

Polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* em indivíduos tabagistas com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço

GSTT1 and *GSTM1* polymorphism in cigarette smokers with head and neck squamous cell carcinoma

Joice Matos Biselli¹, Renata Cristina de Angelo
Calsaverini Leal², Mariângela Torreglosa Ruiz³,
Eny Maria Goloni-Bertollo⁴, José Victor Maniglia⁵,
Andréa Regina Baptista Rossit⁶, Érika Cristina
Pavarino-Bertelli⁷

Palavras-chave: glutatona transferase, neoplasmas de cabeça e pescoço, polimorfismo, tabaco, álcool.
Keywords: glutathione transferase, head and neck neoplasms, polymorphism, tobacco, alcohol.

Resumo / Summary

A variabilidade em genes relacionados aos processos de ativação e detoxificação de carcinógenos pode interferir na suscetibilidade ao câncer. **Objetivo:** Investigar a relação entre os polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* nulos e o risco para o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço em indivíduos tabagistas. **Material e Método:** Este estudo caso-controle foi realizado na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Brasil. Foram avaliadas as frequências dos genótipos nulos *GSTT1* e *GSTM1* por PCR multiplex em 60 pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e 60 indivíduos sem a doença. **Resultados:** A cavidade oral foi o sítio de tumor mais freqüente. O genótipo *GSTT1* nulo foi encontrado em 33,3% dos pacientes e em 23,3% dos indivíduos controles ($p=0,311$). Os grupos caso e controle apresentaram frequências do genótipo *GSTM1* nulo de 35% e 48,3%, respectivamente ($p=0,582$). Não foram encontradas associações entre o hábito etilista e genótipos nulos *GSTT1* e *GSTM1* em ambos os grupos (valores de $p>0,05$). O gênero masculino e o hábito etilista foram prevalentes em ambos os grupos. **Conclusão:** Neste estudo não foi possível estabelecer uma correlação entre os genótipos nulos *GSTT1* e *GSTM1* e o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço em indivíduos tabagistas.

Gene variability related to carcinogen activation and detoxification may interfere with susceptibility to head and neck cancer. **Aim:** To investigate the relation between *GSTT1* and *GSTM1* null polymorphisms and the risk of head and neck squamous cell carcinoma in cigarette smokers. **Material and Method:** A case-control study conducted at the Sao Jose do Rio Preto Medical School, Brazil. *GSTM1* and *GSTT1* null genotype frequencies were evaluated by multiplex PCR in 60 cigarette smokers with head and neck squamous cell carcinomas and 60 cigarette smokers without this disease. **Results:** The oral cavity was the most prevalent tumor site for squamous cell carcinoma. The *GSTT1* null genotype was found in 33.3% of the Experimental Group and 23.3% of the Control Group ($p=0.311$). Experimental and Control Groups had *GSTM1* null genotype frequencies of 35% and 48.3% ($p=0.582$). No association between alcohol consumption and *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes was found in these groups (p -values >0.05). There were more men, and alcohol consumption was prevalent in both groups. **Conclusion:** In this study we were unable to show a correlation between *GSTM1* and *GSTT1* genotypes and the development of head and neck squamous cell carcinomas in cigarette smokers.

¹ Licenciada em Ciências Biológicas, Mestranda em Ciências da Saúde pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP.

² Fisioterapeuta, Mestranda em Ciências da Saúde pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP.

³ Mestre em Ciências Biológicas (Genética), Doutoranda em Ciências da Saúde pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP.

⁴ Professora Livre-Docente do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP.

⁵ Professor Livre-Docente do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP.

⁶ Doutora em Ciências Biológicas (Genética), do Departamento de Doenças Dermatológicas Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP.

⁷ Doutora em Ciências Biológicas (Genética), do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, Departamento de Biologia Molecular, Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular - UPGEM. Endereço para correspondência: Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular - UPGEM - Av. Brigadeiro Faria Lima 5416 Bloco U6 São José do Rio Preto SP 15090-000.

