

Carcinogênese de cabeça e pescoço: impacto do polimorfismo MTHFD1 G1958A

LIDIA MARIA REBOLHO BATISTA DA SILVA¹, JÉSSICA NUNES GOMES DA SILVA², ANA LÍVIA SILVA GALBIATTI¹, MAYSÁ SUCCI³, MARIANGELA TORREGLOSA RUIZ⁴, LUIZ SÉRGIO RAPOSO⁵, JOSÉ VÍCTOR MANIGLIA⁶, ÉRIKA CRISTINA PAVARINO-BERTELLI⁷, ENY MARIA GOLONI-BERTOLLO⁸

¹ Mestrado em Ciências da Saúde; Doutoranda da Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular — UPGEM da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto — FAMERP, São José do Rio Preto, SP

² Graduação em Fonoaudiologia; Acadêmica do curso de Medicina da FAMERP, São José do Rio Preto, SP

³ Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" — UNESP, São José do Rio Preto, SP

⁴ Doutorado em Ciências da Saúde pela FAMERP, São José do Rio Preto, SP

⁵ Mestrado em Ciências da Saúde e Professor do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FAMERP, São José do Rio Preto, SP

⁶ Professor Adjunto, Livre-docente do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FAMERP, São José do Rio Preto, SP

⁷ Professor Adjunto, Livre-docente do Departamento de Biologia Molecular da FAMERP, São José do Rio Preto, SP

⁸ Livre-docente em Genética Humana e Médica; Professora do Departamento de Biologia Molecular da FAMERP

RESUMO

Objetivo: Investigar o polimorfismo MTHFD1 G1958A envolvido no metabolismo do folato no risco para o câncer de cabeça e pescoço e verificar a associação entre esse polimorfismo com fatores de risco e características clínico-histopatológicas. **Métodos:** Estudo retrospectivo que avaliou o polimorfismo MTHFD1 G1958A em 694 indivíduos (240 pacientes e 454 controles), por meio da técnica de análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição. Para análise estatística foram utilizados os testes de regressão logística múltipla e qui-quadrado. **Resultados:** Tabagismo e idade superior a 42 anos foram preditores da doença ($p < 0,05$). Os genótipos MTHFD1 1958GA ou AA foram associados ao tabagismo ($p = 0,04$) e etilismo ($p = 0,03$) e estão presentes em maior proporção em tumores com estádios mais avançados ($p = 0,04$) e em pacientes com menor sobrevida ($p = 0,03$). **Conclusão:** A presença do polimorfismo MTHFD1 G1958A associada aos hábitos tabagista e etilista aumenta o risco para desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço.

Unitermos: Polimorfismo genético; neoplasias de cabeça e pescoço; alcoolismo; tabagismo.

SUMMARY

Head and neck carcinogenesis: impact of MTHFD1 G1958A polymorphism

Objective: To investigate the MTHFD1 G1958A polymorphism involved in the folate metabolism as a risk for head and neck cancer, and to find the association of the polymorphism with the risk factors and clinical and histopathological characteristics. **Methods:** Retrospective study investigating MTHFD1 G1958A polymorphism in 694 subjects (240 patients in the Case Group and 454 in the Control Group) by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis. Multiple logistic regression and chi-square tests were used in the statistical analysis. **Results:** Multivariable analysis showed that smoking and age over 42 years were disease predictors ($p < 0.05$). MTHFD1 1958GA or AA genotypes were associated with smoking ($p = 0.04$) and alcoholism ($p = 0.03$) and were more often found in more advanced stage tumors ($p = 0.04$) and in patients with a shorter survival ($p = 0.03$). **Conclusion:** The presence of MTHFD1 G1948A polymorphism associated with smoking and alcoholism raises the head and neck cancer risk.

Keywords: Polymorphism, genetic; head and neck neoplasms; alcoholism; smoking; methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP).

