva, respectivamente.

O estudo não mostrou associação entre os polimorfismos estudados e o sítio primário do tumor (Tabela 3). Também não foi encontrada nenhuma associação entre os genótipos e as características histopatológicas do tumor (Tabela 4).

A análise pela Curva de *Kaplan-Meier* mostrou que o tempo livre de recidiva em pacientes portadores do polimorfismo *GSTM1*, ou *GSTT1*, ou *GSTP1* não apresentou diferença significativa do tempo de recidiva em pacientes com CECP não portadores dos polimorfismos (Tabela 5; Figura 1). O tempo de sobrevida de portadores do alelo polimórficos *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T não foi significativamente diferente do tempo de sobrevida de não portadores (Tabela 5; Figura 2).

## Discussão

O presente estudo mostra que idade  $\geq 59$  anos, gênero masculino e os hábitos tabagista e etilista estão associados ao risco aumentado de desenvolver CEPC. Nossos achados confirmam dados da literatura referente à epidemiologia do CECP, os quais relatam a predominância dos casos entre a quarta e sexta década de vida com proporção de cinco homens para uma mulher e que, habito tabagista e consumo de álcool são fatores fortemente relacionados ao risco para este tipo de câncer [1,8,9,41-43].

Embora a proporção dos casos de câncer entre homens e mulheres têm sido modificada ao longo dos anos, no qual pode-se observar aumento dos casos entre as mulheres devido ao aumento do consumo de cigarro e álcool [44], as mulheres apresentaram maior frequência dos hábitos preventivos como alto consumo de frutas e vegetais na dieta comparado aos homens no câncer oral [45].

Os estudos de Dias et al. realizado em 2017 e Andrade et al. conduzido em 2015, ambos estudo foram realizados no nordeste do Brasil e evidenciaram aumento do risco do câncer oral em pacientes com sinergismo de hábitos tabagistas e etilistas comparado

ao não-sinérgico consumo de cigarro e álcool [41,46]. Ademais, o estudo de Dias e colaboradores mostrou que cerca de 96% dos pacientes com câncer oral analisados tiveram experiência com consumo de cigarro e bebida alcoólica, porém 43% desses casos relataram consumo não-sinérgico desses compostos [41]. Os carcinógenos do cigarro e do álcool podem se ligar aos constituintes celulares e levar à formação de adutos de DNA [47,48].

Em relação aos polimorfismos nos genes da família *GST*, neste estudo o genótipo nulo *GSTT1* foi menos frequente entre os pacientes e indivíduos saudáveis investigados e pode influenciar no risco reduzido para desenvolver CECP. Do mesmo modo, os estudos que incluíram pacientes com CECP como o estudo de Brunialti e colaboradores, o qual encontrou menor frequência do genótipo nulo *GSTT1* (16,8%)[49] nos indivíduos saudáveis do estudo e Silva e colaboradores consequentemente maior frequência do genótipo positivo *GSTT1* entre indivíduos saudáveis (24,1%) comparado aos pacientes com câncer do trato aereodigestivo superior (13,8%) [50].

Além disso, quanto ao genótipo nulo *GSTMI*, este parece estar associado com câncer oral [51], e está de acordo com nossas evidências sobre a associação do genótipo nulo *GSTMI* com CECP. Para o gene *GSTP1* nossos achados associaram pelo menos um alelo polimórfico do polimorfismo *GSTP1* A313G (AG/GG) com CECP, já o estudo de Brunialti e colaboradores associaram apenas o genótipo heterozigoto AG desse polimorfismo com este tipo de câncer.

Considerando os polimorfismos do gene *GSTP1*, não foi possível associar o polimorfismo *GSTP1* C341T com CECP, no entanto, essa associação foi confirmada para o polimorfismo *GSTP1* A313G. Assim como o estudo de Russo e colaboradores também realizado em brasileiros com CECP mostrou que pelo menos um alelo polomórfico do polimorfismo *GSTP1* A313G, genótipos AG/GG foram associados ao risco reduzido para desenvolver CECP [29], concordando com nossas associações para este polimorfismo. Em relação aos haplótipos do gene *GSTP1*, A313/C341 (alelos selvagens) e A313/T341 (alelo selvagem/alelo polimórfico) demonstraram associação com o CECP no nosso grupo amostral. Esses dados foram confirmados para o polimorfismo A313G por meio da associação haplótipo do G313/C341 (alelo polimórfico/alelo selvagem) com os indivíduos saudáveis deste estudo.

Ademais, o estudo de Ruwali e colaboradores mostrou que o genótipo homozigoto polimórfico 313-GG do gene *GSTP1* mostrou 75% de melhora na resposta ao tratamento comparado com 25% pacientes de genótipo homozigoto selvagem 313-AA [14]. Esses dados demonstram que os polimorfismos no gene *GSTP1* não só modificaram o risco para CECP, mas também desempenharam um papel importante na determinação da resposta quimioterapêutica [14].

Estudo de Brunialti e colaboradores relaciona os polimorfismos citados de genes *GSTs* com a detoxificação da cisplatina, quimioterápico usado para tratamento de carcinomas localmente avançados de CECP [49], o qual está entre os mais utilizados no tratamento dos pacientes do presente estudo. No entanto, o estudo de Brunialti e colaboradores não conseguiu estabelecer essas associações estatisticamente e relata que estudos com número amostral maior poderão mostrar melhor a relação entre resposta à esse quimioterápico e os polimorfismos *GSTs* [49]. Por outro lado, o estudo de Dhawan e colaboradores (2013), demonstraram associação dos genótipos nulos de *GSTM1* com toxicidade observada devido ao quimioterápico cisplatina [11].

