



Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org



ARTIGO ORIGINAL

Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and cystathionine beta-synthase in oral cancer – a case-control study in southeastern Brazilians[☆]

Andressa Barbosa^a, Marcelo dos Santos^a, José Roberto Vasconcelos de Podestá^b,
Sônia Alves Gouvêa^c, Sandra Ventorin Von Zeidler^d, Iúri Drumond Louro^a,
Melissa de Freitas Cordeiro-Silva^{e,*}

^a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Departamento de Ciências Biológicas, Vitória, ES, Brasil

^b Hospital Santa Rita de Cássia, Divisão de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Programa de Prevenção e Detecção Precoce de Câncer Oral, Vitória, ES, Brasil

^c Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Departamento de Ciências Fisiológicas, Vitória, ES, Brasil

^d Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Departamento de Patologia, Vitória, ES, Brasil

^e Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil

Recebido em 1 de abril de 2015; aceito em 2 de outubro de 2015

KEYWORDS

Oral squamous cell carcinoma;
Methylenetetrahydrofolate reductase;
Cystathionine beta-synthase;
Genetic polymorphism

Abstract

Introduction: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a serious public health problem, due to its high mortality rate and worldwide rising incidence. OSCC susceptibility is mediated by interactions between genetic and environmental factors. Studies suggest that genetic variants encoding enzymes involved in folate metabolism may modulate OSCC risk by altering DNA synthesis/repair and methylation process.

Objective: The goals of this study were to evaluate the association of three genotypic polymorphism (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C and *CBS* 844ins68) and oral cancer risk in southeastern Brazilians and evaluate the interactions between polymorphisms and clinical histopathological parameters.

Methods: This case-control study included 101 cases and 102 controls in the state of Espírito Santo, Brazil. *MTHFR* genotyping was done by PCR-RFLP (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism) and *CBS* genotyping by PCR (polymerase chain reaction) analysis.

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2015.10.012>

[☆] Como citar este artigo: Barbosa A, dos Santos M, de Podestá JR, Gouvêa SA, Von Zeidler SV, Louro ID, et al. Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and cystathionine beta-synthase in oral cancer – a case-control study in southeastern Brazilians. Braz J Otorhinolaryngol. 2016;82:558-66.

* Autor para correspondência.

E-mail: melissafcs@yahoo.com.br (M.F. Cordeiro-Silva).

PALAVRAS-CHAVE

Carcinoma
espinocelular oral;
Metilenotetrahidrofo-
lato redutase;
Cistationina beta-
sintase;
Polimorfismo genético

Results: *MTHFR* C677T polymorphism was associated with lymph node involvement. Genotype CT + TT acted as a protective factor. *MTHFR* A1298C AC + CC genotype was associated with tumor differentiation, and possibly with a better prognosis. In risk analysis, no correlation was observed between genotypes and OSCC.

Conclusion: We concluded that *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C and *CBS* 844ins68 polymorphisms were not associated with OSCC risk in southeastern Brazilians; however, we suggest a prognosis effect associated with *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms in OSCC.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Polimorfismos em metilenotetrahidrofolato redutase, cistationina beta-sintase no câncer de boca – um estudo de caso-controle no Sudeste brasileiro

Resumo

Introdução: O carcinoma espinocelular oral (CECO) trata-se de um importante problema de saúde pública, devido à elevada taxa de mortalidade e incidência crescente em todo o mundo. A susceptibilidade ao CECO é mediada por interações entre fatores genéticos e ambientais. Estudos sugerem que as variantes genéticas que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo do folato podem modular o risco de CECO, alterando a síntese/reparação do DNA e o processo de metilação.

Objetivo: Os objetivos deste estudo foram avaliar a associação de três polimorfismos genotípicos (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C e *CBS* 844ins68) e o risco de câncer oral em brasileiros da região Sudeste, e avaliar as interações entre polimorfismos e parâmetros clínico-histopatológicos.

Método: Este estudo de caso-controle incluiu 101 casos e 102 controles no estado do Espírito Santo, Brasil. A genotipagem do polimorfismo *MTHFR* foi realizada por PCR-RFLP (Reação de Polimerase em Cadeia - Polimorfismo no Comprimento de Fragmento de Restrição) e a do *CBS* por análise da PCR (Reação de Polimerase em Cadeia).