Trabalho realizado na – UPGEM/
FAMERP, São José do Rio Preto, SP

Artigo recebido: 03/11/2010
Aceito para publicação: 25/01/2011

Supporte Financeiro
Fundação de Amparo à Pesquisa
do Estado de São Paulo
(FAPESP) e Conselho Nacional
de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico (CNPq)

Correspondência para:
Eny Maria Goloni-Bertollo
Unidade de Pesquisa em Genética
e Biologia Molecular - UPGEM da
Faculdade de Medicina de São
José do Rio Preto - FAMERP
Av Brigadeiro Faria Lima, 5416
CEP: 15090-000
São José do Rio Preto – SP
eny.goloni@famerp.br

Conflito de interesses: Não há.

INTRODUÇÃO

As neoplasias de cabeça e pescoço são responsáveis por uma grande incidência de óbitos em todo o mundo, sendo considerado o sexto tipo mais comum¹. A região anatômica afetada por esse tipo de tumor inclui principalmente cavidade oral (40%), faringe (15%) e laringe (25%)². Dados do Instituto Nacional do Câncer² mostraram que, na população brasileira, há uma proporção de três casos no gênero masculino para cada caso no gênero feminino, localizados com maior incidência na cavidade oral.

O câncer de cabeça e pescoço tem como principais fatores de risco o tabagismo e o etilismo¹. Infecções virais especialmente com o vírus Epstein-Barr e Papilomavírus Humano dos subtipos 16 e 18 e deficiências ou desequilíbrios de vitaminas e micronutrientes, tais como ácido fólico, vitaminas A, C, E, zinco e selênio também foram associados à ocorrência de neoplasias em câncer de cabeça e pescoço³⁻⁵.

O folato possui importante papel na oncologia, principalmente a partir de sua ação na metilação do DNA e na síntese de purinas e pirimidinas⁶. Alterações genéticas ou de deficiência dessa vitamina foram relacionadas ao câncer em vários estudos, incluindo o de cabeça e pescoço⁶⁻¹⁵.

O gene *Metilenotetrahidrofolato desidrogenase 1* (*MTHFD1*) é responsável pela formação do 10-formil-THF, essencial para a síntese de DNA. Este se apresenta polimórfico no nucleotídeo 1958 (G→A) resultando na substituição de uma alanina por uma glicina no códon 653, localizado no domínio 10-formil-THF sintase da enzima¹⁶. Se a disponibilidade de folato é continuamente limitada, um ciclo de reparo descontrolado pode causar quebras frequentes na molécula de DNA e danos cromossômicos, o que resulta em alteração celular maligna, contribuindo para o desenvolvimento do câncer⁶.

Poucos estudos avaliaram esse polimorfismo em câncer e os resultados são contraditórios. Kruszyna *et al.*¹⁷ não encontraram diferenças estatísticas significantes na frequência genotípica e alélica do polimorfismo *MTHFD1* A1958G em pacientes com câncer de laringe. Matakidou *et al.*¹⁸ e Chen *et al.*¹⁹ não associaram o mesmo polimorfismo às neoplasias de pulmão e colorretal, respectivamente. Por outro lado, Li *et al.*²⁰ encontraram associação do polimorfismo *MTHFD1* G1958A com o câncer de mama.

Assim, os objetivos desse estudo foram investigar a frequência do polimorfismo *MTHFD1* G1958A em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e comparar com indivíduos sem história familiar da doença, e verificar se há associação entre esse polimorfismo e os fatores de riscos (tabagismo e etilismo) e características clínico-histopatológicas dos tumores (sítio primário de ocorrência, comprometimento de linfonodos e extensão tumoral).

MÉTODOS

A amostra desse estudo foi constituída de 694 indivíduos, 240 pacientes com câncer de cabeça e pescoço (grupo caso) e 454 indivíduos sem história de neoplasia (grupo-controle), após obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (parecer 5566/2005 da Comissão de Ética em Pesquisa - CEP da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP).

Os pacientes foram incluídos no estudo após o diagnóstico histopatológico de carcinoma espinocelular realizado pelo Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base de São José do Rio Preto/SP. Os tumores foram classificados de acordo com os parâmetros da *Union International Control Cancer* (IUCC), 2002 e *American Joint Committee for Cancer* (AJCC), 2002 em três critérios: tamanho do tumor (T), presença de linfonodos regionais comprometidos (N) e presença de metástase a distância (M). Quanto à localização anatômica do sítio primário do tumor, foram classificados em cavidade oral, faringe, laringe e sítio primário desconhecido^{21,22}. O DNA das amostras de sangue foram provenientes do banco de amostras do laboratório e foram coletadas no período de março de 2000 a outubro de 2009.

