

**ELIZA CARLA BARROSO DUARTE**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS  
GENES *GSTM1* E *GSTT1* E A LEUCOPLASIA BUCAL**

**BELO HORIZONTE**

**2005**

**ELIZA CARLA BARROSO DUARTE**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES  
*GSTM1 E GSTT1* E A LEUCOPLASIA BUCAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Odontologia, área de Concentração Patologia Bucal, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

**BELO HORIZONTE**

**2005**

**Pai,**  
Dedico a você esta conquista.  
TE AMO!

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS razão do meu viver.

À minha mãe, por me amar e me apoiar nessa conquista.

À minha querida irmã Aninha, pela amizade e por estar sempre ao meu lado.

À minha cunhada Michele por ser minha grande amiga e por me ajudar sempre.  
Ao Dé e ao João por serem importantes em minha vida.

À Déia e Deza, minhas queridas primas-irmãs, pela amizade e por serem pessoas fundamentais em minha vida.

À minha querida madrinha Marina pela amizade.

À minha avó Pequena, meus tios Fátima, André, Graça, José Geraldo, Afonso, Naia e aos primos Bianca, Paola, Renato e Rui por serem especiais em minha vida.

Ao Leandro, pelo amor, carinho e confiança.

Ao professor Ricardo Santiago Gomez, pela orientação, disponibilidade e por abrir as portas do laboratório para que eu buscasse esta conquista.

Às professoras Cássia e Dorinha pela amizade, carinho, apoio.

Ao professor Ricardo Mesquita pelo apoio, disponibilidade e ensinamentos.

Ao professor Vagner Santos pela atenção no início da minha experiência didática.

Ao grande amigo Júlio Lacerda pela convivência, confiança e por ajudar em meu crescimento profissional.

As amigas Daniela Pacheco, Christiane Salgado e Larissa Santoro pela amizade verdadeira.

Ao amigo Luiz Henrique Lage pelo carinho, oportunidade e confiança profissional.

Aos colegas da Clinidonto pela excelente convivência e por torcerem por mim.

Aos colegas do laboratório de patologia bucal Jeane, Júnia, Alessandra, Carolina, Luciano, Flávio, André, Wagner Castro, e ao colega de mestrado Bruno Jhan.

Às novas colegas Anacélia, Aline e Vanessa, pelos agradáveis momentos de descontração.

Aos queridos alunos de iniciação científica Marcus e Marina por me ajudarem nos trabalhos laboratoriais.

Às funcionárias Inês, Heloísa e Cristiane e aos funcionários do Hospital Municipal Odilon Behrens pela ajuda profissional.

Aos meus alunos de graduação pelo carinho e confiança.

Aos pacientes por contribuírem para que este trabalho fosse realizado.

## LISTA DE ABREVIÇÕES

A	Adenina
C	Citosina
°C	Graus Celsius
$C_6H_{12}O_6$	Glicose
CYP450	Citocromo p-450
<i>CYP1A1</i>	Gene citocromo P-450, subfamília 1A, polipeptídeo 1
<i>CYP2E1</i>	Gene citocromo P-450, subfamília 2E, polipeptídeo 1
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTPs	Desóxi-nucleotídeos trifosfato
G	Guanina
GST	Glutationa S-transferase
<i>GSTM1</i>	Gene glutaciona S-transferase classe $\mu$
<i>GSTT1</i>	Gene glutaciona S-transferase classe $\theta$
KCl	Cloreto de potássio
mM	Mili molar
$MgSO_4$	Sulfato de magnésio
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
OR	Odds ratio
PAH	Hidrocarboneto policíclico aromático

pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
T	Timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimerase
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
μL	Micro litro

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Frequência dos genótipos do gene <i>GSTM1</i> nos grupos casos e controles. Distribuição em relação à graduação histológica e localização. Artigo <i>GSTM1</i> e leucoplasia bucal.	29
Tabela 1- Frequência dos genótipos do gene <i>GSTM1</i> nos grupos casos e controles. Distribuição em relação à graduação histológica e localização. Artigo <i>GSTT1</i> e a leucoplasia bucal.	40



## RESUMO

A leucoplasia bucal é a lesão cancerizável mais comum da cavidade bucal e apresenta como principal fator de risco o consumo de tabaco em suas várias formas. As substâncias carcinogênicas do tabaco são metabolizadas por enzimas específicas em duas etapas denominadas fases I e II. Estas enzimas apresentam polimorfismos genéticos que influenciam na susceptibilidade individual a lesões cancerizáveis e ao câncer. A associação entre estes polimorfismos genéticos e o câncer é conflitante. O objetivo deste estudo foi investigar a associação entre a deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e a leucoplasia bucal em pacientes fumantes em uma população brasileira. Neste estudo do tipo caso-controle foi extraído DNA de 52 pacientes fumantes com o diagnóstico clínico de leucoplasia bucal e histopatológico de hiperqueratose com ou sem displasia epitelial (grupo caso) e 52 indivíduos fumantes sem nenhuma patologia bucal (grupo controle) a partir de raspados da mucosa clinicamente normal. A análise dos genótipos dos genes foi realizada através da reação em cadeia da polimerase e os produtos foram visualizados através da eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% e coloração pela prata. Os resultados demonstraram associação entre a deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e a leucoplasia bucal.

## SUMÁRIO

	<b>PÁGINA</b>
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 LEUCOPLASIA BUCAL	12
1.2 O METABOLISMO DE SUBSTÂNCIAS CARCINOGENICAS	14
1.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS	15
1.4 FAMÍLIA DAS GLUTATIONAS S-TRANSFERASES	15
2. ARTIGO-GSTM1 E LEUCOPLASIA BUCAL	18
3. ARTIGO-GSTT1 E LEUCOPLASIA BUCAL	31
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
5. CONCLUSÕES	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
7. ANEXOS	56
ANEXO A- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	
A 6,5%-GENE <i>GSTM1</i>	57
ANEXO B- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	
A 6,5%-GENE <i>GSTT1</i>	58

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 LEUCOPLASIA BUCAL

A leucoplasia bucal é definida como “uma placa predominantemente branca na mucosa bucal que não pode ser caracterizada clinicamente ou patologicamente como outra doença” (KRAMER *et al.*, 1978; VAN DER WAAL & AXÉLL, 2002). O diagnóstico final desta doença somente pode ser feito após avaliação histológica e, quando necessário, outros exames laboratoriais complementares (GOMEZ, 2005).<sup>1</sup> A leucoplasia bucal é a lesão cancerizável mais comum da cavidade bucal, no entanto o epitélio displásico ou carcinoma invasivo é encontrado apenas em 5% a 25% dos casos. A probabilidade de transformação maligna varia nas diferentes formas de leucoplasia e algumas características como presença de displasia epitelial, aparência clínica e localização da lesão aumentam esse risco (VAN DER WAAL & AXÉLL, 2002). O risco anual de transformação maligna das leucoplasias não excede 1% (SCHEIFELE & REICHART, 2003).

A leucoplasia bucal apresenta uma predileção por pacientes do sexo masculino, (70%) e acima dos 40 anos de idade (MEHTA *et al.*, 1981). Esta doença pode ocorrer em qualquer mucosa de revestimento da cavidade bucal. As lesões localizadas no soalho bucal, palato mole e língua são caracterizadas como de alto risco, enquanto lesões em outros sítios são consideradas como de baixo risco (ZHANG *et al.*, 2001). Clinicamente podem ter aspecto homogêneo, apresentando-se como uma lesão branca, uniforme, superfície plana, aparência fina podendo

---

<sup>1</sup> Gomez, R. S. Comunicação Pessoal. Seminário do grupo colaborador da OMS sobre lesões potencialmente malignas da boca. Maio, 2005, Londres.

exibir fendas rasas, ou possuir um padrão não-homogêneo, caracterizado por uma lesão branca ou branca-vermelha, podendo assumir a forma nodular ou verrucosa (AXÉLL *et al.*,1996). As leucoplasias podem ser únicas ou múltiplas na mucosa bucal (VAN DER WALL & AXÉLL, 2002).