Resultados: O polimorfismo *MTHFR* C677T foi associado ao envolvimento de gânglios linfáticos. O genótipo CT + TT atuou como um fator protetor. O genótipo *MTHFR* A1298C AC + CC foi associado à diferenciação do tumor e, possivelmente, a um prognóstico melhor. Na análise de risco, a correlação entre os genótipos e o CECO não foi observada.

Conclusão: Concluímos que os polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C e *CBS* 844ins68 não estão associados ao risco de CECO nos brasileiros da região Sudeste; no entanto, sugerimos um efeito prognóstico associado aos polimorfismos *MTHFR* C677T e A1298C em CECO.

© 2015 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob a licença CC BY (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

O carcinoma espinocelular oral (CECO) é o oitavo câncer em humanos mais comum no mundo.¹ Em 2014, a expectativa de novos casos de câncer oral foi de cerca de 15.290 novos e, no Sudeste, esse tipo de câncer é o quarto entre os homens e o décimo entre as mulheres.² O CECO é uma doença multifatorial, afetada por fatores ambientais amplamente conhecidos, como álcool e tabaco, bem como por fatores genéticos, dos quais pouco se sabe. Os polimorfismos em determinados genes podem conferir susceptibilidade para o desenvolvimento CECO. Estudos têm demonstrado uma relação entre os polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo do folato e o risco de CECO, devido à sua influência sobre a metilação, a síntese e a reparação do DNA.³⁻⁷

O gene da *MTHFR* codifica a enzima metilenotetrahidrofolato redutase, que é importante para a homeostase intracelular de folato e a conversão irreversível de 5,10-metilenotetrahi-

drofolato (5,10-MTHF) para 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF). Os polimorfismos C677T e A1298C no gene da *MTHFR* podem estar associados à susceptibilidade ao câncer oral devido a alterações na atividade catalítica. O polimorfismo C677T resulta em uma enzima com 65% da atividade homozigoto selvagem para heterozigotos e 30% para homozigotos do alelo variante.^{8,9} O polimorfismo *MTHFR* A1298C está localizado na região de domínio regulamentar.¹⁰ Indivíduos homozigóticos 1298C têm, aproximadamente, a mesma atividade enzimática daqueles heterozigóticos.¹¹ A redução da atividade da enzima *MTHFR* aumenta a disponibilidade de folato para a produção de timidilato e de purinas para a síntese e reparação do DNA.¹²

O gene *CBS* codifica a cistationina beta-sintase (*CBS*), também envolvida na via de folato, que decorre da conversão de homocisteína em cistationina. O polimorfismo *CBS* 844ins68 foi associado a menos tempo de sobrevida em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.¹³ Portanto, este estudo teve como objetivo investigar a frequên-

cia e a associação dos polimorfismos *MTHFR* e *CBS* na susceptibilidade ao câncer oral da população do Espírito Santo, Brasil, e seu potencial impacto sobre o resultado do prognóstico.

Método

Amostras

Neste estudo de caso-controle, amostras de sangue foram coletadas de 101 pacientes com diagnóstico histopatológico conclusivo de carcinoma epidermoide oral, obtidas na Divisão de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia. Desse total, 69 indivíduos foram classificados pela cor da pele e outras características físicas: 22 como brancos (caucasianos, principalmente descendentes portugueses); 32 como pardos (mistura étnica de europeus, africanos e ameríndios); e 15 como negros (afrodescendentes), com base na classificação oficial do Censo Demográfico Brasileiro. Todos os pacientes eram residentes do estado do Espírito Santo (ES, Brasil) e foram recrutados aleatoriamente de 2011 a 2013. Foram incluídos nesse estudo pacientes de ambos os sexos com mais de 35 anos de idade que aceitaram participar da pesquisa. Os critérios de exclusão foram pacientes com CCE em outros locais e aqueles que receberam radioterapia, quimioterapia, cirurgia ou qualquer outro tratamento antes de seu recrutamento.

O grupo controle foi composto por 102 indivíduos residentes no Espírito Santo, Brasil, que foram encaminhados para avaliação clínica e tinham história de câncer familiar negativa, e não apresentavam lesões bucais pré-malignas ou malignas no momento da coleta de amostras. O grupo controle foi equiparado por idade e sexo. Como estavam disponíveis para os controles apenas dados parciais, em relação a hábitos como tabagismo e uso de álcool, estes não foram incluídos para equiparação com os casos. Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento informado, aprovado por conselhos de revisão institucional. Este trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (CEP Protocolo nº 318/2011).