No grupo amostral investigado pelo presente estudo realizado na região sudeste do Brasil no estado de São Paulo, o tratamento mais comum para CECP foi a associação de radioterapia e quimioterapia. Em comparação aos resultados obtidos no grupo amostral (77 pacientes) analisado pelo estudo de Dias e colaboradores realizado no ano de 2017, o qual também foi conduzido em população brasileira, porém na região do nordeste do país, os resultados mostraram que procedimentos cirúrgicos em abordagens isoladas ou em associação com radioterapia e quimioterapia foram os tratamentos mais frequentes para câncer oral [41].

Nossos achados não mostraram uma relação entre a sobrevida global e os genótipos estudados, assim como o estudo de Brunialti e colaboradores [49]. O estudo brasileiro de Soares e colaboradores realizado em 2017, corrobora com os achados relacionados à sobrevida e o gene *GSTP1*, porém este estudo investigou a expressão desse gene [52]. Ademais, há relatos de tendência à significância ( $p=0,053$ ) entre o polimorfismo de deleção de *GSTT1* e a sobrevida livre de progressão no adenocarcinoma gastroesofágico [53].

A associação de radioterapia e/ou quimioterapia no tratamento de CECP é evidenciada pela literatura [54-56]. Esses tratamentos são indicados quando há

impossibilidade de realizar a cirurgia no local do câncer, como no caso do tumores avançados que acometem regiões importantes entre os sítios desse tipo de câncer. Além disso, pode-se observar na rotina ambulatorial e nos resultados de outros estudos que os tumores avançados são mais frequentes [14,54], assim como os achados do presente estudo. Estudos relatam que o diagnóstico tardio de CECP pode acontecer devido à ausência de sintomas na maioria das lesões iniciais, além de falta de conhecimento de diagnóstico diferencial por parte de alguns profissionais de saúde, contribuindo para o diagnóstico tardio com tumores em estágios avançados (T3 e T4), já com indicações de radioterapia e/ou quimioterapia [55-57].

A expressão de *GST* em células cancerosas representa um fator importante em fenótipo mais agressivo e resistente. Deste modo, altos níveis de expressão de *GST* foram utilizados para direcionar seletivamente o tratamento do tumor com drogas ativadas por meio de enzimas *GST*. Essas estratégias com *GST*-ativado (TLK286) e pró-fármacos baseados em arsênio confirmam o potencial dos conjugados de Glutathione reduzida (GSH) como medicamentos anticancerígenos [58].

No presente estudo não foi possível estabelecer associação entre sítio anatômico primário, características clínico-patológicas do tumor, tempo livre de recidiva e sobrevida dos pacientes com CECP. Em relação ao sítio anatômico primário estudo anterior de pacientes brasileiros com CECP encontrou associação do *GSTT1* nulo com risco aumentado para laringe e diminuído para faringe, assim, mostrou que este polimorfismo pode modular o risco para desenvolver CECP neste sítio anatômico. Este estudo brasileiro também não encontrou associação dos polimorfismos *GSTs* investigados com as outras características clínico-patológicas do tumor [29].

As enzimas *GSTs* desempenham papel crucial no desenvolvimento da resistência à agentes anticancerígenos e podem modular as vias de sinalização que controlam a proliferação, diferenciação e apoptose celular. Essas funções específicas das *GSTs* podem levar ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e à identificação de alguns candidatos interessantes para o desenvolvimento pré-clínico e clínico do câncer [59].

O resumo da comparação entre os achados do presente estudo e os dados da literatura pode ser observado no Quadro 1.



## Conclusão

Portanto, nosso estudo mostra que idade  $\geq 59$  anos, gênero masculino e, hábitos tabagista e etilista são fatores de risco para CECP. Em relação aos polimorfismos a presença do genótipo nulo *GSTMI* está associada com aumento do risco para o câncer de cabeça e pescoço, enquanto o genótipo nulo *GSTTI* e o polimorfismo *GSTP1* A313G contribuem para a redução do risco para este tipo tumoral. Os polimorfismos dos genes *GSTMI*, *GSTTI* e *GSTP1* não estão associados com o sítio anatômico de ocorrência do tumor, extensão tumoral, acometimento de linfonodos regionais e progressão tumoral. Os polimorfismos não estão associados com o tempo livre de recidiva ou tempo de sobrevida dos pacientes tratados com quimioterapia e/ou radioterapia.

## Conflito de interesse

Todos os autores declaram não haver conflito de interesse em relação a este manuscrito.

## Agradecimentos

Os autores são gratos aos pacientes participantes, suas famílias e à equipe da Unidade em Pesquisa de Genética e Biologia Molecular que de alguma maneira apoiou o desenvolvimento do trabalho. Os autores também agradecem pelo apoio financeiro da “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo”-FAPESP, da “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior”-CAPES and “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”-CNPq e o suporte da FAMERP/ FUNFARME.

## Referências bibliográficas

- [1] Instituto Nacional do Câncer – <http://www.inca.gov.br>. Acessado em 11/08/2017.
- [2] Inglehart RC, Scanlon CS1, D'Silva NJ. Reviewing and reconsidering invasion assays in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2014;50(12):1137-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.09.010>.
- [3] Gao J, Panizza B, Johnson NW, Coman S, Clough AR. Basic consideration of research strategies for head and neck cancer. *Front Med.* 2012;6(4):339-53. <https://doi.org/10.1007/s11684-012-0213-7>.