Os aspectos histológicos da leucoplasia bucal são caracterizados pela presença de uma espessa camada de queratina na superfície do epitélio (hiperqueratose) e/ou espessamento da camada espinhosa (acantose). Frequentemente células inflamatórias crônicas estão presentes no tecido conjuntivo subjacente. Displasia epitelial pode ser ou não observada. As alterações histopatológicas das células displásicas são caracterizadas por pleomorfismo nuclear e celular, hiperchromatismo nuclear, nucléolos proeminentes e irregulares, alteração na relação núcleo-citoplasma, aumento do número de figuras de mitose, figuras de mitoses atípicas, alteração na polarização da camada basal, queratose intraepitelial, perda de estratificação e projeções epiteliais em forma de gota. A partir da presença dessas alterações morfo-citológicas, do nível de acometimento das camadas epiteliais e da presença ou não de projeções epiteliais em forma de gota, as lesões podem ser graduadas em: hiperqueratose com ou sem displasia epitelial. A intensidade da displasia epitelial pode ser dividida em três tipos, discreta, moderada ou acentuada. As lesões de hiperqueratose não apresentam alterações morfo-citológicas. Nas lesões com displasia epitelial discreta nota-se a presença de uma ou mais alterações morfo-citológicas, mas sem projeções epiteliais em gota. Em lesões com displasia epitelial moderada observa-se a presença de uma ou mais alterações morfo-citológicas acometendo até a metade da espessura do epitélio e notam-se projeções epiteliais em gota. As lesões com displasia epitelial acentuada

possuem uma ou mais alterações morfo-citológicas acometendo mais da metade da espessura do epitélio e projeções epiteliais em gota (PAULA & GOMEZ, 2001).

O maior fator de risco para leucoplasia bucal é o consumo de tabaco em suas várias formas (cigarro, tabaco mascado) e o uso de pasta de betel (JHONSON *et al.*, 1996; NEVILLE & DAY, 2002). Numerosos estudos têm demonstrado uma forte associação entre leucoplasia bucal e o tabaco, confirmada pela relação dose-resposta (GUPTA, 1984; EVSTIFEEVA & ZARIDZE, 1992; LEE *et al.*, 2003). Além disso, a susceptibilidade ao carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço tem sido associada a polimorfismos genéticos em genes que codificam enzimas humanas relacionadas ao metabolismo de substâncias tóxicas e que influenciam na susceptibilidade individual aos efeitos deletérios dos carcinógenos químicos (HAHN *et al.*, 2002).

## **1.2 O METABOLISMO DE SUBSTÂNCIAS CARCINOGENICAS**

O tabaco contém mais de 50 compostos incluindo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), nitrosaminas específicas do tabaco, amins aromáticas e radicais livres que apresentam um importante papel na carcinogênese, sendo os principais responsáveis pela transformação neoplásica do epitélio bucal (SAPP *et al.*, 1997; SCULLY *et al.*, 2000).

O metabolismo de substâncias químicas exógenas é realizado em duas fases, denominadas I e II. A principais reações da fase I são hidrólise, redução e oxidação realizadas pelo complexo enzimático citocromo P450 (CYP450) em que são gerados, frequentemente, compostos tóxicos. Estes produtos podem ser

eliminados diretamente ou sofrer ação das enzimas de fase II. As principais reações de fase II são glicuronidação, sulfatação, metilação e conjugação realizadas pela família das glutathionas S-transferases, gerando compostos hidrossolúveis e facilmente excretados (CONTRAN *et al.*, 1999).

### **1.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS**

Os polimorfismos genéticos são variações na sequência do DNA caracterizados por substituição, deleção ou inserção de nucleotídeos e deleção ou duplicação de genes. Estes polimorfismos ocorrem em uma frequência de pelo menos 1% da população normal. Estas variações podem ou não causar alterações na função do produto protéico (WORMHOUDT *et al.*, 1999; MILLER *et al.*, 2001). A eficácia na eliminação dos carcinógenos do tabaco pode ser influenciada por polimorfismos nas enzimas metabolizadoras dessas substâncias. O grau de expressão e a atividade dessas enzimas podem estar alterados e relacionar-se à susceptibilidade individual a lesões cancerizáveis e ao câncer (NAIR *et al.*, 1999; LAZARUS & PARK, 2000).

#### 1.4 FAMÍLIA DAS GLUTATIONAS-S-TRANSFERASES (GSTs)

As glutionas S-transferases são codificadas por uma superfamília de genes que compreendem cinco grupos enzimáticos -  $\alpha$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ,  $\mu$ ,  $Z$  (LAZARIUS *et al.*, 2000). Os compostos GST-conjugados são geralmente hidrofílicos e atóxicos sendo facilmente excretados (WIENCKE *et al.*, 1990).

O gene *GSTM1*, classe  $\mu$ , responsável pela codificação da enzima *GSTM1* localiza-se no cromossomo 1q13.3. O gene *GSTM1* apresenta um polimorfismo genético caracterizado pela deleção total do gene (genótipo *GSTM1* nulo ou 0/0), sendo que o indivíduo com genótipo nulo não apresenta atividade enzimática (SREELEKHA *et al.*, 2001).

Existe uma variação étnica e geográfica em relação à prevalência do genótipo *GSTM1* nulo. Na população brasileira a frequência da deleção do gene *GSTM1* foi de 40,2% no estudo de AMORIN *et al.* (2000).

A associação entre a deleção do gene *GSTM1* e carcinoma de células escamosas de laringe, orofaringe e boca é controversa. Alguns estudos sugerem que o polimorfismo do gene *GSTM1* está relacionado à maior susceptibilidade a estes carcinomas (SATO *et al.*, 1999; NOMURA *et al.*, 2000; SREELEKHA *et al.*, 2001; DRUMMOND *et al.*, 2004; JHAVAR *et al.* 2004), entretanto outros trabalhos contradizem tal associação (PARK *et al.*, 1997; MATTHIAS *et al.*, 1998; AMADOR *et al.*, 2002). No estudo de Nair *et al.* (1999) uma correlação positiva foi encontrada entre o genótipo *GSTM1* nulo e leucoplasia bucal.

O gene *GSTT1*, classe Theta ou  $\theta$ , se localiza no cromossomo 22q11.2 e é responsável pela codificação da enzima *GSTT1*. O gene *GSTT1* apresenta um polimorfismo genético caracterizado pela deleção total do gene (genótipo *GSTT1*



nulo ou 0/0), sendo que o indivíduo com genótipo nulo não apresenta atividade enzimática (PEMBLE *et al.*, 1994; WEBB *et al.*, 1996; SREELEKHA *et al.*, 2001).

As frequências do genótipo GSTT1 nulo variam de acordo com a etnia e a localização geográfica. Na população brasileira a frequência da deleção do gene *GSTT1* foi de 25,0% no estudo de AMORIN *et al.* (2000).

A associação entre o polimorfismo do gene *GSTT1* e carcinoma de células escamosas de laringe, orofaringe e boca é controversa. Alguns estudos sugerem que a deleção gene *GSTT1* está relacionada à maior susceptibilidade a carcinomas do trato aéreo digestivo superior (TRIZNA *et al.*, 1995; SREELEKHA *et al.*, 2001; AMADOR *et al.*, 2002; JHAVAR *et al.*, 2003; DRUMMOND *et al.*, 2005). Outros trabalhos contradizem tal associação (GRONAU *et al.*, 2003; NAZAR-STEWART *et al.*, 2003). A associação entre o genótipo GSTT1 nulo e o risco de desenvolvimento de leucoplasia bucal em usuários de pasta de betel foi descrito por Nair *et al.* (1999).

Considerando que o tabaco é o principal fator etiológico para o desenvolvimento de câncer de boca e que a leucoplasia é a lesão cancerizável mais prevalente, associado ao fato de que os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* aumentam o risco para o carcinoma de células escamosas de boca, o objetivo desse trabalho foi investigar a associação entre a deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e a leucoplasia bucal em pacientes fumantes em uma população brasileira. A seguir apresentamos os dois artigos enviados para publicação que abordam os objetivos apresentados.