Tel: (0xx17) 3201-5720

FAPESP - processo nº 04/159444-5 / CNPq - processo nº 477665/04.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 28 de setembro de 2005. Cod. 1461.

Artigo aceito em 24 de julho de 2006.

INTRODUÇÃO

O neoplasma de cabeça e pescoço é responsável por uma grande incidência de óbitos em todo o mundo, constituindo a sexta causa de morte por câncer¹. O tipo histológico mais frequente, o carcinoma de células escamosas (espinocelular), presente em mais de 90% dos casos²⁻⁴, é associado com o consumo de álcool e tabaco⁵⁻⁹. Sabe-se que a fumaça do cigarro é uma mistura complexa de mais de 4000 substâncias, entre as quais pelo menos 40 são carcinogênicas, iniciadoras ou promotoras de tumores em animais¹⁰. Os níveis de seus produtos eletrofilos lançados na circulação sanguínea dependem da atuação de enzimas envolvidas no biometabolismo, que compreende a ativação (Fase I) e detoxificação (Fase II) de compostos químicos^{10,11}. Polimorfismos em genes que codificam essas enzimas podem alterar sua expressão ou função, modificando o biometabolismo de compostos carcinógenos¹².

Vários genes polimórficos que codificam enzimas envolvidas na biotransformação de carcinógenos têm sido associados ao desenvolvimento de câncer¹³⁻²². Dois genes em particular, *GSTT1* e *GSTM1*, que codificam enzimas de fase II pertencentes à família das glutatíon S-transferases (GSTs), parecem relevantes para a suscetibilidade ao carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, pois atuam na detoxificação de metabólitos reativos de substâncias carcinógenas da fumaça do tabaco^{11-12,13,15,18,20,23}.

O gene *GSTM1* é polimórfico na população humana com um alelo apresentando atividade nula (*GSTM1*-) devido a uma grande deleção gênica, e dois outros funcionais (*GSTM1A* e *GSTM1B*). O gene *GSTT1* é também polimórfico na população humana, podendo apresentar genótipo nulo por deleção^{24,25}. Indivíduos que apresentam genótipo nulo desses genes em homozigose agrupam-se no fenótipo conjugador negativo, uma vez que ocorre perda completa da atividade enzimática^{26,27}, enquanto os que apresentam pelo menos um alelo funcional agrupam-se no fenótipo conjugador positivo²⁸.

Desse modo, a variabilidade individual em genes relacionados aos processos de ativação e detoxificação metabólica parece crucial na suscetibilidade ao câncer de cabeça e pescoço.

Assim, este estudo teve como objetivo identificar os genótipos nulos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes tabagistas com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e comparar essas frequências com aquelas observadas em indivíduos tabagistas sem história neoplásica, visando uma possível identificação de biomarcadores de suscetibilidade ao câncer de cabeça e pescoço.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo caso-controle, realizado na

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP. Os indivíduos com diagnóstico carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço confirmado histopatologicamente foram procedentes do Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base/ Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e do Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho, SP. O grupo controle foi constituído por indivíduos sem história de doença neoplásica pareado por sexo, idade e etnia e hábito etilista. Todos os indivíduos (pacientes e controles) eram tabagistas. Os indivíduos foram incluídos no estudo após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e todas as informações necessárias foram obtidas por meio de questionário padronizado para coleta de dados (sexo, etnia, tabagismo e etilismo) e mantidas em sigilo. Informações sobre tabagismo e etilismo foram limitadas quanto ao uso ou não de tabaco e álcool. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CEP-FAMERP -5639/2002) e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP - parecer nº 842/2003).