O grupo-controle consistiu em 454 indivíduos sem história de neoplasia e, por serem oriundos de um serviço de doação de sangue, são isentos de vinte tipos de doenças, conforme determina legislação brasileira (<http://www.hemonline.com.br/portarias/rdc153/indexframe.htm>). Os critérios para inclusão e exclusão foram, respectivamente, idade acima de 40 anos e história de neoplasia na família. Todos os participantes foram submetidos a uma entrevista, com obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido, para obtenção de variáveis, como idade, gênero e hábitos tabagista e etilista. Foram considerados tabagistas indivíduos que consumiram cerca de 100 cigarros durante toda a vida e etilistas aqueles que ingeriram mais que quatro drinques por semana^{23,24}.

Para análise molecular, o DNA genômico foi extraído a partir de sangue periférico de acordo com a técnica de Miller *et al.*²⁵ com modificações. A técnica de análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (PCR-RFLP) foi utilizada para determinar os genótipos do polimorfismo *MTHFD1* G1958A. Os primers utilizados foram descritos por Hol *et al.*²⁶ (Sense: 5' - CACTC-CAGTGT'TGTCCATG - 3'; Anti-sense: 5' - GCATCT-TGAGAGCCCTGAC - 3'). A amplificação foi obtida com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 30 segundos para desnaturação do DNA a 95°C, 50 segundos de anelamento dos primers a 53°C e 90 segundos de extensão a 72°C. A extensão final foi realizada por 5 minutos a 72°C. O produto de 331pb foi submetido à digestão enzimática com a enzima *MspI* por 3 horas a 37°C. Os fragmentos de 166pb e 70pb foram gerados quando o alelo G esteve presente e o fragmento 266pb foi gerado quando o alelo A esteve presente.

A análise estatística foi realizada utilizando-se os programas computacionais Minitab/Windows - Versão 14.0, para avaliar os efeitos das variáveis analisadas em câncer de cabeça e pescoço e Bio Estat versão 3.0 para verificar se as distribuições genotípicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O teste de regressão logística múltipla foi utilizado para determinar o efeito das variáveis analisadas em câncer de cabeça e pescoço, que incluiu idade (referência: < 42 anos - idade em quartis), gênero (referência: feminino), hábito tabagista (referência: não fumantes) e hábito etilista (referência: não etilistas) e também para análise das variáveis clínico-histopatológicas. 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 resultados foram apresentados em *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC - 95%). O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p \leq 0,05$). O método de Kaplan-Meier foi aplicado para avaliar a taxa de sobrevivência considerando como desfecho da análise (*end point*) o período compreendido entre o diagnóstico da doença e o óbito.

RESULTADOS

Os resultados do teste de regressão logística múltipla mostraram diferenças significantes entre pacientes e controles com relação às variáveis: tabagismo e idade superior a 42 anos ($p < 0,05$) e, portanto, foram preditores da doença (Tabela 1).

O teste de Hardy-Weinberg mostrou que a distribuição genotípica estava em equilíbrio na amostra estudada (caso: $X^2 = 0,7096$; $p = 0,3996$, e controle: $X^2 = 0,0707$;

$p = 0,7903$). O polimorfismo *MTHFD1* G1958A não foi associado ao risco dessa doença. As frequências genotípicas *MTHFD1* 1958GG, GA e AA foram 35,83, 45,83, 18,34% respectivamente, para os casos, e 35,46, 48,68 e 15,86% respectivamente, para os controles. A frequência do alelo selvagem 1958G foi 0,59 e 0,6, e do alelo polimórfico 1958A foi 0,41 e 0,4 entre casos e controles, respectivamente.

Os resultados do teste de regressão logística múltipla para interação entre os fatores de risco e o polimorfismo *MTHFD1* G1958A mostraram que tabagismo (OR: 1,68; IC = 95% 1,01-2,78; $p = 0,46$) e etilismo (OR:1,83; IC = 95% 1,06-3,15; $p = 0,03$) associados aos genótipos *MTHFD1* 1958GA ou AA aumentam o risco para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço (Tabela 2).