- 
- [4] Calzada AP, St. John MA, Abemayor E, Wong DTW. Molecular Pathology of Head and Neck Cancer. *Molecular Surgical Pathology*. 2013; 307-323. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4900-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4900-3_14).
- [5] Rothenberg SM, Ellisen LW. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest*. 2012;122(6):1951-7. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI59889>
- [6] Mirghani H, Sturgis EM, Aupérin A, Monsonego J, Blanchard P. Is there an increased risk of cancer among spouses of patients with an HPV-related cancer: A systematic review. *Oral Oncol*. 2017;67:138-145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.02.024>.
- [7] Blitzer GC, Smith MA, Harris SL, Kimple RJ. Review of the clinical and biologic aspects of human papillomavirus-positive squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014;88(4):761-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.08.029>.
- [8] Galbiatti AL, Padovani-Junior JA, Maníglia JV, Rodrigues CD, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2013;79(2):239-47. <http://dx.doi.org/10.5935/1808-8694.20130041>.
- [9] Ruback MJ, Galbiatti AL, Arantes LM, Marucci GH, Russo A, Ruiz-Cintra MT, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Clinical and epidemiological characteristics of patients in the head and neck surgery department of a university hospital. *Sao Paulo Med J*. 2012;130(5):307-13. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-31802012000500007>.
- [10] Troy JD, Weissfeld JL, Diergaard B, Youk AO, Buch SC, Romkes M, Grandis JR. Polymorphisms in NAT2 and GSTP1 are associated with survival in oral and oropharyngeal cancer. *Cancer Epidemiology*. 2013;37:505-511. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2013.02.009>.
- [11] Dhawan D, Panchal H, Shukla S, Padh H. Genetic variability & chemotoxicity of 5-fluorouracil & cisplatin in head & neck cancer patients: a preliminary study. *Indian Journal of Medical Research*. 2013;137:125-129. PMID: PMC3657875. <http://www.ijmr.org.in/text.asp?2013/137/1/125/108290>.

- [12] Shukla P, Gupta D, Pant MC, Parmar D. CYP 2D6 polymorphism: A predictor of susceptibility and response to chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2012;8(1):40-45. <http://www.cancerjournal.net/text.asp?2012/8/1/40/95172>.
- [13] Ekhardt C, Rodenhuis S, Smits PHM, Beijnen JH, Huitema ADR. An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. *Cancer Treatment Reviews*. 2009;35:18-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.07.003>.
- [14] Ruwali M, Pant MC, Shah PP, Mishra BN, Parmar D. Polymorphism in cytochrome P450 2A6 and glutathione S-transferase P1 modifies head and neck cancer risk and treatment outcome. *Mutation Research*. 2009;669:36-41. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.04.007>.
- [15] Sociedade Brasileira de Cancerologia. Câncer de Cabeça e Pescoço. Sociedade Brasileira de Cancerologia - <http://www.sbcancer.org.br/>. Acessado em 11/07/2014.
- [16] Brasil. Ministério da Saúde/ Secretaria de Atenção à Saúde/ Departamento de Regulação, Avaliação e Controle/Coordenação Geral de Sistemas de Informação – 21ª Edição. Setembro de 2015. <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/manualoncologia21aedicao14092015.pdf>. Acessado em 10/08/2017.
- [17] Lacko M, Ophuis MBO, Peters WHM, Mannil JJ. Genetic polymorphisms of smoking-related carcinogen detoxifying enzymes and head and neck cancer susceptibility. *Anticancer Research* 2009;29:753-62. PMID: 19331232. <http://ar.iiarjournals.org/content/29/2/753.long>
- [18] Marchewka Z, Piwowar A, Ruzik S, Długosz A. Glutathione S - transferases class Pi and Mi and their significance in oncology. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017;71(0):541-550. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.3835>.
- [19] Galal AM, Walker LA, Khan IA. Induction of GST and related events by dietary phytochemicals: sources, chemistry, and possible contribution to chemoprevention. *Curr Top Med Chem*. 2015;14(24):2802-21. <https://doi.org/10.2174/1568026615666141208110721>.

- [20] Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E (2010) Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 154(2):103-116. <https://doi.org/10.5507/bp.2010.017>.
- [21] Bock KW. Homeostatic control of xeno- and endobiotics in the drug-metabolizing enzyme system. *Biochem Pharmacol.* 2014;90(1):1-6. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.04.009>.
- [22] Ginsberg G, Smolenski S, Hattis D, Guyton KZ, Johns DO, Sonawane B. Genetic Polymorphism in Glutathione Transferases (GST): Population distribution of GSTM1, T1, and P1 conjugating activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2009;12(5-6):389-439. <https://doi.org/10.1080/10937400903158375>.
- [23] Hayes, J. D., Flanagan, J. U., and Jowsey, I. R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005;45:51–88. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.
- [24] Whalen, R., and Boyer, T. Human glutathione S-transferase. *Semin. Liver Dis.* 1998;18:345–358. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-1007169>.
- [25] Ye Z, Song H, Higgins JP, Pharoah P, Donesh J. Five Glutathione transferase gene variant in 23, 452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. *Plos Med.* 2006;7:91. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0030091>.
- [26] Zheng T, Holford TR, Zhahm SH, Owens PH, Boyle P, Zhang Y, Wise JP, Stephenson LP, Ali-Osman F. Cigarette smoking glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Causes Control.* 2002;13:637-45. <https://doi.org/10.1023/A:1019500109267>.
- [27] Seigard J, Ekstrom G. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect* 1999;20:743–748. PMID: PMC1470052.
- [28] Hatagima A, Costa ECB, Marques CFS, Koifman RJ, Boffetta P, Koifman S. Glutathione S-transferase polymorphisms and oral cancer: A case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncology* 2008;44:200-7. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2007.02.001>.
- [29] Russo A, Francelin PR, Galbiatti AL, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino EC, et al. Association between GSTP1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms involved in