O DNA genômico foi extraído de sangue periférico segundo a técnica de Abdel-Rahman et al.²⁹. A amostra de sangue periférico foi colhida em tubo contendo anticoagulante (EDTA) e os linfócitos foram isolados com auxílio de Ficoll-Paque Plus. O DNA genômico foi obtido adicionando aos linfócitos isolados, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), proteinase K e RNase A. Após purificação com NaCl, o DNA foi precipitado com etanol e armazenado a -20°C em tampão Tris-EDTA para posterior análise.

A análise dos genes *GSTT1* e *GSTM1* foi realizada simultaneamente pela reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex, segundo Abdel-Rahman et al.³⁰. A amplificação da seqüência do DNA de interesse foi obtida por 35 ciclos que compreenderam etapas de desnaturação do DNA a 94°C por 2 minutos, anelamento das seqüências iniciadoras da reação (primers) a 59°C por 1 minuto e extensão das cadeias de DNA pela adição dos nucleotídeos a 72°C por 1 minuto. Uma seqüência do exon 7 do gene *CYP1A1* foi coamplificada como um controle interno de amplificação. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, sendo que o genótipo nulo (ambos os alelos com deleção) para os genes *GSTT1* e *GSTM1* foi identificado pela ausência dos fragmentos de amplificação de 480 pares de base (pb) e 219 pb, respectivamente. A presença do fragmento de 312 pb corresponde à seqüência amplificada do gene *CYP1A1* e revela o sucesso da reação de amplificação.

Os dados demográficos foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP) ou proporções. Para a análise estatística das frequências dos genótipos obtidos utilizou-se o teste exato de Fisher, com nível de significância menor que 5%.

RESULTADOS

Dados demográficos. Um total de 120 indivíduos foi recrutado para o estudo, dos quais 60 com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (média de idade $54,6 \pm 8$ anos) e 60 sem história de doença neoplásica (média de idade 54 ± 9 anos). Observou-se predominância do sexo masculino (90% homens vs 10% mulheres) e do hábito etilista (70% etilistas vs 30% não etilistas).

Tabela 1. Distribuição dos casos de câncer de cabeça e pescoço por sítio do tumor.

| Sítio | Número (%) |
|--|------------|
| Cavidade oral | 26 (43,3) |
| Supraglótico | 15 (25) |
| Glótico | 6 (10) |
| Subglótico | 1 (1,7) |
| Faringe | 4 (6,7) |
| Hipofaringe | 5 (8,3) |
| Outros sítios primários não conhecidos | 3 (5) |

Sítios primários. Todos os casos foram diagnosticados e confirmados patologicamente como carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. A distribuição quanto ao sítio primário do tumor entre os casos está apresentada na Tabela 1. Os tumores de cavidade oral foram mais representados em nosso estudo.

Freqüências dos polimorfismos. O genótipo *GSTT1* nulo [-] foi encontrado em 33,3% (20 de 60) dos pacientes e em 23,3% (14 de 60) dos indivíduos controles ($P = 0,311$), e 21 (35%) dos pacientes e 29 (48,3 %) dos indivíduos controle revelaram genótipo *GSTM1* nulo [-] ($p = 0,582$). O genótipo nulo combinado para os genes *GSTT1* e *GSTM1* foi observado em 10% (6 de 60) dos pacientes e em 8,3% (5 de 60) dos controles ($p = 1,0$). A combinação genotípica mais freqüente considerando a presença de um genótipo desfavorável (GST nulo) foi *GSTT1* [+] / *GSTM1* [-] em 31,6% (19 de 60) dos pacientes e 40% (24 de 60) dos controles ($p = 0,353$) (Tabela 2).

Os genótipos foram agrupados por sítio do tumor (Tabela 3) e não foi observada correlação com os genótipos nulos *GSTT1* e *GSTM1*.