## **2. ARTIGO- *GSTM1* E LEUCOPLASIA BUCAL**

**Title:** GSTM1 polymorphism and oral leukoplakia

**Authors:**

Eliza Carla Barroso Duarte, DDS, Department of Oral Pathology and Surgery, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais.

Marina Sena Lopes da Silva, Undergraduate Student, Department of Oral Pathology and Surgery, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais,

Marcus Vinícius Gomez, PhD, Department of Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais.

Ricardo Santiago Gomez. DDS, PhD, Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais.

Correspondence to:

Prof. Ricardo Santiago Gomez

Departamento de Patologia e Cirurgia

Faculdade de Odontologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antonio Carlos, 6627

Belo Horizonte – MG

Brasil CEP 31270901

e-mail: [rsgomez@ufmg.br](mailto:rsgomez@ufmg.br)

## SUMMARY

We investigated the frequency of the *GSTM1* genotypes in 104 tobacco smoking subjects in a Brazilian population. The *GSTM1* genotypes were studied by PCR-based methods. The frequency of the *GSTM1* null genotype in the group with oral leukoplakia (57.7%) was statistically different from the controls (34.6%) (Odds ratio, O.R.=2.57, 95% C =1.16-5.69,  $P<0.05$ ). The stratification of the samples according to the level of dysplasia showed increased prevalence of *GSTM1* null genotype on lesions with moderate/severe histological dysplasia (68.2%) compared to the control group (31.9%). This difference was statistically significant (O.R.=4.59, 95% CI=1.29-16.33,  $P<0.05$ ). In conclusion, the *GSTM1* null genotype may increase the risk for oral leukoplakia development.

**KEYWORDS:** Oral leukoplakia; *GSTM1*; Polymorphism

## INTRODUCTION

Oral leukoplakia is defined as “a chronic white mucosal patch which cannot be characterized clinically or pathologically as any other disease”.<sup>1-2</sup> The development of oral leukoplakia is strongly associated with exogenous exposure to carcinogens, mainly smoking, chewing tobacco, and betel nut. The use of tobacco is the most important, and has been present in 80% of the cases.<sup>3-4</sup> Oral leukoplakia shows predilection for man (70%), generally up to 40 years old<sup>5</sup> and may occur as a single or multiple lesion.<sup>6</sup> Histologically, the leukoplakia may show mild, moderate or severe dysplasia.<sup>6-7</sup> Although the presence of nodular, verrucous or erythroplastic, or severe dysplasia may relate to increased risk for malignant transformation, these markers are not useful in individual cases. The annual transformation rate of oral leukoplakia seems not to exceed 1%.<sup>8</sup>

Molecular epidemiological studies have now provided evidence that an individual susceptibility to cancer is mediated by genetic and environmental factors.<sup>9</sup> Numerous carcinogenic components present in the tobacco smoking require metabolic activation by phase I enzymes (e.g. cytochrome P450 oxidases like CYP1A1 and CYP2E1) or deactivation by phase II enzymes (e.g. glutathione S-transferase). Glutathione S-transferase (GSTs) are a supergene family coding for five multigene enzyme groups referred to as  $\mu$  or M,  $\theta$  or T,  $\pi$ ,  $\alpha$  and  $\kappa$ , which conjugate glutathione to genotoxic electrophiles such as polycyclic aromatic hydrocarbons, epoxybutanes, ethylene oxide, and halomethanes. GST-conjugated compounds are generally rendered hydrophilic and non-toxic, and are easily excreted.<sup>10-11</sup>

Genetic polymorphisms have been described for enzymes involved in the metabolism of tobacco carcinogens and cancer risk is determined by the degree of

expression and/or activity of enzymes involved in carcinogen activation or deactivation.<sup>11</sup> The *GSTM1* null polymorphism results in a loss of expression, resulting in decreased ability to detoxify GST- $\mu$ -conjugated carcinogens.<sup>12</sup> Considering that tobacco is the main etiological factor in oral cancer and that oral leukoplakia is the most prevalent potentially malignant lesion, together with the fact that *GSTM1* polymorphism increases the risk for oral squamous cell carcinoma<sup>13</sup>, the purpose of this study was to investigate the *GSTM1* null polymorphism and the risk for oral leukoplakia in individuals with tobacco smoking habit in a Brazilian population.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Subjects and sample collection*

Fifty-two smokers patients (mean age = 47,9 years; range 25-87 years) with oral leukoplakia and 52 healthy smokers volunteers (mean age = 48,6 years; range 29-81 years) were included in the study. The criteria for the diagnosis of oral leukoplakia were previously reported.<sup>2</sup> All subjects were selected at the Dental Clinics of the School of Dentistry and were of the same geographical region as well as socio-economic status. The sex and age of both groups were matched. All subjects had smoked at least 10 cigarettes/day over a 20 years period. There were 31 males (59,6%) and 21 (40,4%) females in the patient's group. Ethnicity was not established as the hazards of judging Brazilians by color, race and geographical origin.<sup>14</sup> The lesions located at the floor of the mouth, tongue and soft palate were grouped together as high risk site group, while all the oral sites were included in the group of low risk site. The grade of epithelial dysplasia was established as described elsewhere.<sup>15</sup> The histopathological features of epithelial dysplasia considered were loss of polarity of the basal cells, presence of more

than one layer of cells having a basaloid appearance, increased nuclear-cytoplasmic ratio, drop-shaped rete process, irregular epithelial stratification, increased number of mitotic figures, presence of mitotic figures in the superficial half of the epithelium, cellular pleomorphism, nuclear hyperchromatism, enlarged nucleoli, reduction of cellular cohesion, and dyskeratosis.<sup>6</sup> Local ethical committee approved the study protocol, and informed consent was obtained from all patients.

Oral swabs were taken from each subject. The procedure was performed on the contra-lateral intact mucosa of the patients with oral leukoplakia. The swabs from the control subjects were collected from their labial mucosa. The swabs were performed with sterile plastic tips and placed immediately in Eppendorf microtubes contain 500  $\mu$ L of Krebs buffer (NaCl 20%, KCl 2%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2%,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ). The pellet obtained after 10 min of centrifugation at 17,900 x g was stored at  $-20^\circ\text{C}$  until processing. The DNA extraction was carried out as described by Boom et al.<sup>16</sup>

#### *Polymerase chain reaction*

The GSTM1 genotypes were studied by polymerase chain reaction (PCR) as previously described.<sup>17</sup> The amplification was performed in a final volume of 25  $\mu$ L containing 5  $\mu$ L of genomic DNA, 0,75 mM  $\text{MgCl}_2$ , 40 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH=8,4) 0,1 % Triton X-100, 11,4  $\mu$ L  $\text{H}_2\text{O}$ , 2,5  $\mu$ L dNTPs and 2,5 U Taq DNA polymerase. Samples were subjected to 5 min at  $94^\circ$ , followed by 35 cycles of amplification at  $95^\circ$  for 30 s,  $64^\circ$  for 1 min and  $72^\circ$  for 1 min. The run was terminated by a 7 min elongation step at  $72^\circ$ . A negative control reaction without DNA and samples with known GSTM1 genotype were always used. The reaction produced a 220bp product. Amplification of the  $\beta$ -globin gene was used as an internal control. All samples were amplified using a DNA thermal cycler

(PTC – Programmable Thermal Controller). The product was analyzed in a 6.5% polyacrylamide gel electrophoresis followed by silver stain.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed by Chi-square and Fisher's tests; and significance was set at p-value of  $< 0.05$ .

### **RESULTS**

The frequencies of the *GSTM1* genotypes between cases and controls are show in Table 1. Individuals homozygous for the wild type *GSTM1* (+/+) and heterozygous (+/0) were grouped together. The frequency of the *GSTM1* null genotype in the group with oral leukoplakia (57.7%) was statistically different from the controls (34.6%) (Odds ratio, O.R.=2.57, 95% C =1.16-5.69,  $P < 0.05$ ). When the groups were stratified according to the gender and site of occurrence, no statistical difference was observed. However, the stratification of the samples according to the level of dysplasia showed increased prevalence of *GSTM1* null genotype on lesions with moderate/severe histological dysplasia (68.2%) compared to the control group (31.9%). This difference was statistically significant (O.R.=4.59, 95% CI=1.29-16.33,  $P < 0.05$ ).