Com relação aos parâmetros clínico-histopatológicos dos tumores, os resultados do teste de regressão logística múltipla mostraram associação com o estadiamento tumoral, no qual os genótipos *MTHFD1* 1958GA ou AA foram mais frequentes em indivíduos com estágio 3 e 4 ($p = 0,044$) (Tabela 3).

A média de sobrevivência dos pacientes no período do estudo obtida pela estimativa de Kaplan-Meier foi de 82,57 meses para os pacientes com genótipo *MTHFD1* 1958GG e de 59,03 para os pacientes com genótipo *MTHFD1* 1958GA ou AA, conforme Figura 1 ($p = 0,031$).

DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que tabagismo e idade superior a 42 anos aumentam o risco para câncer de cabeça e pescoço, corroborando com dados da literatura, que confirmam que esse tipo de neoplasia é mais frequente a partir da 4ª década de vida^{1,27} e em indivíduos tabagistas²⁸⁻³².

Tabela 1 – Distribuição demográfica, fatores de risco, genótipos e odds ratio (OR) para câncer de cabeça e pescoço

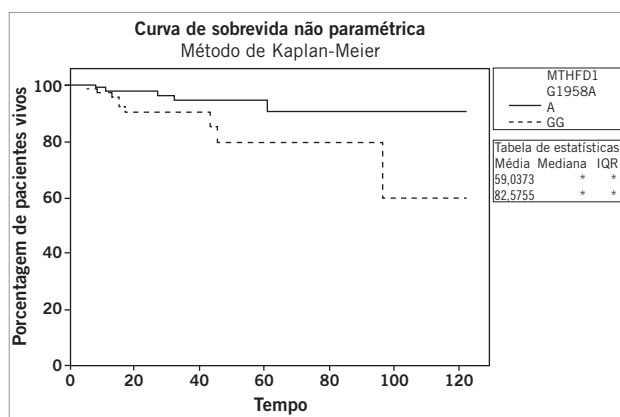
Variáveis	Caso (%)	Controle (%)	OR (95%IC)	p value
Consumo de tabaco				
Não fumantes	41 (17,08)	267 (58,81)	Referência	Referência
Fumantes	199 (82,92)	187 (41,19)	3,90 (2,46-6,20)	$p < 0,05$
Consumo de álcool				
Não etilistas	67 (27,92)	230 (50,66)	Referência	Referência
Etilistas	173 (72,08)	224 (49,34)	1,56 (0,99-2,48)	$p = 0,056$
Gênero				
Feminino	29 (12,08)	129 (28,41)	Referência	Referência
Masculino	211 (87,92)	325 (71,59)	1,65 (0,95-2,86)	$p = 0,073$
Idade				
< 42 anos	8 (3,33)	177 (38,99)	Referência	Referência
42-51 anos	49 (20,42)	170 (37,44)	5,22 (2,53-10,77)	$p < 0,05$
52-63 anos	99 (41,25)	51 (11,23)	28,75 (13,51-61,18)	$p < 0,05$
> 64 anos	84 (35)	56 (12,34)	24,51 (11,57-51,92)	$p < 0,05$
Genótipo <i>MTHFD1</i> G1958A				
GG	86 (35,83)	161 (35,46)	Referência	Referência
GA	110 (45,84)	221 (48,68)		
AA	44 (18,33)	72 (15,86)	1,38 (0,91-2,10)	$p = 0,135$

Tabela 2 – Distribuição dos fatores de risco relacionados ao câncer de cabeça e pescoço e polimorfismo MTHFD1 G1958A