Tabela 3. Distribuição dos genótipos *GSTT1* e *GSTM1* por sítio de tumor.

| Genótipos | Cavidade Oral | Supraglótico | Glótico | Subglótico | Faringe | Hipofaringe | Outros |
|------------------|---------------|--------------|---------|------------|---------|-------------|--------|
| <i>GSTT1</i> [+] | 20 | 11 | 2 | 0 | 3 | 3 | 2 |
| <i>GSTT1</i> [-] | 6 | 4 | 4 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| <i>GSTM1</i> [+] | 13 | 10 | 4 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| <i>GSTM1</i> [-] | 13 | 5 | 2 | 0 | 2 | 3 | 1 |

* Genótipos nulo [-], não nulo [+].

Tabela 2. Distribuição genotípica para *GSTT1* e *GSTM1* entre os grupos caso e controle.

| Genótipos* | Pacientes (n = 60) n (%) | Controle (n=60) n (%) |
|--|-----------------------------|--------------------------|
| Individuais | | |
| <i>GSTT1</i> [-] | 20 (33,3) | 14 (23,3) |
| <i>GSTM1</i> [-] | 25 (41,7) | 29 (48,3) |
| Combinados <i>GSTT1</i> / <i>GSTM1</i> | | |
| [-] / [-] | 06 (10,0) | 05 (8,3) |
| [+] / [+] | 21 (35,0) | 22 (36,7) |
| [+] / [-] | 19 (31,6) | 24 (40,0) |
| [-] / [+] | 14 (23,3) | 09 (15,0) |

* Genótipos nulo [-], não nulo [+].

As análises estatísticas não evidenciaram relação entre etilismo e genótipos nulos [-] *GSTT1* e *GSTM1* quando comparados pacientes e controles etilistas (*GSTT1*, $p = 0,34$; *GSTM1*, $p = 0,28$; *GSTM1*[-] / *GSTT1*[-], $p = 1,0$).

DISCUSSÃO

Os dados epidemiológicos têm apontado para o consumo do fumo e do álcool como os principais fatores de risco de transformação maligna em casos de câncer de cabeça e pescoço^{31,32}. A avaliação isolada da participação destes agentes na tumorigênese do câncer de cabeça e pescoço é de difícil tarefa, considerando que o fumante tende a consumir álcool e vice-versa. Além disso, há décadas as evidências mostram que os dois fatores atuam sinergicamente e, quando combinados, constituem a principal causa de tumores³².

Estudos demonstraram associação entre o hábito etilista e o desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço quando considerados o tempo de exposição e quantidade de álcool ingerida^{12,34}. Em nosso estudo, 70% dos pacientes com câncer são etilistas, o que reforça a associação entre o consumo de álcool e o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço, especialmente em uma amostra composta por pacientes tabagistas, embora não tenha sido possível obter informações referentes à quantidade de álcool ingerida e o tempo de exposição.

A predominância do sexo masculino observada neste estudo corrobora com os achados de Drummond

et al.²². Embora nossa casuística seja ainda pequena para explicar esta diferença entre os gêneros, em estudo epidemiológico realizado no Hospital A.C. Camargo, SP, Brasil, a predominância do sexo masculino em pacientes com carcinoma oral parece refletir as diferenças entre homens e mulheres em relação ao uso de tabaco e álcool em nosso país³⁵.

O sítio de tumor mais freqüente em nossos pacientes foi o de cavidade oral, sítio mais freqüentemente relatado pela literatura em tumores de cabeça e pescoço³⁶. Esta distribuição anatômica pode ser explicada pelo fato da nossa amostra ser constituída somente por pacientes tabagistas e, em sua maioria etilistas, uma vez que estes sítios do trato aéreo superior são expostos mais diretamente ao tabaco e ao álcool.