As características clinicopatológicas dos pacientes analisados foram: estágio (estágio inicial I-II e tardio III-IV) e tamanho (T1, T2, T3 e T4) do tumor; estágio nodal (N⁺, positivo e N0, negativo), de acordo com a classificação TNM¹⁴; grau histopatológico (tumores bem, moderadamente e pouco diferenciados)¹⁵; e consumo de cigarros. Todas as informações necessárias a respeito dos parâmetros clínicos e histopatológicos foram obtidas de laudos médicos. Os participantes não foram classificados em grupos étnicos ou pela cor da pele.

Testes de genotipagem

O DNA genômico foi isolado através de extração com fenol/clorofórmio. Os polimorfismos *MTHFR* C677T e *MTHFR* A1298C foram genotipados pelo método PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo no Comprimento de Fragmento de Restrição), como descrito anteriormente.^{8,11} Todas as reações incluíram controles positivos e negativos. Aproximadamente 20% das amostras foram selecionadas aleatoriamente para o procedimento repetido de genotipagem. A reprodutibilidade foi de 100%.

A transição C → T cria um local de restrição para a enzima *Hinf*I. O produto da PCR (198 bp) foi digerido usando a enzima *Hinf*I e visualizado por eletroforese em géis de poliácridamida a 8% e coloração com nitrato de prata. Os produtos da PCR incluíam um único fragmento 198 bp para homozigóticos de tipo selvagem (CC); 198, 175 e 23 pb para fragmentos heterozigotos (CT); e 175 e 23 pb para homozigoto mutante (TT).

O polimorfismo *MTHFR* 1298AC elimina o sítio de restrição MbolI.

O genótipo selvagem (AA) produziu cinco fragmentos de 56, 31, 30, 28 e 18 pb; enquanto o heterozigoto (AC) produziu seis fragmentos de 84, 56, 31, 30, 28 e 18 pb; e os mutantes homozigotos (CC) produziram quatro fragmentos de 84, 31, 30 e 18 pb.

Tabela 1 Características clínicas dos pacientes com câncer e indivíduos controle

Características	Pacientes n (%)	Controles n (%)	p
<i>Gênero</i>			
Femino	20 (19,8)	20 (19,6)	0,972
Masculino	81 (80,2)	82 (80,4)	
<i>Idade, anos</i>			
≤ 55	47 (46,5)	56 (54,9)	0,233
> 55	54 (53,5)	46 (45,1)	
<i>Grupo étnico</i>			
Brancos	22 (31,9)	-	-
Pardos	32 (46,4)	-	
Negros	15 (21,7)	-	
<i>Exposição ao tabaco</i>			
Consumidor	73 (72,3)	0 (0,0)	-
Não consumidor	28 (27,7)	0 (0,0)	
Desconhecido ^a	0 (0,0)	102 (100,0)	
<i>Estágio do tumor</i>			
Inicial (I, II)	25 (24,7)	-	-
Avançado (III, IV)	76 (75,3)	-	
<i>Tamanho do tumor^c</i>			
T1	12 (11,9)	-	-
T2	22 (21,8)	-	
T3	17 (16,8)	-	
T4	50 (49,5)	-	
<i>Estado nodal^c</i>			
N0	50 (49,5)	-	-
N+	51 (50,5)	-	
<i>Grau histopatológico</i>			
Bem	25 (24,7)	-	-
Moderado	29 (28,7)	-	
Pouco	5 (5,0)	-	
Não disponível ^b	42 (41,6)	-	
<i>Total</i>	101 (49,8)	102 (50,2)	

^a Desconhecido (não considerados nos cálculos estatísticos).

^b Não disponível (não considerados nos cálculos estatísticos).

^c Classificação TNM.