- xenobiotic metabolism and head and neck cancer development. *Mol Biol Rep* 2013;40:4181-8. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2499-1>.
- [30] Russo, A. Avaliação de polimorfismos de genes metabolizadores de xenobióticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço [Dissertação]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2011. <http://bdtd.famerp.br/handle/tede/98>.
- [31] Cury NM, Russo A, Galbiatti AL, Ruiz MT, Raposo LS, Maniglia JV, et al. Polymorphisms of the CYP1A1 and CYP2E1 genes in head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol Biol Rep* 2012;39(2):1055-63. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0831-1>
- [32] Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang M-J, Sidransky JJD. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000;60:3155-3159. PMID: 10866304 <http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/12/3155.long>
- [33] Kjaerhein K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancer: a prospective study of 10.900 Norwegian men. *Cancer Causes and Control* 1998;9:99-108. <https://doi.org/10.1023/A:1008809706062>.
- [34] Lee KJ. *Essential otorhinolaryngology*. 10<sup>a</sup> ed New Haven, CT: McGraw-Hill Education / Medical; 2012. ISBN 13: 9780071482707.
- [35] Sobin L, Gospodarowicz MK, Wittekind C, eds. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th Edition: UICC; 2009. ISBN: 978-1-4443-5896-4.
- [36] American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer Staging Manual* 7th ed. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. eds. New York: Springer; 2009. ISBN 978-0-387-88442-4.
- [37] Lessa GS, De Moraes ED, Carvalho EC, Agra I. Quimioterapia nos tumores de cabeça e pescoço. Em Guimarães, JRQ. *Manual de oncologia*, 3<sup>a</sup> ed. Editora BBS, São Paulo, 2008; p. 1333 e 1334.
- [38] Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett*. 1996;107:229-33. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835\(96\)04832-X](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835(96)04832-X).

- [39] Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione-S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*. 1997;18:641–4. <https://doi.org/10.1093/carcin/18.4.641>.
- [40] Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relation to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*. 1998;19(2):275-80. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.2.275>.
- [41] Dias AKS, Diniz MF, Grangeiro MTV, de Araujo TLC, Feitosa DAS. Epidemiological profile of diagnosed injuries in bucal cancer: study of a brazilian population. *Int J Inf Res Rev* 2017;4(7):4315-4319. <http://www.ijirr.com/epidemiological-profile-diagnosed-injuries-bucal-cancer-study-brazilian-population>.
- [42] Wopken K, Bijl HP, Langendijk JA. Prognostic factors for tube feeding dependence after curative (chemo-) radiation in head and neck cancer: A systematic review of literature. *Radiother Oncol*. 2017 Sep 21. pii: S0167-8140(17)32545-8. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.08.022>.
- [43] Casati MFM, Vasconcelos JA, Vergnhanini GS, Contreiro PF, da Graça TB, Kanda JL, Akerman M, de Matos LL. Epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço no Brasil: estudo transversal de base populacional (Head and neck cancer epidemiology in Brazil: populational based cross-sectional study). *Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço* 2012;41(4):186-191. ID: lil-658429. <http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-658429>.
- [44] Osazuwa-Peters N., Massa ST, Christopher KM, Walker RJ, Varvares, MA. Race and sex disparities in long-term survival of oral and oropharyngeal cancer in the United States. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2016;142(2):521-528. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-2061-8>.
- [45] Turati F, Rossi M, Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. *Br J Nutr*. 2015;113:Suppl 2:S102-10. <https://doi.org/10.1017/S0007114515000148>.
- [46] Andrade JOM., Santos CADST, Oliveira MC. Fatores associados ao câncer de boca: um estudo de caso-controle em uma população do Nordeste do Brasil. *Revista*

- Brasileira de Epidemiologia 2015;18(4):894-905. <http://dx.doi.org/10.1590/1980-5497201500040017>.
- [47] Licitra L, Rossini C, Bossi P, Locati L. Advances in the changing patterns of aetiology of head and neck cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;14:95-9. <http://dx.doi.org/10.1097/01.moo.0000193170.23956.5f>.
- [48] Singh PP, Chandra A, Mahdi F, Roy A, Sharma P. Reconnect and Reconnect the Antioxidant Hypothesis in Human Health and Disease. *Ind J Clin Biochem* 2010;25(3):225–243. <https://doi.org/10.1007/s12291-010-0078-y>.
- [49] Brunialti, KCS. Correlação entre osteopontina sérica e polimorfismos nos genes GSTT1, GSTP1, ERCC1(118), XPD (751) com prognóstico e sobrevida em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço [Tese]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2009.
- [50] Silva TM, Marques CR, Marques Filho MF, Marques AB, Di Pietro G, Rios-Santos F. Association of the GSTT1 polymorphism in upper aerodigestive tract cancer with tobacco smoking. *Genet Mol Res*. 2014;13(1):528-37. <http://dx.doi.org/10.4238/2014.January.21.22>.
- [51] Liu H, Jia J, Mao X, Lin Z. Association of CYP1A1 and GSTM1 Polymorphisms With Oral Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Jul;94(27):e895. <http://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000000895>.
- [52] Soares PO, Maluf Cury P, Mendoza López RV, Cernea CR, Fukuyama EE, Livingstone Alves Figueiredo D, et al. HEAD AND NECK GENOME PROJECT–GENCAPO. GTSP1 expression in non-smoker and non-drinker patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182600. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0182600>.
- [53] Goekkurt E, Al-Batran SE, Hartmann JT, Mogck U, Schuch G, Kramer M, Jaeger E, Bokemeyer C, Ehninger G, Stoehlmacher J. Pharmacogenetic analyses of a phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil and leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a study of the arbeitsgemeinschaft internistische onkologie. *J Clin Oncol*. 2009;27(17):2863-73. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.19.1718>.
- [54] Rocha BQC, Eneas L, Oliveira RG, Junqueira RB, Verner FS. Epidemiological aspects of patients with head and neck neoplasms undergoing radiotherapy in Juiz