Estudos dos polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* realizados em populações brasileiras revelam freqüências similares dos polimorfismos. Rossit et al.³⁷, em um estudo realizado em populações provenientes dos estados do Pará e São Paulo, mostraram freqüências de 18 e 47,3% para os genótipos nulos dos genes *GSTT1* e *GSTM1*, respectivamente. O estudo de Rossini et al.³⁸ revelou freqüências de 25,4% para *GSTT1* [-] e 42,1% para *GSTM1* [-] em indivíduos do Rio de Janeiro. Em nosso estudo, freqüências similares foram observadas para estes genótipos (24,4 e 17,8% para *GSTT1* [-] em pacientes e controles, respectivamente, e 44,4 e 48,9% para *GSTM1* [-] em pacientes e controles, respectivamente). Freqüências mais elevadas dos polimorfismos *GSTT1* [-] e *GSTM1* [-] foram observadas por Drummond et al.^{21,22} em pacientes tabagistas brasileiros com carcinoma espinocelular oral (81,8% para *GSTT1*[-] e 70,5% para *GSTM1*[-]).

Os estudos dos polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* realizados em carcinomas de cabeça e pescoço são contraditórios. Vários autores demonstram uma associação com o genótipo nulo [-] *GSTM1*^{14,15,20,21,38,40,41}, enquanto outros não^{5,16,42,43}. Para o genótipo nulo [-] *GSTT1* também foi demonstrada uma relação em alguns estudos^{15,20,22,44} e ausência da mesma em outros^{5,16,37,39,41,43,46}. A combinação destes genótipos nulos e risco aumentado para este tipo de carcinoma também já foi observada^{14,41}. Além disso, o tempo e a quantidade de exposição a carcinógenos (álcool e tabaco) pode influenciar na interação destes genótipos para o desenvolvimento deste tipo de neoplasia^{12,34}, e esses dados não foram considerados em nosso estudo.

O estudo de König-Greger et al.⁴⁷ mostrou que a atividade da enzima *GSTM1* encontrava-se significativamente reduzida em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço em relação aos controles, mas não foi dependente do genótipo desfavorável *GSTM1*, o que pode sugerir a participação de outras enzimas em sua regulação.

Interessantemente, Evans et al.¹³ encontraram que o genótipo positivo [+] *GSTT1* está associado ao risco de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço entre os

tabagistas (OR = 1,6; CI 95% = 1,1-2,5) e sugerem que o genótipo nulo [-] *GSTT1* pode proteger o indivíduo para o desenvolvimento deste tipo de câncer. Embora usualmente as GSTs sejam consideradas como enzimas de detoxificação, para alguns substratos químicos em particular, como por exemplo, o diclorometano (DCM), a conjugação da glutationa com a enzima *GSTT1* pode resultar em ativação de um componente eletrofílico com conseqüente potencial mutagênico^{48,49}. Embora o DCM não esteja associado com tabaco, podem existir outros bioprodutos do tabaco que ganham função carcinogênica pela ativação mediada da enzima *GSTT1*. Dois outros estudos também mostraram risco aumentado de doença coronária e vascular periférica em tabagistas com genótipo *GSTT1* [+] ^{50,51}.

CONCLUSÃO

Neste estudo não foi possível estabelecer uma associação entre os genótipos nulos *GSTT1* e *GSTM1* e o desenvolvimento de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço em indivíduos tabagistas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara pela sua contribuição para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Walker DM, Boey G, McDonald, LA. The pathology of oral cancer. *Pathology* 2003;35(5):376-83.
2. Casiglia J, Woo SB. A comprehensive review of oral cancer. *Gen Dent* 2001;49(1):72-82.
3. Reichart PA. Identification of risk groups for oral precancer and cancer preventive measures. *Clin Oral Investig* 2001;5(4):207-13.
4. Ahmed KA, Robbins KT, Wong F, Salazar JE. Efficacy of concomitant chemoradiation and surgical salvage for N3 nodal disease associated with upper aerodigestive tract carcinoma. *Laryngoscope* 2000;110(11):1789-93.
5. Chang HW, Ling GS, Wei WI, Yuen AP. Smoking and drinking can induce p15 methylation in the upper aerodigestive tract of healthy individuals and patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2004;101(1):125-32.
6. Hasnis E, Reznick AZ, Pollack S, Klein Y, Negler RM. Synergistic effect of cigarette smoke and saliva on lymphocytes - the mediatory role of volatile aldehydes and redox active iron and possible implications for oral cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(5):326-839.
7. Kjaerheim K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancers: a prospective study of 10.900 Norwegian men. *Cancer Causes and Control* 1998;9(1):99-108.
8. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988;48(11):3282-7.
9. Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Wamakulasuriya S. An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncol* 2004;40:304-13.
10. Maser E. Stress, hormonal changes, alcohol, food constituents and drugs: factors that advance the incidence of tobacco smoke-related cancer? *TIPS* 1997;18(8):270-5.
11. Anwar WA, Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA. Genetic polymorphism