Tabela 2 Distribuição dos genótipos *MTHFR* e *CBS* entre pacientes com câncer oral e grupo controle

Genótipos	Total n (%)	Pacientes n (%)	Controles n (%)	<i>p</i>
<i>MTHFR</i> C677T				
CC	100 (49,2)	50 (49,5)	50 (49,0)	0,438
CT	86 (42,4)	45 (44,6)	41 (40,2)	
TT	17 (8,4)	6 (5,9)	11 (10,8)	
<i>MTHFR</i> A1298C				
AA	113 (55,7)	60 (59,4)	53 (52,0)	0,541
AC	80 (39,4)	36 (35,6)	44 (43,1)	
CC	10 (4,9)	5 (5,0)	5 (4,9)	
<i>CBS</i> 844ins68				
NN	163 (80,3)	76 (75,2)	87 (85,3)	0,112
NI	38 (18,7)	24 (23,8)	14 (13,7)	
II	2 (1,0)	1	1	
<i>Total</i>	203 (100,0)	101 (49,8)	102 (50,2)	

N, não inserção; I, inserção.

Os polimorfismos *CBS* 844ins68 foram caracterizados por separação do tamanho diferencial após PCR, como descrito anteriormente.¹⁶ O alelo polimórfico resulta da inserção de 68 pb no exon 8. O alelo major (I) apresentou um fragmento 239 pb, e o alelo normal (N) apresentou um fragmento de 171 pb.

Análise estatística

As frequências genotípicas foram testadas para o equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE). Os testes Qui-quadrado e exato de Fisher foram usados para análise de associação, e a confirmação foi obtida pelo teste de Lilliefors (significância considerada quando $p < 0,05$). A regressão logística multivariada foi usada para obter *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%). Os cálculos estatísticos foram realizados com o uso do programa Epi InfoH 3.4.3 de 2007. O desequi-

líbrio de ligação (LD) e a análise dos haplótipos foram conduzidos usando o programa Haploview

Resultados

As características de 101 pacientes com câncer oral e 102 controles estão apresentadas na tabela 1. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

As frequências genotípicas para *MTHFR* C677T, A1298C e *CBS* 844ins68 em controles e em pacientes com câncer oral estão apresentadas na tabela 2.

A distribuição dos genótipos dos três polimorfismos genéticos não foi significativamente diferente entre o câncer oral e o grupo controle ($p > 0,05$) (tabela 2). As frequências dos alelos *MTHFR* C677T, A1298C e *CBS* 844ins68 em controles e em pacientes com câncer oral estão apresentadas na tabela

Tabela 3 Distribuição dos alelos *MTHFR* e *CBS* entre pacientes com câncer oral e grupo controle

Alelo	Pacientes			Controles			p
	n (%)	HWE		n (%)	HWE		
		χ^2	p		χ^2	p	
MTHFR C677T							
C	145 (71,8)	1,006	0,316	141 (69,1)	0,348	0,555	0,556
T	57 (28,2)			63 (30,9)			
MTHFR A1298C							
A	156 (77,2)	0,018	0,893	150 (73,5)	1,193	0,275	0,387
C	46 (22,8)			54 (26,5)			
CBS 844ins68							
N	176 (87,1)	0,357	0,550	188 (92,2)	0,260	0,610	0,096
I	26 (12,9)			16 (7,8)			

HWE, equilíbrio de Hardy-Weinberg; χ^2 , Qui-quadrado; N, não inserção; I, inserção.

Tabela 4 Desequilíbrio de ligação e análise dos haplótipos para os alelos de C677T e A1298C

Haplótipo	Casos 2n = 202	Controles 2n = 204	χ^2	p-valor	OR (IC 95%)
C-A	301	291	-	-	1
C-C	191	195	0,173	0,676	0,946 (0,817-1,364)
T-A	231	213	0,141	0,706	1,048 (0,745-1,220)
T-C	103	117	1,040	0,307	0,851 (0,861-1,602)

Tabela 5 Características clinicopatológicas de pacientes com CECO e relação com os polimorfismos da *MTHFR* estudados