Variáveis	GG genótipo casos/controles	OR (95%IC)	GA e AA genótipos casos/controles	OR (95%IC)*	p value
Idade					
< 42 anos	4/53	1,00 (ref)	6/123	0,38 (0,09-1,50)	p = 0,166
42-51 anos	19/64	1,00 (ref)	36/105	1,78 (0,83-3,80)	p = 0,136
52-63 anos	31/19	1,00 (ref)	60/32	2,02 (0,86-4,79)	p = 0,108
> 64 anos	30/22	1,00 (ref)	54/34	1,31 (0,60-2,83)	p = 0,496
Gênero					
Feminino	10/42	1,00 (ref)	19/87	1,41(0,50-3,96)	p = 0,519
Masculino	76/135	1,00 (ref)	119/206	1,37 (0,85-2,19)	p = 0,192
Tabaco					
Não	23/97	1,00 (ref)	18/170	0,98 (0,45-2,14)	p = 0,964
Sim	63/64	1,00 (ref)	136/123	1,68 (1,01-2,78)	p = 0,046
Álcool					
Não	29/77	1,00 (ref)	38/153	0,95 (0,49-1,85)	p = 0,890
Sim	57/84	1,00 (ref)	116/140	1,83 (1,06-3,15)	p = 0,030

Tabela 3 – Distribuição dos parâmetros clínico-histopatológicos e polimorfismo MTHFD1 G1958A

Parâmetros clínicos	GG genótipo casos (%)	OR (95%IC)	GA e AA genótipos casos (%)	OR (95%IC)*	p value
Sítio Primário					
Cavidade oral	35 (14,58)	1,00 (ref)	61 (25,42)	0,88 (0,51-1,53)	p = 0,659
Faringe	15 (6,25)	1,00 (ref)	36 (15)	1,42 (0,72-2,81)	p = 0,312
Laringe	28 (11,67)	1,00 (ref)	45 (18,75)	0,80 (0,45-1,43)	p = 0,454
Tamanho do tumor					
T1/T2	47 (19,58)	1,00 (ref)	107 (44,58)	1,00 (ref)	
T3/T4	37 (15,42)	1,00 (ref)	49 (20,42)	0,57 (0,32-0,98)	p = 0,044
Envolvimento de linfonodos					
Não	58 (24,17)	1,00 (ref)	111 (46,25)	1,00 (ref)	
Sim	26 (10,83)	1,00 (ref)	45 (18,75)	0,90 (0,50-1,62)	p = 0,721

Figura 1 – Curva de sobrevivência não paramétrica (Kaplan-Meier) dos pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.

O folato age como coenzima em várias reações celulares fundamentais e é necessário na divisão celular devido ao seu papel na biossíntese de purinas e pirimidinas, e, consequentemente, na formação do DNA e do RNA³³.

O gene *Metileno-tetra-hidrofolato desidrogenase 1* (*MTHFD1*), envolvido no metabolismo do folato, codifica uma proteína trifuncional cistólica que compreende 5,10-metileno-THF de-hidrogenase, 5,10-metenil-THF ciclo-hidrolase e 10-formil-THF sintase. As enzimas metileno-THF desidrogenase e metenil-THF ciclo-hidrolase, localizadas no mesmo domínio da proteína, catalisam a oxidação do 5,10-metileno-THF a 5,10-metenil-THF, convertida para 10-formil-THF. Estas três reações sequenciais estão envolvidas na interconversão de derivados do carbono-1 do THF, substratos para a síntese de metionina, timidilato e purinas^{19,34}. O polimorfismo G1958A desse gene pode estar associado ao câncer devido a alterações na síntese de DNA e consequentemente, descontrole celular²⁰.

No presente estudo, foi observado que a distribuição genotípica está em equilíbrio, corroborando com a pesquisa de Kruszyna *et al.*¹⁷, que também não encontrou diferenças estatísticas significantes na frequência genotípica e alélica do polimorfismo *MTHFD1* A1958G.

Em nosso estudo, o polimorfismo *MTHFD1* G1958A não foi associado ao risco de câncer de cabeça e pescoço,

assim como os achados de Kruszyna *et al.*¹⁷ em 131 pacientes com câncer de laringe e 250 indivíduos controles, Matakidou *et al.*¹⁸ em 619 pacientes com câncer de pulmão e Chen *et al.*¹⁹ em 274 pacientes com câncer colorretal e 461 indivíduos controles.