- of GSTM1, CYP2E1 and CYP2D6 in Egyptian bladder patients. *Carcinogenesis* 1996;17(9):1929-32.
12. Olshan, AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. GSTM1, GSTT1, GSTP1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9(2):185-91.
 13. Evans AJ, Henner WD, Eilers KM, Montalto MA, Wersinger EM, Andersen PE et al. Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck* 2004;26(1):63-70.
 14. Gronau S, Koenig-Greger D, Jerg M, Riechelmann H. Gene polymorphism in detoxification enzymes as susceptibility factor for head and neck cancer? *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;128(5):674-80.
 15. Amador AG, Righi PD, Radpour S, Everett ET, Weisberger E, Langer M et al. Polymorphisms of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93(4):440-5.
 16. To-Figueroas J, Gené M, Gómez-Catalán J, Piqué E, Borrego N, Caballero M et al. Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphism in relation to laryngeal carcinoma risk. *Cancer Lett* 2002;187(1-2):95-101.
 17. Jourenkova-Mironova N, Voho A, Bouchardy C, Wikman H, Dayer P, Benhamou S et al. Glutathione S-transferase GSTM3 and GSTP1 genotypes and larynx cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(2):185-8.
 18. Matthias C, Jahnke V, Jones PW, Hoban PR, Alldersea JE, Worrall S et al. Cyclin D1, Glutathione S-Transferase, and Cytochrome P450 genotypes and outcome in patients with upper aerodigestive tract cancers: assessment of the importance of individual genes using multivariate analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(9):815-23.
 19. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 1996;274(5286):430-2.
 20. Sreelekha TT, Ramadas K, Pandey M, Thomas G, Nalinakumari KR, Pillai MR. Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol* 2001;37(7): 593-8.
 21. Drummond SN, de Marco L, Noronha JCM, Gomez RS. GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004;40:52-5.
 22. Drummond SN, Gomez RS, Noronha JCM, Pordeus IA, Barbosa AA, de Marco L. Association between GSTT1 gene deletion and the susceptibility to oral squamous cell carcinoma in a cigaret-smoking subjects. *Oral Oncol* 2005;41:515-9.
 23. Nair UJ, Nair J, Mathew B, Bartsch H. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for oral leukoplakia in ethnic betel quid/tobacco chewers. *Carcinogenesis* 1999;20(5):743-8.
 24. Pemble S, Schroeder K, Spencer S, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM et al. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994;300(1):271-6.
 25. Rossit ARB, Conforti-Froes NDT. Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer. *Sociedade Brasileira de Cancerologia* 2000;10:22-30.
 26. Bruhn C, Brockmoller J, Kerb R, Roots I, Borchert HH. Concordance between enzyme activity and genotype of glutathione S-transferases theta (GSTT1). *Biochem Pharmacol* 1998;56(9): 1189-93.
 27. Seidgard J, Ekstrom G. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect* 1997;105 Suppl 4:791-7.
 28. Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6(9):733-43.
 29. Abdel-Rahman SZ, Nouraldeen AM, Ahmed AE. Molecular interaction of 2,3-[14c]-acrylonitrile with DNA in gastric tissues of rat. *J Biochem Toxicol* 1994;9(4):121-8.
 30. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar NA. A Multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 1996;107(2):229-33.
 31. Ogden GR. Alcohol and oral cancer. *Alcohol* 2005;35:169-73.