Características	Genótipo <i>MTHFR</i> C677T					
	CC n (%)	CT n (%)	TT n (%)	<i>p</i>	CT + TT n (%)	<i>p</i>
<i>Estágio do tumor</i>						
Inicial (I, II)	12 (24,0)	11 (24,4)	2 (33,3)	0,880	13 (25,5)	0,862
Avançado (III, IV)	38 (76,0)	34 (75,6)	4 (66,7)		38 (74,5)	
<i>Tamanho do tumor</i> ^a						
T1	5 (10,0)	5 (11,1)	2 (33,3)	0,569	7 (13,7)	0,716
T2	12 (24,0)	10 (22,2)	0 (0,0)		10 (19,6)	
T3	10 (20,0)	6 (13,3)	1 (16,7)		7 (13,7)	
T4	23 (46,0)	24 (53,3)	3 (50,0)		27 (52,9)	
<i>Estado nodal</i> ^a						
N0	19 (38,0)	28 (62,2)	3 (50,0)	0,062	31 (60,8)	0,022
N+	31 (62,0)	17 (37,8)	3 (50,0)		20 (39,2)	
<i>Grau histopatológico</i>						
Bem	10 (20,0)	15 (33,3)	0 (0,0)	0,192	15 (29,4)	0,238
Moderado	12 (24,0)	14 (31,1)	3 (50,0)		17 (33,3)	
Pouco	4 (8,0)	1 (2,2)	0 (0,0)		1 (2,0)	
Não disponível ^b	24 (48,0)	15 (33,3)	3 (50,0)		18 (35,3)	
Características	<i>MTHFR</i> A1298C genótipo					
	AA n (%)	AC n (%)	CC n (%)	<i>p</i>	AC + CC n (%)	<i>p</i>
<i>Estágio do tumor</i>						
Inicial (I, II)	14 (23,3)	10 (27,8)	1 (20,0)	0,860	11 (26,8)	0,689
Avançado (III, IV)	46 (76,7)	26 (72,2)	4 (80,0)		30 (73,2)	
<i>Tamanho do tumor</i> ^a						
T1	6 (10,0)	6 (16,7)	0 (0,0)	0,747	6 (14,6)	0,512
T2	16 (26,7)	5 (13,9)	1 (20,0)		6 (14,6)	
T3	10 (16,7)	6 (16,7)	1 (20,0)		7 (17,1)	
T4	28 (46,7)	19 (52,8)	3 (60,0)		22 (53,7)	
<i>Estado nodal</i> ^a						
N0	30 (50,0)	19 (52,8)	1 (20,0)	0,386	20 (48,8)	0,904
N+	30 (50,0)	17 (47,2)	4 (80,0)		21 (51,2)	
<i>Grau histopatológico</i>						
Bom	8 (13,3)	14 (38,9)	3 (60,0)	0,037	17 (41,5)	0,007
Moderado	18 (30,0)	10 (27,8)	1 (20,0)		11 (26,8)	
Mau	5 (8,3)	0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	
Não disponível ^b	29 (48,3)	12 (33,3)	1 (20,0)		13 (31,7)	

^a Classificação TNM.^b Não disponível (não considerados nos cálculos estatísticos).

3. Todos os polimorfismos testados estão no equilíbrio de HWE.

O programa Haploview foi usado para a análise do LD e haplótipo em alelos de *MTHFR* C677T e A1298C (tabela 4). Verificamos que não houve diferença para os haplótipos nos dois grupos ($p > 0,05$), o que sugeriu que eles não aumentam o risco de câncer.

Os pacientes foram avaliados de acordo com a etnia, mas não foi observada prevalência do alelo polimórfico em grupos étnicos. A prevalência do alelo C (polimorfismo *MTHFR* C677T) foi maior nos três grupos étnicos (brancos: 63,6%; negros: 73,3%; pardos: 82,8%). Para o polimorfismo *MTHFR* A1298C, o alelo A predominou em todos os grupos étnicos (brancos: 72,7%; negros: 83,3% e pardos: 76,6%) e, finalmente, a presença do alelo tipo selvagem para o polimorfismo *CBS* 844ins68 também foi mais prevalente em todos os grupos étnicos (brancos: 86,4%; negros - 86,7% e pardos - 89,1%). Esses dados demonstram a ampla mistura de raças no grupo caso.

A interação entre os genótipos e as características clínico-patológicas foi adicionalmente analisada (tabelas 5 e 6). O polimorfismo *MTHFR* C677T está associado aos linfonodos positivos, e a combinação dos genótipos CT + TT atua como um fator de proteção. A análise multivariada (IC 95%) considerando o tamanho do tumor revelou que a combinação dos genótipos CT + TT gera um risco de metástase linfática três vezes menor que o genótipo CC ($p = 0,012$) (tabela 7).