- 
- de Fora - MG. HU Revista, Juiz de Fora 2017;43(1):71-75. <https://hurevista.ufjf.emnuvens.com.br/hurevista/article/view/2644>.
- [55] Machiels JP, Lambrecht M, Hanin FX, Duprez T, Gregoire V, Schmitz S, Hamoir M. Advances in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck. F1000Prime Rep. 2014;6:44. <http://dx.doi.org/10.12703/P6-44>.
- [56] Santos VCB, de Assis AMA, da Silva LE, Ferreira SMS, Dias EP. Oral cancer: evaluation of the time from detection to treatment initiation at oncology center of Maceió. Revista Brasileira de Odontologia, Rio de Janeiro 2012;69(2):159-64. <http://revodonto.bvsalud.org/pdf/rbo/v69n2/a04v69n2.pdf>.
- [57] Santos LCO; Batista OM; Cangussu MCT. Characterization of oral cancer diagnostic delay in the state of Alagoas. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, São Paulo 2010;76(4):416-22. <http://dx.doi.org/10.1590/S1808-86942010000400002>.
- [58] Ramsay EE, Dilda PJ. Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors. Front Pharmacol. 2014;5:181. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2014.00181>.
- [59] Singh S . Cytoprotective and regulatory functions of glutathione Stransferases in cancer cell proliferation and cell death. Cancer Chemother Pharmacol. 2015;75(1):1-15. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2566-x>.



**Tabela 1**

Características sócio-demográficas, fatores de risco e polimorfismos *GSTT1*, *GSTMI*, *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e controles.

	<b>Caso</b>	<b>Controle</b>	<b>OR*</b>	<b>IC 95%**</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Idade</b>					
< 59	97 (49%)	448(87%)		Referência	
≥ 59	100 (51%)	66 (13%)	11,66	6,51-20,86	< 0,001
<b>Gênero</b>					
Feminino	20 (10%)	145 (28%)		Referência	
Masculino	177 (90%)	369 (72%)	2,13	1,03– 4,38	0,040
<b>Tabagismo</b>					
Não	20 (10%)	309 (60%)		Referência	
Sim	177 (90%)	205 (40%)	11,00	5,71 – 21,20	< 0,001
<b>Etilismo</b>					
Não	28 (14%)	260 (51%)		Referência	
Sim	169 (86%)	254 (49%)	4,14	2,25 – 7,64	< 0,001
<b><i>GSTT1</i></b>					
Positivo	133 (67%)	402 (78%)		Referência	
Negativo	64 (33%)	112 (22%)	0,30	0,18 – 0,51	< 0,001
<b><i>GSTMI</i></b>					
Positivo	98 (50%)	275 (53%)		Referência	
Negativo	99 (50%)	239 (47%)	4,27	2,60 – 7,00	< 0,001
<b><i>GSTP1</i> A313G*</b>					
AA	101 (57%)	227 (44%)		Referência	
AG/GG	77 (43%)	287 (56%)	0,60	0,37 – 0,97	0,037
<b><i>GSTP1</i> C341T**</b>					
CC	173 (90%)	460 (89%)		Referência	
CT/TT	20 (10%)	54 (11%)	0,85	0,39 – 1,86	0,688

\*OR = Odds Ratio. \*\*IC 95% = Intervalo de confiança de 95%. \*A amplificação foi possível para 178 pacientes do grupo caso. \*\* A amplificação foi possível para 193 pacientes do grupo caso.

**Tabela 2**

Frequências dos haplótipos dos polimorfismos A313G e C341T do gene *GSTP1* em pacientes com CECP e controles.

<b>Polimorfismos <i>GSTP1</i> A313G / C341T</b>			
Haplótipo	CECP	Controle	Valor de p
AC	0,72	0,65	0,013
GC	0,23	0,30	0,015
GT	0,03	0,05	0,085
AT	0,03	0,009	0,019

**Tabela 3**

Polimorfismos *GSTT1*, *GSTMI*, *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T em relação aos sítios primários dos tumores de câncer de cabeça e pescoço.

	Cavidade oral n = 87 (44%)			Laringe n = 64 (32%)			Faringe n = 37 (19%)		
	n(%)	OR <sup>+</sup> (IC95%)	p	n(%)	OR <sup>+</sup> (IC95%)	p	n(%)	OR <sup>+</sup> (IC95%)	p
<b><i>GSTMI</i></b>									
positivo	43 (49)	Referência		33 (51)	Referência		19 (51)	Referência	
negativo	44 (51)	0,98 (0,53-1,83)	0,955	31 (49)	1,02 (0,51-2,04)	0,945	18 (49)	0,78 (0,36-1,73)	0,545
<b><i>GSTT1</i></b>									
positivo	63 (72)	Referência		48 (75)	Referência		27 (73)	Referência	
negativo	24 (28)	0,83 (0,41-1,67)	0,596	16 (25)	0,77(0,35-1,70)	0,513	10 (27)	0,97 (0,40-2,38)	0,947
<b><i>GSTP1</i> A313G*</b>									
A/A	46 (57,5)	Referência		28 (50)	Referência		22 (59)	Referência	
A/G e GG	34 (42,5)	0,89 (0,48-1,67)	0,727	28 (50)	1,47 (0,74-2,93)	0,269	11 (41)	0,66 (0,29-1,48)	0,312
<b><i>GSTP1</i> C341T*</b>									
C/C	76 (90,5)	Referência		57 (90,5)	Referência		33 (91,6)	Referência	
C/T	09 (9,5)	1,07 (0,39-2,92)	0,899	06 (9,5)	0,48 (0,14-1,65)	0,243	03 (8,4)	1,44 (0,43-4,82)	0,554

<sup>+</sup>Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e hábitos etilista e tabagista. \* A amplificação não foi possível para todos os pacientes.