 32. Krauns KS, McClean MD, Nelson HH, Peters E, Calderon H, Kelsev KT. Duration but not intensity of alcohol and tobacco exposure predicts p16INK4A homozygous deletion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2006;66(8):4512-5.
 33. Mc Mahon S, Chen AY. Head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22(1):21-4.
 34. Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer-a review. *Oral Onc* 1998;34(6):441-7.
 35. Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head Neck* 2004;26(1):31-8.
 36. Dobrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24:9-17.
 37. Rossit ARB, Cabral IR, Conforti-Froes NDT. Avaliação das frequências alélicas de genes do biometabolismo em uma população brasileira. *Genet Mol Biol* 1999;22:23-23.
 38. Rossini A, Rapozo DCM, Amorim LMF, Macedo JMB, Medina R, Neto JFM et al. Frequencies of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet Mol Res* 2002;1(3):233-40.
 39. Buch SC, Notani PN, Bhisey RA. Polymorphism at GSTM1, GSTM3 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer in an indian population. *Carcinogenesis* 2002;23(5):803-7.
 40. Kiethubthwe S, Sriplung H, Au WW. Genetic and environmental interactions on oral cancer in Southern Thailand. *Environ Mol Mutagen* 2001;37(2):111-6.
 41. Hong YJ, Lee JK, Lee GH, Hong SI. Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes on larynx cancer risk among Korean smokers. *Clin Chem Lab Med* 2000;38(9):917-9.
 42. McWilliams JE, Evans AJ, Beer TM, Andersen PE, Cohen JI, Everts EC et al. Genetic polymorphisms in head and neck cancer risk. *Head Neck* 2000;22(6):609-17.
 43. Liu CJ, Chang CS, Lui MT, Dang CW, Shih YH, Chang KW. Association of GST genotypes with age of onset and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2005;34:473-7.
 44. Hamel N, Karimi S, Hebert-Blouin MN, Brunet JS, Gilfix B, Ghadirian P et al. Increased risk of head and neck cancer in association with GSTT1 nullizygoty for individuals with low exposure to tobacco. *Int J Cancer* 2000;87(3):452-4.
 45. Minnard GC, Spitz MR, Wu X, Hong WK, Etzel CJ. Evaluation of glutathione S-transferase polymorphism and mutagen sensitivity as risk factors for the development of second primary tumors in patients previously diagnosed with early-stage head and neck cancer. *Cancer* 2006;105(12):2636-44.
 46. Oude Ophuis MB, Manni JJ, Peters WH. Glutathione S-transferase T1 null polymorphism and the risk for head and neck cancer. *Acta Otolaryngol* 2006;126(3):311-7.
 47. Konig-Greger D, Riechelmann H, Wittich U, Gronau S. Genotype and phenotype of glutathione-S-transferase in patients with head and neck carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130(6):718-25.
 48. Sherratt PJ, Manson MM, Thomson AM, Hissink EA, Neal GE, van Bladeren PJ, et al. Increased bioactivation of dihaloalkanes in rat liver due to induction of class theta glutathione S-transferase T1-1. *Biochem J* 1998;335:619-30.
 49. Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res* 2000;463:247-83.
 50. Li R, Boerwinkle E, Olshan AF, Chambless LE, Pankow JS, Tyroler HA, et al. Increased bioactivation of dihaloalkanes in rat liver due to induction of class theta glutathione S-transferase T1-1. *Biochem J* 1998;335:619-30.
 51. Li R, Folsom AR, Sharrett AR, Couper D, Bray M, Tyroler HA. Interaction of the glutathione S-transferase genes and cigarette smoking on risk of lower extremity arterial disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 2001;154:729-38.