Observamos que o polimorfismo A1298C está relacionado com a diferenciação do tumor. Os genótipos AC + CC foram mais frequentes em tumores bem diferenciados, enquanto o

Tabela 6 Características clinicopatológicas de pacientes com CECO e relação com o polimorfismo *CBS* estudado

Características	Genótipo <i>CBS</i> 844ins68		
	Não inserção n (%)	Inserção n (%)	<i>p</i>
Estágio do tumor			
Inicial (I, II)	18 (23,7)	7 (28,0)	0,664
Avançado (III, IV)	58 (76,3)	18 (72,0)	
Tamanho do tumor^a			
T1	8 (10,5)	4 (16,0)	0,792
T2	18 (23,7)	4 (16,0)	
T3	13 (17,1)	4 (16,0)	
T4	37 (48,7)	13 (52,0)	
Estado nodal^a			
N0	40 (52,6)	10 (40,0)	0,273
N+	36 (47,4)	15 (60,0)	
Grau histopatológico			
Bem	19 (25,0)	6 (24,0)	0,462
Moderado	22 (28,9)	7 (28,0)	
Pauco	5 (6,6)	0 (0,0)	
Não disponível ^b	30 (39,5)	12 (48,0)	

^a Classificação TNM.

^b Não disponível (não considerados nos cálculos estatísticos).

Tabela 7 Análise multivariada do estado nodal, de acordo com o tamanho do tumor e o polimorfismo *MTHFR* C677T

Variável	Estado nodal (N) ^a	
	OR (IC 95%)	<i>p</i>
Tamanho do tumor (T)^a		
T1, T2	1	
T3	3,07 (0,87-10,87)	0,083
T4	6,46 (2,32-17,95)	< 0,001
<i>MTHFR</i> C677T		
CC	1	
CT+TT	0,32 (0,13-0,77)	0,012

OR, Odds ratio; IC, intervalo de confiança.

^a Classificação TNM.

genótipo AA foi mais frequente em tumores moderadamente ou pouco diferenciados ($p = 0,007$) (tabela 5).

Não houve associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo *CBS* 844ins68 e as variáveis analisadas (tabela 6).

Discussão

A deficiência de folato tem sido associada a doenças como o câncer. Portanto, o papel dos polimorfismos genéticos das enzimas do metabolismo de folato já foi investigado em vários tipos de câncer.^{17,18} Entre essas enzimas, investigamos *MTHFR* e *CBS* em CECO.

O nosso estudo relatou, pela primeira vez, a associação entre as metástases em linfonodos e a combinação de CT + TT no polimorfismo *MTHFR* C677T atuando como um fator de proteção ($p = 0,022$). Além disso, outros estudos sugeriram um melhor prognóstico para os pacientes com câncer oral com os genótipos CT ou TT. Tsai et al.¹⁹ mostraram que os pacientes com 677CT + TT apresentam um risco menor de metástase em comparação com aqueles com CC, e Sailasree et al.²⁰ mostraram melhora da sobrevida.

O efeito protetor pode ocorrer devido à sua menor eficiência para a metilação do DNA.²¹ *MTHFR* converte 5,10-MTHF em 5-MTHF; o 5,10-MTHF é usado para a conversão de dUTMP em dTMP; enquanto o 5-MTHF é o doador de metil para a síntese de metionina e S-adenosilmetionina em reações de metilação.²² Indivíduos com os genótipos *MTHFR* 677TT e *MTHFR* 677CT apresentam enzimas com atividade diminuída,⁸ portanto, tendem a acumular 5,10-MTHF, causando uma alteração na via, o que leva à diminuição da metilação do DNA.²¹ Um nível baixo de metilação do DNA genômico poderia diminuir a chance de hipermetilação em genes relacionados ao câncer, levando a um número menor de mutações por desaminação espontânea de 5-metilcitosina (5mC). A hipermetilação favorece a iniciação e a progressão do câncer ao silenciar genes supressores tumorais ou genes de reparo do DNA.²³ A maioria das mutações encontradas em cânceres é constituída de transições C → T em sequências CG:CG, devido às altas frequências de desaminação espontânea de 5mC.^{24,25} A falta de metilação de citosina poderia evitar as mutações C → T.