## DISCUSSION

Epidemiological studies have demonstrated a significant influence of tobacco and alcohol consumption on the risk for oral cancer. Oral leukoplakia is the most common potentially malignant lesion of the oral mucosa. Although tobacco use is related to oral leukoplakia, alcohol consumption has not a significant association with it.<sup>18</sup> Since exposure to chemical carcinogens acts as an important mechanism of oral cancer development, the investigation of genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and cancer susceptibility is of significant interest.

GSTM enzymes may offer protection against DNA damage induced by free radicals and metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons.<sup>19</sup> The lack of the GSTM1 activity is a result of a homozygous deletion (null genotype) of the *GSTM1* gene. The null genotype results in a loss of expression, resulting in decreased ability to detoxify GST- $\mu$ -conjugated carcinogens.<sup>11</sup> The GSTM1 null genotypes (0/0) polymorphism has been linked to increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma development.<sup>13, 17, 20, 21</sup> In addition, this polymorphism seems to be a risk factor for developing multiple primary neoplasms in the upper aero-digestive tract.<sup>22</sup> In the present study, a positive association between the GSTM1 null genotype and oral leukoplakia in Brazilian subjects was observed. This polymorphism was also demonstrated to be a risk factor for developing oral leukoplakia in ethnic Indian betel quid/tobacco chewers.<sup>23</sup>

In our study, the frequencies of female or male patients in the case group who were null for the GSTM1 genotype was not statistically different from the female or male control group, respectively. No statistical difference was also observed when the samples were stratified by the location of the lesion. These results may be due to the low number of subjects after segregation. The presence of the GSTM null genotype

increased the risk factor to lesions showing histological moderate/severe dysplasia. We may speculate that the lack of *GSTM1* activity would make the oral tissues more susceptible to the action of tobacco carcinogens and to the development of a high grade level of dysplasia. Longitudinal studies evaluating the impact of this polymorphism on malignant transformation of oral leukoplakia would be of interest and could be an interesting tool for targeting patients with oral leukoplakia at particular risk for future cancerous lesion.

In conclusion, the present study shows a positive association between the presence of *GSTM1* null genotype and the development of oral leukoplakia. Indeed, this association varies in accordance to the histological grade of dysplasia.

#### **ACKNOWLEDGEMENT**

This study was supported in part by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Programa de Excelência (PRONEX) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq), Brazil. Dr. R.S. Gomez and Dr. M.V. Gomez are research fellows of CNPq.

## REFERENCES

1. Kramer IRH, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH, WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46:518-39.
2. Axéll T, Pindborg JJ, Smith CJ, Waal vander I, an International Collaborative Group on Oral White Lesions. Oral white lesions with special reference to precancerous and tabacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21,1994. *J Oral Pathol Med* 1996; 25:25-49.
3. Johnson NW; Warnakulasuriya S.; Tavassoli, M. Hereditary and enviromental risk factors; clinical and laboratory risk matters for head and neck, especially oral, cancer and precancer. *Eur J Cancer* 1996; 5(1):5-17.
4. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; 52(4):195-215.
5. Mehta FS; Gupta PC.; Pindborg JJ. Chewing and smoking habits in relation to precancerous and oral cancer. *Clin Oncol* 1981; 99:35-9.
6. van der Waal I; Axéll T. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. *Oral Oncol* 2002; 38:521-6.
7. Karabulut A, ReibelJ, Therkildsen MH, Praetorius f, Nielsen HW, Dabelsteen E. Observer variability in the histologyc assessment of oral premalignant lesions. *J Oral Pathol Med* 1995; 24:198-200.
8. Scheifele C, Reichart PA. Is there a natural limit of the transformation rate of oral leukoplakia? *Oral Oncol* 2003; 39(5):470-5.

9. Sikdar N, Mahmud A, Paul RR, Roy B. Polymorphism in *CYP1A1* and *CYP2E1* genes and susceptibility to leukoplakia in Indian tobacco users. *Cancer Letters* 2003;195:33-42.
10. Perera FP, Weinstein IB. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 2000; 21:517-24.
11. Lazarus P.; Park JY. Metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 2000; 36:421-31.
12. Wiencke JK, Kelsey KT, Lamela RA, Toscano Jr WA. Human glutathione S-transferase deficiency as a marker of susceptibility to epoxide-induced cytogenetic damage. *Cancer Res* 1990; 50:1585- 90.
13. Drummond SN, Noronha JCM, De Marco L, Gomez RS. GSTM-1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004; 40:52-5.
14. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:177-82.
15. Paula AMB, Gomez RS. Immunolocalization of p53, Glutathione S transferase  $\pi$  and CD57 Antigens in Oral Leukoplakia. *Antic Res* 2001; 21:379-86.
16. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jausen CK, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28:495-503.
17. Sreelekha TT, Ramadas K, Pandey M, Thomas G, Nalinakumari KR, Pillai MR. Genetic polymorphism of *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol* 2001; 37:593-8.
18. Harris CK, Warnakulasuriya KAAS. Cooper DJ, Petrs TJ, Gelbier S. Prevalence of oral mucosal lesions in a alcohol misures in south London. *J Oral Pathol* 2004; 33:253-9.

19. Schneider J, Bernges U, Philipp M, Weitowitz HJ. *GSTM1, GSTT1, and GSTP1* polymorphism and lung cancer risk in relation to tobacco smoking. *Cancer Letters* 2004;208:65-74.
20. Sato M, Sato T, Izumo T, Amagasa T. Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. *Carcinogenesis* 1999; 20:1927-31.
21. Nomura T, Noma H, Shibahara T, Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T. Aldehyde dehydrogenase 2 and glutathione S-transferase M1 polymorphism in relation to the risk for oral cancer in Japanese drinkers. *Oral Oncol* 2000; 36:42-6.
22. Jhavar S, Sarin R, Mulherkar R, Benner A, Agarwal JP, Dinshaw. Glutathione S-transferase M1 or T1 null genotype as a risk factor for developing multiple primary neoplasms in the upper aero-digestive tract, in Indian males using tobacco. *Oral Oncol* 2004; 40:84-91.
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 Indian betel quid/tobacco chewers. *Carcinogenesis* 1999; 20:742-8.

**Table 1** Glutathione S-transferase (*GSTM1*) genotypes in oral leukoplakia patients and controls

	n	GSTM1 genotype		X <sup>2</sup>	p <sup>a</sup>	Odds ratio (95% confidence interval)
		0/0(%)	+/0 or +/+ (%)			
Control	52	18 (34,6)	34 (65,4)			
Oral leukoplakia	52	30 (57,7)	22 (42,3)	5,57	<0,05	2,57(1,16-5,69)
Grade of Displasia						
Absent/Mild	30	15 (50,0)	15 (50,0)	-	n.s.	-
Moderate/Severe	22	15 (68,2)	7 (31,8)	5,81	<0,05	4,59 (1,29-16,33)
Location						
High Risk	9	5 (55,6)	4 (44,4)	-	n.s.	-
Low Risk	43	25 (58,1)	18 (41,9)	-	n.s.	-

<sup>a</sup>Versus control. n.s., Not significant. 0/0 GSTM1 null; +/0 GSTM1 heterozigous; +/+ GSTM1 wild type homozygous.

### **3. ARTIGO- *GSTT1* E LEUCOPLASIA BUCAL**

**Title:** GSTT1 polymorphism and oral leukoplakia

**Authors:**

Eliza Carla Barroso Duarte, DDS, Department of Oral Pathology and Surgery, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais.

Marina Sena Lopes da Silva, Undergraduate Student, Department of Oral Pathology and Surgery, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais,

Marcus Vinícius Gomez, PhD, Department of Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais.