**Tabela 4**

Parâmetros clínico-histopatológicos em relação aos polimorfismos *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

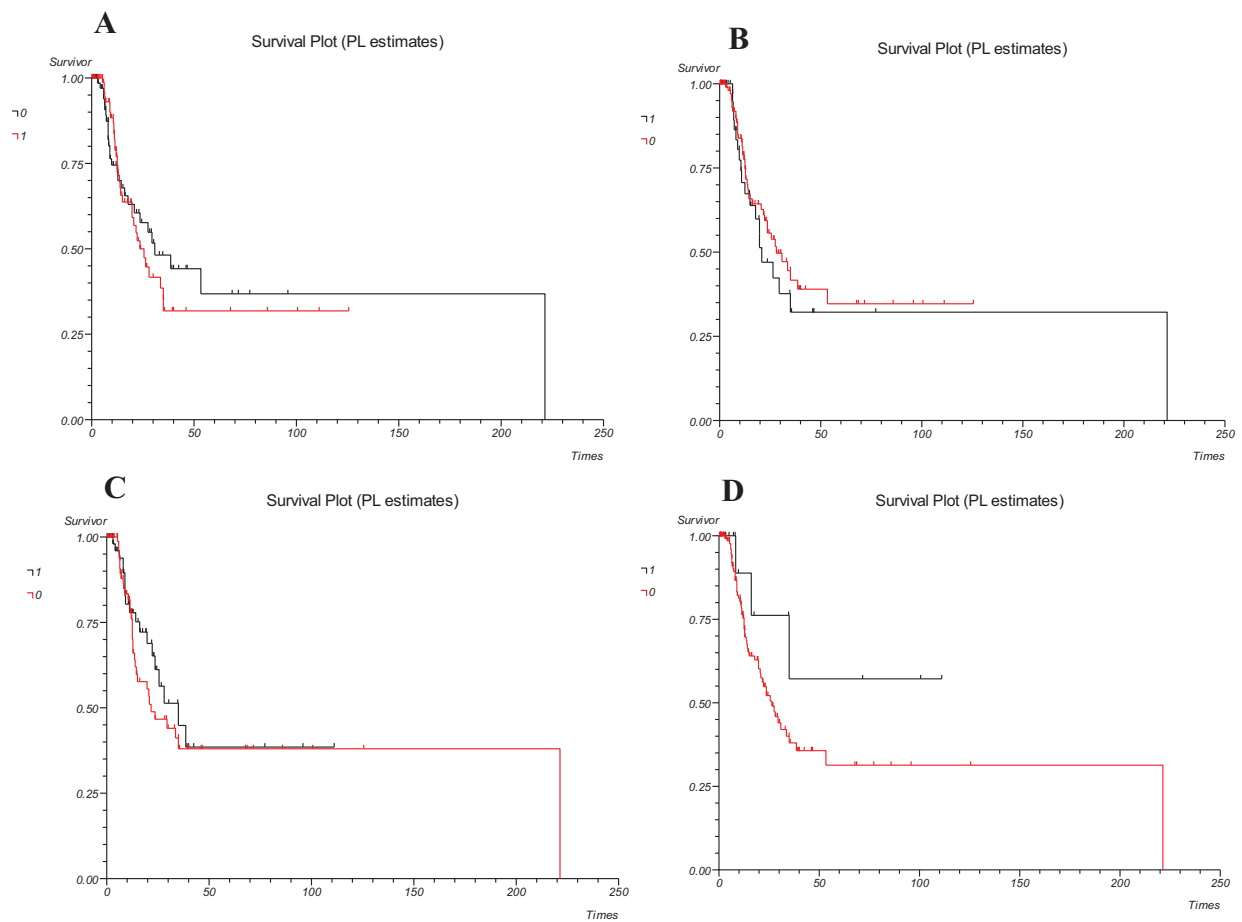
	Extensão Tumoral				Acometimento de linfonodos regionais				Progressão tumoral (TNM)			
	T1/T2 n(%)	T3/T4 n(%)	O.R. <sup>+</sup> (I.C.95%)	p	N=0 n(%)	N≥1 n(%)	O.R. <sup>+</sup> (I.C.95%)	p	Não avanzado n(%)	Avanzado n(%)	O.R. <sup>+</sup> (I.C.95%)	p
<b><i>GSTM1</i></b>												
positivo	40 (51,3)	56 (49,5)	1,00		48 (44,8)	48 (54,5)	1,00		31 (50)	64 (48,5)	1,00	
negativo	38 (48,7)	57 (50,5)	1,06 (0,57-1,97)	0,86	59 (55,2)	40 (45,5)	0,74 (0,40-1,38)	0,35	31 (50)	68 (51,5)	1,15 (0,59-2,24)	0,673
<b><i>GSTT1</i></b>												
positivo	55 (70,5)	82 (72,6)	1,00		78 (72,8)	61 (69,3)	1,00		44 (70,9)	95 (71,9)	1,00	
negativo	23 (29,5)	31 (27,4)	0,82 (0,41-1,65)	0,58	29 (27,2)	27 (30,7)	1,23 (0,62-2,48)	0,55	18 (29,1)	37 (28,1)	1,22 (0,57-2,63)	0,605
<b><i>GSTP1</i> A313G*</b>												
A/A	42 (59)	55 (54,4)	1,00		55 (57,9)	46 (56)	1,00		34 (60,7)	67 (55,8)	1,00	
A/G e GG	29 (41)	46 (45,6)	1,16 (0,62-2,16)	0,65	40 (42,1)	36 (44)	1,13 (0,61-2,11)	0,70	22 (39,3)	53 (44,2)	1,05 (0,53-2,06)	0,896
<b><i>GSTP1</i> C341T**</b>												
C/C	71 (92)	98 (89)	1,00		91 (80,5)	80 (91)	1,00		56 (91,8)	114 (88,4)	1,00	
C/T	06 (8)	12 (11)	0,93 (0,34-2,54)	0,89	12 (19,5)	08 (9)	0,72 (0,26-2,00)	0,53	05 (8,2)	15 (11,6)	1,27 (0,40-3,98)	0,685

<sup>+</sup>Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e hábitos etilista e tabagista. \*A amplificação foi possível para 172 pacientes. \*\*A amplificação foi possível para 187 pacientes.