Além disso, o polimorfismo *MTHFR* A1298C foi associado à diferenciação do tumor. Os genótipos AC + CC foram mais frequentes nos tumores bem diferenciados ($p = 0,007$), que também podem estar associados a um melhor prognóstico; enquanto o genótipo AA teve uma frequência mais elevada em tumores moderadamente ou pouco diferenciados. Embora o valor prognóstico do grau histológico seja controverso em CECO, alguns estudos sugerem que os carcinomas pouco diferenciados tendem a gerar metástase e estão associados à diminuição da taxa de sobrevivência.²⁶ No entanto, não há consenso na literatura sobre se a classificação histológica do tumor é um bom parâmetro isolado de valor prognóstico. O grau histopatológico do tumor, juntamente com fatores prognósticos adicionais e estadiamento TNM, podem proporcionar um melhor suporte para a decisão terapêutica.

No entanto, neste estudo com a população brasileira do Sudeste, não observamos associação entre os polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C e *CBS* 844ins68 e a susceptibilidade ao câncer oral. Alguns estudos também descobriram um risco reduzido não significativo para o genótipo *MTHFR* 677TT no câncer oral.^{27,28} Em contraste, Sailasree et al.²⁰ descobriram que C677T estava associado à predisposição ao câncer oral, com um risco reduzido para indivíduos com genótipo CT + TT. Estudos de meta-análise^{29,30} mostraram uma associação marginal ou nenhuma associação do polimorfismo *MTHFR* C677T com o risco de câncer oral. Os resultados conflitantes sobre as associações entre os polimorfismos *MTHFR* C677T e os riscos para CECO podem ocorrer devido às diferentes etnias, subtipos e exposição a dietas regionais e exposição a cancerígenos locais.

Para o polimorfismo A1298C, alguns estudos concordam com nossos resultados, incluindo um estudo de meta-análise,^{19,20,31} que mostrou a falta de associação com o risco de câncer oral. No entanto, a meta-análise demonstrou que o alelo C possui um possível papel preventivo para o câncer oral.²⁹

Em nosso estudo, o alelo de inserção *CBS* 68bp (I) não foi associado ao risco de CECO, nem com o genótipo heterozigoto (I/N) ou genótipo homozigoto polimórfico (I/I), corroborando os resultados de Gabiallti et al.,³² mas diferente dos resultados para outros tipos de tumores, como câncer de próstata e do trato gastrointestinal superior.^{33,34}

A prevalência do genótipo para o polimorfismo *MTHFR* C677T varia entre as diferentes populações humanas. Em indígenas, a frequência do genótipo TT é inferior a 1%,²⁰ enquanto nos mexicanos a frequência é superior a 30%; já em nossos controles a frequência foi de 10,8%, o que é comparável com relatos anteriores de populações chinesas e porto-riquenhas,^{27,35-37} e também de regiões do Brasil.³⁸⁻⁴⁰ As frequências do genótipo TT demonstradas em estudos com populações do Sudeste do Brasil variaram de 4,4% a 14% no estado de São Paulo.^{39,41,42} Nos controles, a prevalência dos genótipos variantes (CC) do polimorfismo *MTHFR* A1298C em nosso estudo foi de 4,9%, semelhante a estudos no Nordeste do Brasil e também em outras populações do mundo, como China, Japão, Polônia, Itália e Estados Unidos.^{19,43-48} No entanto, os resultados diferiram das frequências observadas no estado de São Paulo, com frequências de 6,1% e 8,8%.^{41,42}

Em nosso estudo, o alelo de inserção (I) de 68bp no gene *CBS* foi observado em 7,8% da população controle. Uma frequência similar (7%) foi observada na população paquistanesa⁴⁹; entretanto, as frequências alélicas foram mais altas em

outro estudo realizado em São Paulo, Brasil.³² Assim como apontado em outra pesquisa,³² em nosso estudo, o polimorfismo *CBS* 844ins68 não foi associado a características clínicas ou histopatológicas.

Conclusão

Em conclusão, os genótipos *MTHFR* C677T CT e TT foram associados ao envolvimento de linfonodos, agindo como um fator de proteção em CECO, e o genótipo *MTHFR* A1298C AC + CC foi associado à diferenciação do tumor, que pode estar vinculada a um melhor prognóstico. No entanto, os resultados precisam ser confirmados em estudos mais amplos com pacientes e controles pareados por hábito de fumar.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

ABS foi patrocinada por uma bolsa do CAPES. Agradecemos à Divisão de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia, ES, Brasil, pela ajuda com a coleta de amostras.