Ricardo Santiago Gomez. DDS, PhD, Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais.

Correspondence to:

Prof. Ricardo Santiago Gomez

Departamento de Patologia e Cirurgia

Faculdade de Odontologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antonio Carlos, 6627

Belo Horizonte – MG

Brasil CEP 31270901

e-mail: [rsgomez@ufmg.br](mailto:rsgomez@ufmg.br)



**Title:** GSTT1 polymorphism and oral leukoplakia

## **SUMMARY**

**Objective.** The objective of this study was to investigate the GSTT1 null polymorphism and the risk for oral leukoplakia in individuals with tobacco smoking habit in a Brazilian population.

**Study design.** The *GSTT1* genotypes of 104 tobacco smoking patients were studied by PCR-based methods.

**Results.** The frequency of the *GSTT1* null genotype in the group with oral leukoplakia (48.0%) was statistically different from the controls (27.0%) (Odds ratio, O.R.=2.51, 95% C =1.10-5.70,  $P < 0.05$ ). No statistical difference was observed after stratification according to gender, site of occurrence, and level of dysplasia.

**Conclusion.** The *GSTT1* null genotype may increase the risk for oral leukoplakia development.

## INTRODUCTION

Oral leukoplakia is the most common potentially malignant disease of the oral mucosa and is defined as “a predominantly white lesion of the oral mucosa that cannot be characterized as any other definable lesion”.<sup>1-2</sup> The major risk factors of oral leukoplakia are smoking, chewing tobacco, and betel nut.<sup>3-4</sup> Numerous studies have reported a strong association of oral leukoplakia with tobacco use and cigarette smoking, and that this association is underlined by dose-response relationship.<sup>5,6,7</sup> Clinically, oral leukoplakia may occur as a single or multiple lesion, homogeneous or non-homogeneous.<sup>8</sup> Histologically, the leukoplakia may show mild, moderate or severe dysplasia.<sup>8,9</sup> The annual transformation rate of oral leukoplakia seems not to exceed 1%.<sup>10</sup> Several factors are important indicators of malignant potential, such localization, clinical appearance, and severe dysplasia.

Extensive epidemiological studies have established that a combination of genetic and environmental factors is responsible to an individual susceptibility to cancer.<sup>11</sup> Most carcinogens require metabolic activation and detoxification by phase I enzymes (e.g. cytochrome P450 oxidases like CYP1A1 and CYP2E1) or by phase II enzymes (e.g. glutathione S-transferase), respectively. Glutathione S-transferases (GSTs) are a family of isoenzymes that increase the water solubility of xenobiotics, hence allowing their excretion.<sup>12</sup> Several members of GST family have been found to be polymorphic in human populations.<sup>13</sup> GSTT1 null polymorphism is characterized by complete deletion of the gene and consequent absence of the enzyme.<sup>14</sup> Considering that tobacco is the main etiological factor in oral cancer and that oral leukoplakia is the most prevalent potentially malignant lesion, together with the fact that GSTT1 polymorphism increases

the risk for oral squamous cell carcinoma,<sup>15</sup> the purpose of this study was to investigate the GSTT1 null polymorphism and the risk for oral leukoplakia in individuals with tobacco smoking habit in a Brazilian population.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Human subjects*

The study included 52 smokers patients (mean age = 47.9 years; range 25-87 years) with oral leukoplakia and 52 age and sex matched control subjects (mean age = 48.6 years; range 29-81 years). The criteria for the diagnosis of oral leukoplakia were previously reported.<sup>2</sup> All subjects were selected at the Dental Clinics of the School of Dentistry and were of the same geographical region as well as socio-economic status. All subjects in both groups had smoked at least 10 cigarettes/day over a 20 years period. There were 31 males (59.6%) and 21 (40.4%) females in the patient's group. Ethnicity was not established as the hazards of judging Brazilians by color, race and geographical origin.<sup>16</sup> The lesions located at the floor of the mouth, tongue and soft palate were grouped together as high risk site group, while all the oral sites were included in the group of low risk site. The grade of epithelial dysplasia was established as described elsewhere.<sup>17</sup> The histopathological features of epithelial dysplasia considered were loss of polarity of the basal cells, presence of more than one layer of cells having a basaloid appearance, increased nuclear-cytoplasmic ratio, drop-shaped rete process, irregular epithelial stratification, increased number of mitotic figures, presence of mitotic figures in the superficial half of the epithelium, cellular pleomorphism, nuclear hyperchromatism, enlarged nucleoli, reduction of cellular cohesion, and dyskeratosis.<sup>8</sup> All the participants signed an informed consent term and the study was approved by the local Ethics Committee.

Oral swabs were collected from the oral mucosa using sterile plastic tips and samples were stored in Eppendorf microtubes containing 500  $\mu$ L of Krebs buffer (NaCl 20%, KCl 2%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2%,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ). The pellet obtained after 10 min of centrifugation at 17,900 x  $g$  was stored at  $-20^\circ\text{C}$  until processing.

#### *DNA isolation*

The DNA extraction was carried out as described by Boom et al <sup>18</sup>. The *GSTT1* genotypes were studied by polymerase chain reaction (PCR) as previously described. <sup>19</sup> Briefly, reactions were done in a final volume of 25  $\mu$ L containing 25 ng of genomic DNA, 0,2 mM dNTPs, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 120 ng of each primer and 1,25U Taq DNA polymerase. Samples were subjected to 5 min at  $94^\circ$ , followed by 35 cycles of amplification at  $95^\circ$  for 30 s,  $64^\circ$  for 1 min and  $72^\circ$  for 1 min. The run was terminated by a 7 min elongation step at  $72^\circ$ . A negative control reaction without DNA and samples with known *GSTT1* genotype were always used. The reaction produced a 450bp product. Amplification of the  $\beta$ -globin gene was used as an internal control. All samples were amplified using a DNA thermal cycler (PTC – Programmable Thermal Controller). The product was analyzed in a 6.5% polyacrylamide gel electrophoresis followed by silver stain.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed by Chi-square and Fisher's tests; and significance was set at p-value of  $< 0.05$ .

## RESULTS

The frequencies of the *GSTT1* genotypes between cases and controls are shown in Table 1. Individuals homozygous for the wild type *GSTT1* (+/+) and heterozygous (+/0) were grouped together. The frequency of the *GSTT1* null genotype in the group with oral leukoplakia (48.0%) was statistically different from the controls (27.0%) (Odds ratio, O.R.=2.51, 95% C =1.10-5.70, P< 0.05). No statistical difference was observed after stratification according to gender, site of occurrence, and level of dysplasia.

## DISCUSSION

Oral cancer is based mainly on three factors: life-style, environmental factors, and host susceptibility. Oral leukoplakia is the most important potentially malignant lesion of the oral mucosa and is strongly associated with tobacco use. Since exposure to chemical carcinogens acts as an important mechanism of oral cancer development, the investigation of genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and cancer susceptibility is of significant interest.

Genetic polymorphisms have been identified in *GSTM1*, *GSTM3*, *GSTT1* and *GSTP1* genes possessing polymorphic alleles that have been associated with altered levels of GST protein expression.<sup>11</sup> The *GSTT1* enzyme conjugate glutathione to various potentially carcinogenic compounds, which facilitates their elimination from the body.<sup>20, 21</sup> *GSTT* enzymes may offer protection against DNA damage induced by free radicals and metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons.<sup>22</sup> The *GSTT1* null genotypes (0/0) polymorphism has been linked to increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma.<sup>15,19,23,24</sup> In the present study, a positive association between the *GSTT1* null genotype and oral leukoplakia in Brazilian subjects was observed. This

polymorphism was also demonstrated to be a risk factor for developing oral leukoplakia in ethnic Indian betel quid/tobacco chewers.<sup>25</sup> Therefore, smokers' individuals with *GSTT1* null genotype are more prone to oral leukoplakia development than smokers without this polymorphism. The impact of this genotype on malignant transformation of the disease is an interesting subject of investigation on further studies. No statistical difference was observed when the samples were stratified by gender, location of the lesion, and histological grade of dysplasia. These results may be due to the low number of subjects after segregation.