Entretanto, Li *et al.*²⁰, que avaliaram a 227 pacientes, mostraram que o genótipo polimórfico *MTHFD1* 1958AA ocorreu em maior proporção em pacientes com câncer de mama do que o genótipo selvagem *MTHFD1* 1958GG. Também foi encontrado no mesmo estudo associação entre maior frequência de metilação em pacientes com câncer de mama e o genótipo polimórfico *MTHFD1* 1958AA.

Em nosso estudo houve uma interação significativa ente os genótipos *MTHFD1* 1958GA ou AA e hábitos tabagista e etilista, sugerindo que indivíduos com esses hábitos e genótipos GA ou AA possuem risco maior no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. Não existem dados na literatura que comprovem essa associação.

A análise dos parâmetros clínico-histopatológicos confirmou que o tamanho do tumor T3 e T4 (avançado) foi mais frequente em pacientes com genótipos GA ou AA. O estudo de Kruszyna *et al.*¹⁷, em análises de significância genotípica entre características do tumor, mostraram uma fraca associação dos genótipos *MTHFD1* e o tamanho do tumor.

A média de sobrevida dos pacientes durante o período do estudo obtida pela estimativa de Kaplan-Meier mostrou que pacientes com o genótipo selvagem *MTHFD1* 1958GG apresentaram média de sobrevida maior com relação aos pacientes com genótipos *MTHFD1* 1958GA ou AA (pelo menos um alelo polimórfico), confirmando uma associação entre a presença do alelo polimórfico e a diminuição do tempo médio de sobrevida. De acordo com levantamento bibliográfico realizado, esse é o primeiro estudo que avaliou a associação entre o tempo de sobrevida e a presença do polimorfismo.

CONCLUSÃO

São preditores para o câncer de cabeça e pescoço, independentemente da variável genética, o uso de tabaco e idade superior a 42 anos. A presença do polimorfismo *MTHFD1* G1958A associado aos hábitos tabagista e etilista aumentam o risco para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. O polimorfismo é mais frequente em tumores com estádios mais avançados da doença e em pacientes com menor prognóstico de vida. É importante corroborar por meio de outros estudos a influência do polimorfismo do gene *MTHFD1* e de outros genes envolvidos no metabolismo do folato na tumorigênese do câncer de cabeça e pescoço, para que seja determinada a etiologia e as correlações significativas com as características clínico-histopatológicas desses tumores.

REFERÊNCIAS

- Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008;371:1695-709.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. 2010.
- Kane, MA. The role of folates in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Detect Prev*. 2006;29:46-53.
- Lo AK, Lo KW, Tsao SW, Wong HL, Hui JW, To KF *et al.* Epstein-Barr virus infection alters cellular signal cascades in human nasopharyngeal epithelial cells. *Neoplasia*. 2006;3:173-80.
- Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *Dent Res*. 2009;88:300-6.
- Linhardt HG, Troen A, Bell GW, Cantu E, Chao W, Moran E *et al.* Folate deficiency induces genomic uracil misincorporation and hypomethylation but does not increase DNA point mutations. *Gastroenterology* 2009;136:227-35.
- Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA, Eddy K, Furniss CS, McClean MD, *et al.* Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16:108-14.
- Mu LN, Cao W, Zhang ZF, Yu SZ, Jiang QW, You NC *et al.* Polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), fruit and vegetable intake, and the risk of stomach. *Cancer Biomark*. 2007;12:61-75.
- Ouerhani S, Oliveira E, Marrakchi R, Ben Slama MR, Sfaxi M, Ayed M *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase polymorphisms and risk of bladder cancer in a Tunisian population. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;176:48-53.
- Pande M, Chen J, Amos CI, Lynch PM, Broaddus R, Frazier ML. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms C677T and A1298C on age-associated risk for colorectal cancer in a caucasian lynch syndrome Population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16:1753-9.
- Xu X, Gammon MD, Wetmur JG, Rao M, Gaudet MM, Teitelbaum SL *et al.* A functional 19-base pair deletion polymorphism of dihydrofolate reductase (DHFR) and risk of breast cancer in multivitamin users. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:1098-102.
- Kalmbach RD, Choumenkovich SF, Troen AP, Jacques PF, D'Agostino R, Selhub J. A 19-Base pair deletion polymorphism in dihydrofolate reductase is associated with increased unmetabolized folic acid in plasma and decreased red blood cell folate. *J Nutr*. 2008;138:2323-7.
- Ott N, Geddert H, Sarbia M. Polymorphisms in methionine synthase (A2756G) and cystathionine beta-synthase (844ins68) and susceptibility to carcinomas of the upper gastrointestinal tract. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008;134:405-10.
- Garcia-Crespo D, Knock E, Jabado N, Rozen R. Intestinal neoplasia induced by low dietary folate is associated with altered tumor expression profiles and decreased apoptosis in mouse normal intestine. *J Nutr*. 2009;139:488-95.
- Langevin SM, Lin D, Matsuo K, Gao CM, Takezaki T, Stolzenberg-Solomon RZ *et al.* Review and pooled analysis of studies on MTHFR C677T polymorphism and esophageal cancer. *Toxicol Lett*. 2009;184:73-80.
- Krajinovic M, Lemieux-Blanchard E, Chiasson S, Primeau M, Costea I, Moghrabi A. Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2004;4:66-72.
- Kruszyna L, Lianeri M, Rydzanicz M, Gajecka M, Szyfter K, Jagodzinski PP. Polymorphic variants of folate metabolism genes and the risk of laryngeal cancer. *Mol Biol Rep*. 2010;37:241-7.
- Matakidou A, Galta R, Rudd ME, Webb EL, Bridle H, Eisen T *et al.* GELCAPS Consortium. Prognostic significance of folate metabolism polymorphisms for lung cancer. *Br J Cancer* 2007;97:247-52.
- Chen J, Kyte C, Valcin M, Chan W, Wetmur JG, Selhub J *et al.* Polymorphisms in the one-carbon metabolic pathway, plasma folate levels and colorectal cancer in a prospective study. *J Cancer* 2004;110:617-20.
- Li SY, Rong M, Iacopetta B. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in human breast cancer. *Oncol Rep*. 2006;15:221-5.