**Tabela 5**

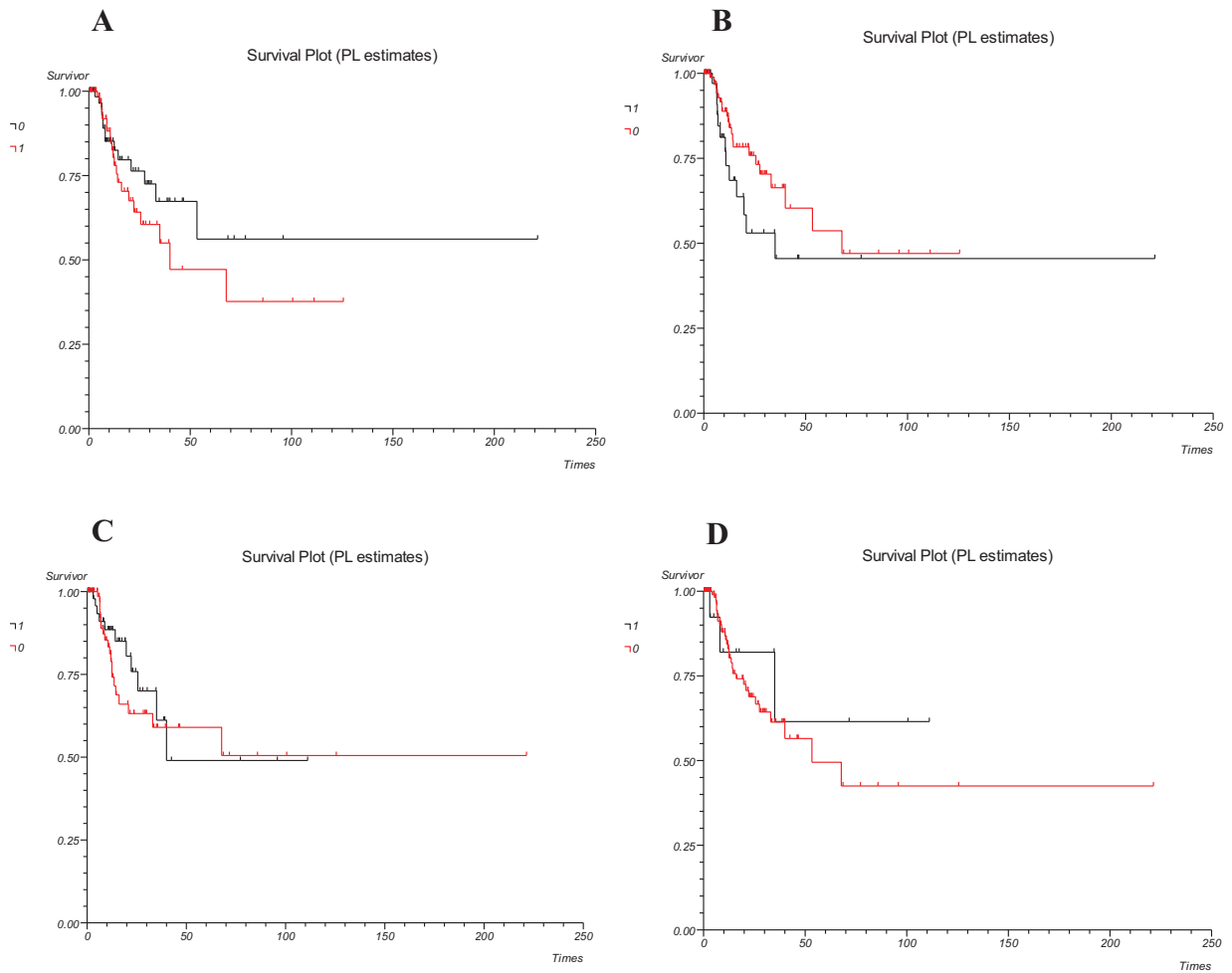
Polimorfismos *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* A313G e *GSTP1* C341T em relação à recidiva e sobrevida de pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

<b>Polimorfismos</b>	<b>Recidiva (12 meses)</b>	<b>Valor de p <i>Log Rank</i></b>	<b>Sobrevida (12 meses)</b>	<b>Valor de p <i>Log Rank</i></b>
<b><i>GSTT1</i></b>				
Positivo	23%	0,467	85%	0,135
Negativo	30%		72%	
<b><i>GSTM1</i></b>				
Positivo	26%	0,717	85%	0,314
Negativo	22%		80%	
<b><i>GSTP1</i> A313G</b>				
AA	24%	0,450	78%	0,487
AG/GG	23%		88%	
<b><i>GSTP1</i> C341T</b>				
CC	25%	0,164	83%	0,566
CT/TT	12%		82%	



**Figura 1**

Curva de *Kaplan-Meier* para análise de recidiva dos pacientes submetidos a tratamento em relação aos polimorfismos *GSTM1* (A), *GSTT1* (B), *GSTP1* A313G (C) e *GSTP1* C341T (D).



**Figura 2**

Curva de *Kaplan-Meier* para análise de sobrevida dos pacientes submetidos a tratamento em relação ao polimorfismo *GSTM1* (A), *GSTT1* (B), *GSTP1* A313G (C) e *GSTP1* C341T (D).

### Quadro 1.

Comparação entre os dados do presente estudo e os dados dos estudos apresentados na discussão.