In conclusion, the present study shows a positive association between the lack of *GSTT1* enzyme activity and the development of oral leukoplakia.

#### **ACKNOWLEDGEMENT**

This study was supported in part by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Programa de Excelência (PRONEX) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq), Brazil. Dr. R.S. Gomez and Dr. M.V. Gomez are research fellows of CNPq.

## REFERENCES

- 1 Kramer IRH, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH, WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46:518-39.
- 2 Axéll T, Pindborg JJ, Smith CJ, Waal vander I, an International Collaborative Group on Oral White Lesions. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21,1994. *J Oral Pathol Med* 1996; 25:25-49.
- 3 Johnson NW; Warnakulasuriya S.; Tavassoli, M. Hereditary and environmental risk factors; clinical and laboratory risk matters for head and neck, especially oral, cancer and precancer. *Eur J Cancer* 1996; 5(1):5-17.
- 4 Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; 52(4):195-215.
- 5 Gupta PC. A study of dose-response relationship between tobacco habits and oral leukoplakia. *Br J Cancer* 1984, 50(4):527-31.
- 6 Evstifeeva TV, Zaride DG. Nass use, cigarette smoking, alcohol consumption and risk of oral and esophageal precancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992; 28B(1):29-35.
- 7 Lee CH, Ko YC, Huang HL, et al. The precancer risk of betel quid chewing, tobacco use and alcohol consumption in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis in southern Taiwan. *Br J Cancer* 2003; 88(3):366-72.
- 8 Van der Waal I; Axéll T. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. *Oral Oncol* 2002; 38:521-6.

- 9 Karabulut A, Reibel J, Therkildsen MH, Praetorius F, Nielsen HW, Dabelsteen E. Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. *J Oral Pathol Med* 1995; 24:198-200.
- 10 Scheifele C, Reichart PA. Is there a natural limit of the transformation rate of oral leukoplakia? *Oral Oncol* 2003; 39(5):470-5.
- 11 Lazarus P.; Park JY. Metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 2000; 36:421-31.
- 12 Board P, Coggan M, Johnston P, Ross V, Suzuki T, Webb G. Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. *Pharmac Ther* 1990; 48:357-69.
- 13 Wormhoudt LW, Commandeur, JN, Vermeulen NP. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochromeP450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Critic Rev Toxicol* 1999; 29:59-124.
- 14 Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, et al. Human glutathione-S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of genetic polymorphism. *Biochem* 1994; 300(Pt1):271-6.
- 15 Drummond SN, Gomez RS, Noronha JCM, Pordeus IA, Barbosa AA, De Marco L. Association between GSTT-1 gene deletion and the susceptibility to oral squamous cell carcinoma in cigarette-smoking subjects. *Oral Oncol* 2005; 41:515-9.
- 16 Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:177-82.
- 17 Paula AMB, Gomez RS. Immunolocalization of p53, Glutathione S tranferase  $\pi$  and CD57 Antigens in Oral Leukoplakia. *Antic Res* 2001; 21:379-86.



- 18 Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jausen CK, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28:495-503.
- 19 Sreelekha TT, Ramadas K, Pandey M, Thomas G, Nalinakumari KR, Pillai MR. Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol* 2001; 37:593-8.
- 20 Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases structure and catalytic activity. *Biochem* 1988; 23:283-337.
- 21 Smith CA, Smith G, Wolf CR. Genetic polymorphisms in xenobiotic metabolism. *Eur J Cancer* 1994; 30A(13):1921-35.
- 22 Schneider J, Bernges U, Philipp M, Weitowitz HJ. *GSTM1, GSTT1, and GSTP1* polymorphism and lung cancer risk in relation to tobacco smoking. *Cancer Letters* 2004;208:65-74.
- 23 Trizna Z, Clayman GL, Spitz MR, Briggs KL, Goepfert H. Glutathione S-transferase genotypes as risk factors for head and neck cancer. *Am J Surg* 1995; 170:499-501.
- 24 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 Endodont* 2002; 93(4):440-5.
- 25 Nair UJ, Nair J, Mathew B, Bartsch H. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for oral leukoplakia in ethnic Indian betel quid/tobacco chewers. *Carcinogenesis* 1999; 20:742-8.

**Table 1** Glutathione S-transferase (*GSTT1*) genotypes in oral leukoplakia patients and controls

	<i>GSTT1</i> genotype		X <sup>2</sup>	p <sup>a</sup>	Odds ratio (95% confidence interval)	
	n	0/0(%)				+/0 or +/+ (%)
Control	52	14 (27.0)	38 (73.0)			
Oral leukoplakia	52	25 (48.0)	27 (52.0)	4.96	<0.05	2.51(1.10-5.70)
Grade of Dysplasia						
Absent/Mild	30	16 (53.3)	14 (46.7)	-	n.s.	-
Moderate/Severe	22	9 (41.0)	13 (59.0)	-	n.s.	-
Location						
High Risk	9	5 (55.6)	4 (44.4)	-	n.s.	-
Low Risk	43	20 (46.5)	23 (53.5)	-	n.s.	-

<sup>a</sup>Versus control. n.s.: not significant. 0/0: *GSTT1* null; +/0: *GSTT1* heterozygous; +/+ *GSTT1*: wild type homozygous.

## **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma significativa influência do tabaco e do consumo de álcool no desenvolvimento do câncer de boca. A leucoplasia é a lesão cancerizável mais comum da mucosa bucal. O uso do tabaco é relacionado ao desenvolvimento dessa lesão, mas o consumo de álcool não tem sido associado com a sua etiologia (HARRIS & WARNAKULASURIYA, 2004).

As substâncias químicas do tabaco mais importantes na carcinogênese são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), as aminas aromáticas, as nitrosaminas específicas do tabaco e os radicais livres. A metabolização destas substâncias químicas é realizada em duas etapas denominadas fase I e fase II. A fase I, cujas principais reações são hidrólise, redução e oxidação, são realizadas principalmente pelo grupo enzimático citocromo P-450, produzindo substâncias reativas e tóxicas. Os metabólitos tóxicos da fase I se ligam a macromoléculas como DNA, RNA e proteínas formando complexos (“adducts”) causando instabilidade genética, mutação e iniciação do processo de carcinogênese química. Além disso, ocorre a produção de radicais livres pelas enzimas de fase I gerando estresse oxidativo e contribuindo para o processo carcinogênico (KRIEK *et al.*, 1998; CONTRAN *et al.*, 1999; HASLER *et al.*, 1999). Esses produtos reativos provenientes da fase I podem ser diretamente excretados ou sofrerem ação das enzimas da fase II. Os principais componentes enzimáticos responsáveis pela fase II do metabolismo pertencem à família das glutatona S-transferases. Após sofrer reações de glicuronidação, sulfatação, metilação ou conjugação os xenobióticos são inativados e tornam-se hidrossolúveis sendo facilmente excretados (KRIEK *et al.*, 1998; BARTSCH *et al.*, 2000).

Como a exposição a substâncias carcinogênicas químicas é um importante mecanismo para o desenvolvimento do câncer de boca, a investigação de polimorfismos em enzimas relacionadas ao metabolismo de carcinógenos é muito importante. Estes polimorfismos, caracterizados pela deleção homozigótica dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, são responsáveis pela perda da função dessas enzimas podendo tornar a mucosa bucal mais susceptível a ação das substâncias carcinogênicas do tabaco e possivelmente influenciando na susceptibilidade individual a lesões cancerizáveis e ao câncer (NAIR *et al.*, 1999; GARTE *et al.* 2001).

Neste trabalho investigamos a associação entre os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e a leucoplasia bucal através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Alguns cuidados em relação a essa técnica foram tomados, uma vez que a contaminação contribui para resultados falso-positivos (CLEWLEY, 1995; WATSON *et al.*, 1997). Em todas as reações foram utilizados controles negativos. Para o gene *GSTM1* os indivíduos homozigotos para a presença do gene (+/+) e os indivíduos heterozigotos (+/0), considerados do mesmo grupo, apresentaram uma banda no gel de poliacrilamida a 6,5% de 220pb (ANEXO A). Em relação ao gene *GSTT1* a banda foi de 450pb (ANEXO B).