21. Sobin LH, Wittelind CH. International union against cancer: TNM classification of malignant tumours. 6th ed. New York: Wiley; 2000.
22. Lee KJ. Essential otolaryngology-head & neck surgery. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2003.
23. 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 Control*. 1998;9:99-108.
24. Ahrendt SA, Chown JT, Yang SC, Wu L, Zhang MJ, Jen J *et al*. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2000;31:55-9.
25. Miller SA, Dikes DD e Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
26. Hol FA, Van der Put NM, Geurds MP, Heil SG, Trijbels FJ, Hamel BC *et al*. Molecular genetic analysis of the gene encoding the tri-functional enzyme MTHFD (methylenetetrahydrofolate- dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects. *Clin Genet*. 1998;2:119-25.
27. Werbroutck J, De Ruyck K, Duprez F, Van Eijkeren M, Rietzschel E, Bekaert S *et al*. Single-nucleotide polymorphisms in DNA double-strand break repair genes: Association with head and neck cancer and interaction with tobacco use and alcohol consumption. *Mutat Res*. 2008;656:74-81.
28. Psyrrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006;5:24-31.
29. Guha N, Boffetta P, Wunsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D *et al*. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol*. 2007;166:1159-73.
30. Serefoglou Z, Yapijakis C, Nkenke E, Vairaktaris E. Genetic association of cytokine DNA polymorphisms with head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2008;44:1093-9.
31. Yadav SS, Ruwali M, Shah PP, Mathur N, Singh RL, Pant MC *et al*. Association of poor metabolizers of cytochrome P450 2C19 with head and neck cancer and poor treatment response. *Mutat Res*. 2008;644:31-7.
32. Leme CVD, Raposo LS, Ruiz MT, Biselli JM, Galbiatti ALS, Maniglia JV *et al*. GSTM1 and GSTT1 genes analysis in head and neck cancer. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56:299-303.
33. Krishnaswamy K, Nair KM. Importance of folate in human nutrition. *Br J Nutr*. 2001;85:S115-S24.
34. Stevens VL, Mc Cullough ML, Pavluck AL, Talbot JT, Feigelson HS, Thun MJ *et al*. Association of polymorphisms in one-carbon metabolism genes and postmenopausal breast cancer incidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2007;16:1140-7.