Referência Autor, ano (Nº)	País	Tamanho amostral (N)		Gênero – N (%)				Idade Média ± DP		Hábito Tabagista – N (%)				Hábito Etilista – N (%)				Tratamento – N (%)			Polimor- fismos
				Feminino		Masculino				Não		Sim		Não		Sim		RT	QT	RT e QT	
		Caso	Contr	Caso	Contr	Caso	Contr	Caso	Contr	Caso	Contr	Caso	Contr	Caso	Contr						
Licitra et al. 2006[47]	Itália	Revisão de literatura																			
Brunialti, 2009 [51]	Brasil	95	-	8 (8,4)	-	87 (91,6)	-	59*	-	6 (6,3)	-	89 (93,7)	-	15 (15,8)	-	80 (84,2)	-	-	89 (93,7)	-	<i>GSTT1, GSTMI e GSTP1 A313G</i>
Goekkurt et al. 2009 [53]	Alemanha	134	-	42 (31)	-	92 (69)	-	64*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	134 (100)	-	<i>GSTT1, GSTMI e GSTP1 A313G</i>
Ruwali et al. 2009 [14]	Índia	350	350	-	-	350 (100)	350 (100)	53 ±8	52 ±10	50 (14,3)	169 (48,3)	300 (85,7)	181 (51,7)	-	-	-	-	-	-	250 (100)	<i>GSTP1 A313G</i>
Singh et al. 2010 [48]	Índia	Revisão de literatura																			
Santos et al. 2010 [57]	Brasil	74	-	22 (29,7)	-	52 (70,3)	-	57,22 ±14,01	-	17 (23)	-	57 (77)	-	43 (58)	-	31 (42)	-	-	-	-	-
Casati et al. 2012 [43]	Brasil	154.746	-	46.424 (30)	-	108.322 (70)	-	54,5*	-	23.367 (15,1)	-	131.379 (84,9)	-	46.424 (30)	-	108.322 (70)	-	-	-	-	-
Ruback et al. 2012 [9]	Brasil	995	-	202 (20,3)	-	793 (79,7)	-	60,48*	-	247 (24,8)	-	747 (75,2)	-	415 (41,7)	-	579 (58,3)	-	129 (14,2)	18 (1,9)	59 (6,5)	-
Santos et al. 2012 [56]	Brasil	50	-	19 (38)	-	31 (62)	-	63*	-	5 (10)	-	45 (90)	-	31 (42)	-	29 (58)	-	(32,5)	-	(30)	-
Dhawan et al. 2013 [11]	Índia	23	-	4 (17,4)	-	19 (82,6)	-	-	-	0 (0)	-	23 (100)	-	-	-	-	-	-	23 (100)	-	<i>GSTT1, GSTMI e GSTP1 A313G</i>
Galbiatti et al. 2013 [8]	Brasil	Revisão de literatura																			
Russo et al. 2013 [29]	Brasil	261	514	32 (12,3)	145 (28,2)	229 (87,7)	369 (71,8)	48*	-	40 (15,3)	309 (60,1)	221 (84,7)	205 (39,9)	70 (26,8)	260 (50,6)	191 (73,2)	254 (49,4)	-	-	-	<i>GSTT1, GSTMI, GSTP1 A313G e C341T</i>
Machiels et al. 2014 [55]	Bélgica	Revisão de literatura																			



Referência Autor, ano (N°)	País	Tamanho amostral (N)		Gênero – N (%)				Idade Média ± DP		Hábito Tabagista – N (%)				Hábito Etilista – N (%)				Tratamento – N (%)			Polimorfismos	
				Feminino		Masculino				Não		Sim		Não		Sim		RT	QT	RT e QT		
		Caso	Contr	Caso	Contr	Caso	Contr	Caso	Contr	Caso	Contr	Caso	Contr	Caso	Contr							
Ramsay et al., 2014 [58]	Austrália	Revisão de literatura																				
Silva et al., 2014 [49]	Brasil	116	224	16 (13,8)	31 (13,8)	100 (86,2)	193 (86,2)	60,9 ±12,5	58,2 ±11,9	6 (5,2)	114 (52,1)	110 (94,8)	105 (47,9)	27 (23,3)	110 (56,1)	89 (76,7)	86 (43,9)	-	-	-	<i>GSTT1</i> , <i>GSTMI</i> e <i>GSTP1</i> A313G	
Andrade et al. 2015 [46]	Brasil	127	254	35 (27,6)	70 (27,6)	92 (72,4)	184 (72,4)	60,66 ±13,51		13 (10,2)	127 (50,0)	114 (89,8)	127 (50,0)	27 (21,3)	113 (44,5)	100 (78,7)	141 (55,5)	-	-	-	-	
Liu et al. 2015 [50]	China	Revisão sistemática e Meta-análise																				
Singh et al. 2015 [59]	Índia	Revisão de literatura																				
Turati et al. 2015 [45]	Itália	Revisão de literatura																				
Osazuwa et al. 2016 [44]	Estados Unidos	22.162	-	6.582 (29,7)	-	15.580 (70,3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.438 (47,1)	-	-	-	
Dias et al. 2017 [41]	Brasil	77	-	21 (27)	-	56 (73)	-	-	-	5 (6)	-	72 (94)	-	5 (6)	-	72 (94)	-	8 (11)	1 (1)	8 (11)	-	
INCA, 2017 [1]	Brasil	Estimativa Brasileira de Câncer																				
Rocha et al. 2017 [54]	Brasil	28	-	10 (35,7)	-	18 (64,3)	-	59,78 ±12,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28 (100)	-	-	-	
Soares et al. 2017 [52]	Brasil	94	Estudo de expressão gênica																			
Wopken et al. 2017 [42]	Países Baixos /Europa	Revisão de literatura																				
Presente estudo	Brasil	197	514	20 (10)	145 (28)	177 (90)	369 (72)	59*	44	20 (10)	309 (60)	177 (90)	205 (40)	28 (14)	260 (51)	169 (86)	254 (49)	51 (26)	10 (5)	135 (69)	<i>GSTT1</i> , <i>GSTMI</i> , <i>GSTP1</i> A313G e C341T	

RT: Radioterapia; QT: Quimioterapia; DP: Desvio Padrão; Contr: Controle; \*Ausência do valor de desvio padrão da idade.