A associação entre o polimorfismo do gene *GSTM1* e o carcinoma de células escamosas de boca é controversa. Alguns estudos concordam com essa afirmativa (SATO *et al.*, 1999; NOMURA *et al.*, 2000; SREELEKHA *et al.*, 2001; DRUMMOND *et al.*, 2004; JHAVAR *et al.* 2004). No entanto, em outros estudos tal hipótese não foi confirmada (PARK *et al.*, 1997; MATTHIAS *et al.*, 1998; AMADOR *et al.*, 2002). Neste estudo, pacientes fumantes com deleção do gene *GSTM1* apresentaram maior susceptibilidade a leucoplasia bucal. Esta associação também foi

sugerida por NAIR *et al.*(1999) em indivíduos com leucoplasia bucal usuários de pasta de betel em uma população Indiana.

Em nosso estudo, após estratificamos as lesões de acordo com o grau de displasia epitelial, observamos associação positiva entre o genótipo *GSTM1* nulo e as lesões que apresentavam graduação histológica moderada/severa. Nós podemos especular que a perda da atividade da enzima *GSTM1* pode tornar os tecidos mais susceptíveis a ação de substâncias carcinogênicas químicas do tabaco levando ao desenvolvimento de lesões com graus de displasia mais acentuados. Quando estratificamos os grupos por sexo e localização da lesão (áreas de alto e baixo risco), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados podem ter sido devido ao pequeno número de indivíduos após segregação.

Os resultados obtidos em relação ao polimorfismo do gene *GSTT1* mostraram que indivíduos fumantes *GSTT1* nulos apresentaram maior susceptibilidade ao desenvolvimento da leucoplasia bucal. Associação semelhante foi sugerida por Nair *et al.* (1999) em pacientes indianos usuários de pasta de betel. Os resultados dos estudos que relacionam a deleção do gene *GSTT1* e o carcinoma de células escamosas de boca são conflitantes. A associação positiva foi confirmada por alguns autores (TRIZNA *et al.*, 1995; SREELEKHA *et al.*, 2001; AMADOR *et al.*, 2002; DRUMMOND *et al.* 2005). Em outros estudos, esta hipótese é contestada (OUDE-OPHUIS *et al.*, 1998; GRONAU *et al.*, 2003b).

Neste estudo, após a segregação do grupo caso em relação ao sexo, localização da lesão (áreas de alto e baixo risco) e graduação histológica (displasia ausente/discreta e moderada/severa) não foram notadas diferenças estatisticamente significativas entre o polimorfismo do gene *GSTT1* e a leucoplasia bucal. Estes

achados podem estar relacionados ao pequeno número de indivíduos após a estratificação.

Estudos longitudinais que avalie o impacto dos polimorfismos das enzimas de fase II do metabolismo na transformação maligna da leucoplasia bucal são muito importantes e podem ser instrumentos interessantes para identificar pacientes com risco para o desenvolvimento de futuros carcinomas.

## **5. CONCLUSÕES**



## 5. CONCLUSÕES

Através deste estudo podemos concluir:

- Existe associação entre a deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e a presença de leucoplasia bucal em pacientes fumantes.
- A deleção do gene *GSTM1* é um importante fator de risco para o desenvolvimento da leucoplasia bucal com graduação histológica moderada/severa em pacientes fumantes.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMADOR, A. G. *et al.* Polymorphism of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma. *Oral and Maxillofacial Pathology*, v. 93, p. 440-445, 2002.
2. AMORIN, L. M. F. *et al.* CYP 1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer Lett.*, v. 181, p. 179-186, 2002.
3. AXÉLL, T., *et al.* An International Collaborative Group on Oral White Lesions. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21, 1994. *J Oral Pathol Med*; v. 25, p. 25-49, 1996.
4. BARTSCH, H. *et al.* Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent*, v. 9, p. 3-28, 2000.
5. CLEWLEY, J. P. The polymerase chain reaction (PCR) for human viral diagnosis. *Boca Raton: CRC Press*, 1995. 224p.
6. CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Pathologic bases of disease. 6 ed. Philadelphia: Saunders, 1999. 1425 p.
7. DRUMMOND, S. N. *et al.* GSTM-1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*; v. 40, p. 52-55, 2004.
8. DRUMMOND, S. N. *et al.* Association between GSTT-1 gene deletion and the susceptibility to oral squamous cell carcinoma in cigarette-smoking subjects. *Oral Oncol*; v. 41, p. 515-519, 2005.

9. EVSTIFEEVA, T. V., ZARIDE, D. G. Nass use, cigarette smoking, alcohol consumption and risk of oral and esophageal precancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, v. 28B, n. 1, p. 29-35, 1992.
10. GARTE, S *et al.* Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent*, v.10, p.1239-1248, 2001.
11. GOMEZ, R. S. Comunicação Pessoal. Seminário do grupo colaborador da OMS sobre lesões potencialmente malignas da boca. Londres, Maio, 2005.
12. GRONAU, S.; KOENIG-GREGER, D.; RIECHELMANN, H. Gene polymorphism in detoxification enzymes as susceptibility factor for head and neck cancer? *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, v. 128, p. 674-680, 2003b.
13. GUPTA, P. C. A study of dose-response relationship between tobacco habits and oral leukoplakia. *Br J Cancer*, v. 50, n. 4, p. 527-531, 1984.
14. HANH, M. *et al.* Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity cancer. *Oral Oncology*, v. 38, p. 486-490, 2002.
15. HARRIS, C. K. *et al.* Prevalence of oral mucosal lesions in alcohol misusers in south London. *J Oral Pathol*; v. 33, p. 253-259, 2004.
16. HASLER, J. A. *et al.* Human cytochromes P450. *Molec Aspects Med*, v. 20, p. 1-137, 1999.
17. JHAVAR, S. *et al.* Glutathione S-transferase M1 or T1 null genotype as a risk factor for developing multiple primary neoplasms in the upper aero-digestive tract, in Indian males using tobacco. *Oral Oncol*; v. 40, p. 84-91, 2004.
18. JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, S.; Tavassoli, M. Hereditary and environmental risk factors; clinical and laboratory risk matters for head and neck, especially oral, cancer and precancer. *Eur J Cancer*, v. 5, n. 1, p. 5-17, 1996.

19. KRAMER, I. R. H. *et al.* Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*; v. 46, p. 518-539, 1978.
20. KRIEK, E. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk. *Mut Res.*, v. 400, p. 215-231, 1998.
21. LAZARUS, P.; PARK J. Y. Metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol*; v. 36, p. 421-431, 2000.
22. LEE, C. H.; KO, Y. C., HUANG, H. L., *et al.* The precancer risk of betel quid chewing, tobacco use and alcohol consumption in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis in southern Taiwan. *Br J Cancer*; v. 88, n. 3, p. 366-372, 2003.
23. MATTHIAS, C. *et al.* Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP 1A1, CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers. *Pharmacogenetics*, v. 8, p. 91-100, 1998.
24. MEHTA, F. S.; GUPTA, P. C.; PINDBORG, J. J. Chewing and smoking habits in relation to precancerous and oral cancer. *Clin Oncol*; v. 99, p. 35-39, 1981.
25. MILLER, M. C. *et al.* Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters*, v.120, p. 269-280, 2001.
26. NAIR, U. J. *et al.* Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for oral leukoplakia in ethnic Indian betel quid/tobacco chewers. *Carcinogenesis*; v. 20, p. 742-748, 1999.
27. NAZAR-STEWARD *et al.* A population-based study of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 genotypes and risk for lung cancer. *Lung Cancer*, v. 40, p. 247-258, 2003.

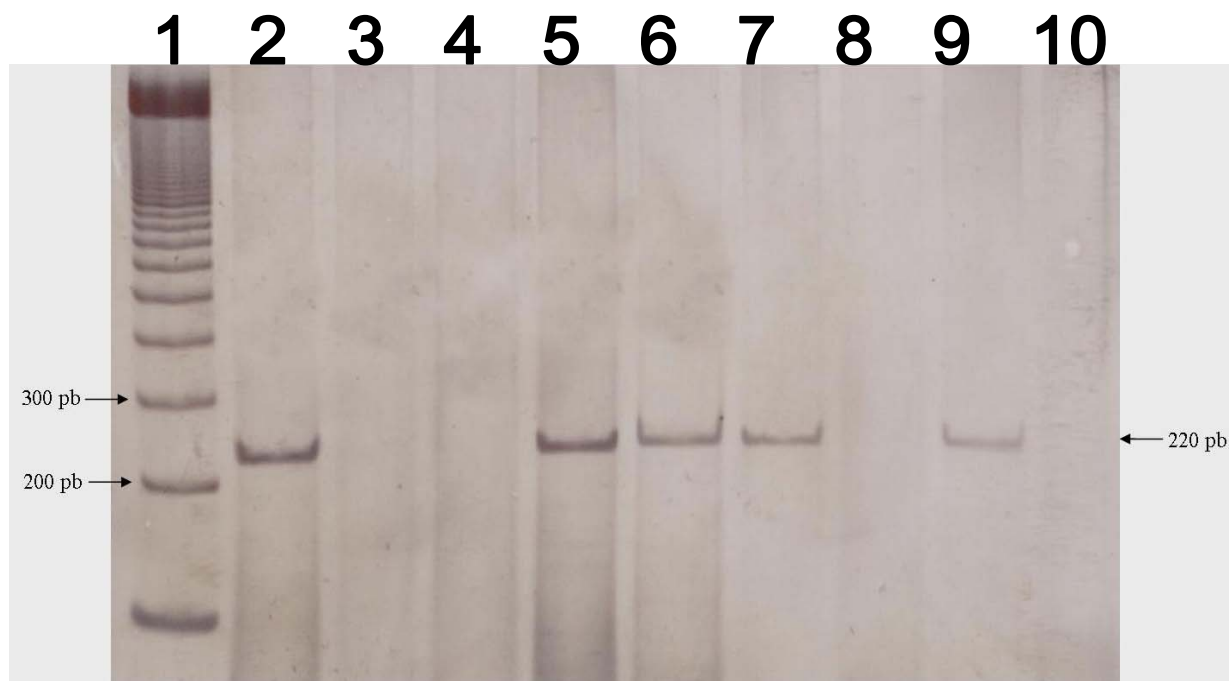
28. NEVILLE, B. W.; DAY, T. A.. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*; v. 52, n. 4, p. 195-215, 2002.
29. NOMURA, T. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 2 and glutathione S-transferase M1 polymorphism in relation to the risk for oral cancer in Japanese drinkers. *Oral Oncol*; v. 36, p. 42-46, 2000.
30. OUDE-OPHIUS, M. B. *et al.* Glutathione S-transferase M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphism in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. *Cancer*, v. 82, p. 936-943, 1998.
31. PARK, J. Y. *et al.* CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarks Prev*, v. 6, p. 791-797, 1997.
32. PAULA, A. M. B. , GOMEZ, R. S. Immunolocalization of p53, Glutathione S transferase  $\pi$  and CD57 Antigens in Oral Leukoplakia. *Antic Res*; v. 21, p. 379-386, 2001.
33. PEMBLE, S. *et al.* Human glutathione-S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of genetic polymorphism. *Biochem*; v. 300, n. Pt1, p. 271-276, 1994.
34. SAPP, J. P.; EVERSOLE, L. R.; WYSOCKI, G. P. *Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology*. 1. ed. St. Louis: Mosby, 1997. 433p.
35. SATO, M. *et al.* Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. *Carcinogenesis*; v. 20, p. 1927-1931, 1999.
36. SCHEIFELE, C., REICHART, P. A. Is there a natural limit of the transformation rate of oral leukoplakia? *Oral Oncol*; v. 39, n. 5, p. 470-5, 2003.
37. SCULLY, C.; FIELD, J. K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncology*, v. 36, p. 256-263, 2000.

38. SREELEKHA, T. T. *et al.* Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol*; v. 37, p. 593-598, 2001.
39. TRIZNA, Z. *et al.* Glutathione S-transferase genotypes as risk factors for head and neck cancer. *Am J Surg*; v. 170, p. 499-501, 1995.
40. VAN DER WAAL, I.; AXÉLL, T. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. *Oral Oncol*; v. 38, p. 521-526, 2002.
41. WATSON, J. D. *et al.* O DNA Reconbinante. 2 ed. Ouro Preto: Editora UFOP, 1997. 624p.
42. WEBB, G. *et al.* Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (GSTT1). *Genomics*, v. 33, p. 121-23, 1996.
43. WIENCKE, J. K. *et al.* Human glutathione S-transferase deficiency as a marker of susceptibility to epoxide-induced cytogenetic damage. *Cancer Res*; v. 50, p. 1585- 1590, 1990.
44. WORMHOUDT, L. W.; COMMANDEUR, J. N.; VERMEULEN, N. P. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochromeP450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Critic Rev Toxicol*; v. 29, p. 59-124, 1999.
45. ZHANG, L. *et al.* Increased genetic damage in oral leukoplakia from high risk sites. Potential impact on staging and clinical management. *American Cancer Society*, v. 91, n. 11, p. 2148-2155, 2001.

## **7. ANEXOS**

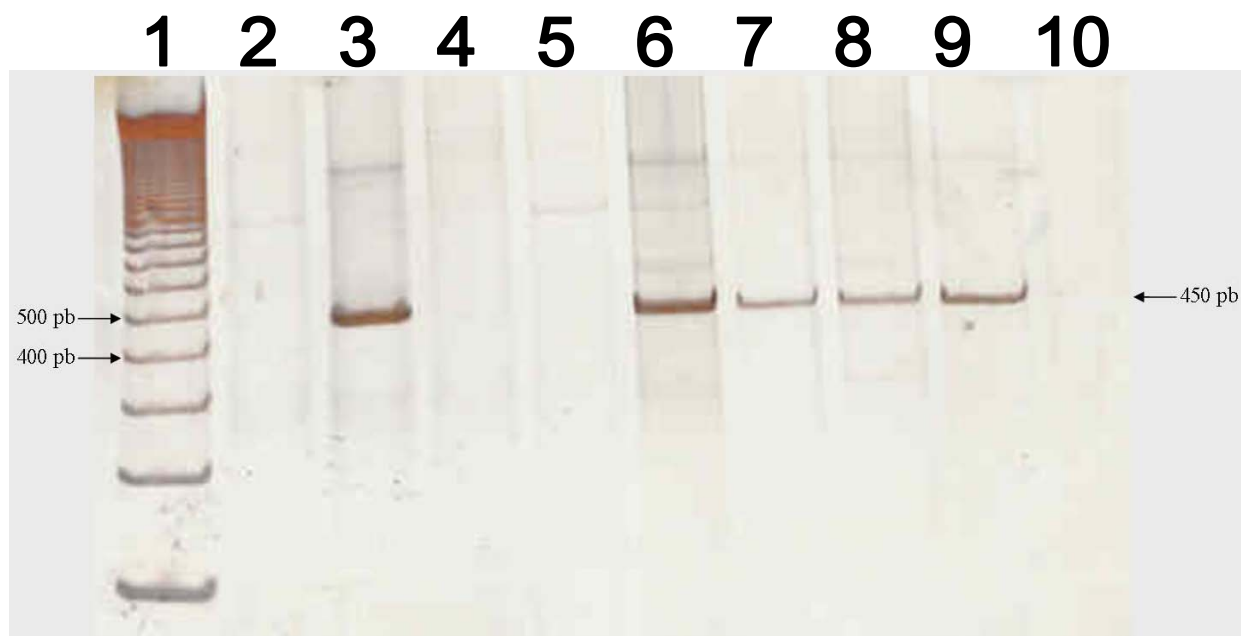


## ANEXO A



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

## ANEXO B



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