Referências

1. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol.* 2007;43:523-34.
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014> [acessado em 10 de maio de 2014].
3. Zhang Z, Shi Q, Liu Z, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:1188-93.
4. Kane MA. The role of folates in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Detect Prev.* 2006;29:46-53.
5. Jin F, Qu LS, Shen XZ. Association between the methylenetetra-hydrofolate reductase C677T polymorphism and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Diagn Pathol.* 2009;4:39.
6. Marcu LG, Yeoh E. A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135:1303-14.
7. Sohn KJ, Jang H, Campan M, Weisenberger DJ, Dickhout J, Wang YC, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation induces cell-specific changes in genomic DNA methylation and uracil misincorporation: a possible molecular basis for the site-specific cancer risk modification. *Int J Cancer.* 2009;124:1999-2005.
8. Frosst P, Blom HJ, Milos P, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995;10:111-3.
9. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtis Ellison R, et al. The 129XA(C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis.* 2001;156:409-15.

10. Homberger A, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquardt T, Harms E, et al. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet*. 2000;8:725-9.
11. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*. 1998;64:169-72.
12. Choi SW, Mason JB. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr*. 2002;132:2413S-8S.
13. Galbiatti AL, da Silva LM, Ruiz-Cintra MT, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino EC, et al. Association between 11 genetic polymorphisms in folate-metabolising genes and head and neck cancer risk. *Eur J Cancer*. 2012;48:1525-31.
14. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. 7th ed. UICC. Wiley-Blackwell Press; 2009.
15. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization. Classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
16. Dutta S, Sinha S, Chattopadhyay A, Gangopadhyay PK, Mukhopadhyay J, Singh M, et al. Cystathionine beta-synthase T833C/844INS68 polymorphism: a family-based study on mentally retarded children. *Behav Brain Funct*. 2005;26:1-25.
17. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosomal breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:3290-5.
18. Prasad VV, Wilkhoo H. Association of the functional polymorphism C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with colorectal, thyroid, breast, ovarian, and cervical cancers. *Onkologie*. 2011;34:422-6.
19. Tsai CW, Hsu CF, Tsai MH, Tsou YA, Hua CH, Chang WS, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotype, smoking habit, metastasis and oral cancer in Taiwan. *Anticancer Res*. 2011;31:2395-9.
20. Sailasree R, Nalinakumari KR, Sebastian P, Kannan S. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in oral cancer patients. *J Oral Pathol Med*. 2011;40:61-6.
21. Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, et al. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res*. 2002;62:4519-24.
22. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999;8:513-8.
23. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31:27-36.
24. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500:415-21.
25. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013;502:333-9.
26. Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005;63:1599-605.
27. Weinstein SJ, Gridley G, Harty LC, Diehl SR, Brown LM, Winn DM, et al. Folate intake, serum homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T genotype are not associated with oral cancer risk in Puerto Rico. *J Nutr*. 2002;132:762-7.
28. Vairaktaris E, Yapijakis C, Kessler P, Vylliotis A, Ries J, Wiltfang J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and minor increase of risk for oral cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006;132:219-22.
29. Zhuo X, Ling J, Zhou Y, Zhao H, Song Y, Tan Y. Polymorphisms of MTHFR C677T and A1298C association with oral carcinoma risk: a meta-analysis. *Cancer Invest*. 2012;30:447-52.
30. Jia J, Ma Z, Wu S. Positive association between MTHFR C677T polymorphism and oral cancer risk: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014;35:4943-8.
31. Niu YM, Shen M, Li H, Ni XB, Zhou J, Zeng XT, et al. No association between MTHFR A1298C gene polymorphism and head and neck cancer risk: a meta-analysis based on 9,952 subjects. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13:3943-7.
32. Galbiatti AL, Ruiz MT, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino-Bertelli EC, Goloni-Bertollo EM. The association between CBS 844ins68 polymorphism and head and neck squamous cell carcinoma risk - a case-control analysis. *Arch Med Sci*. 2010;6:772-9.
33. Kimura F, Franke KH, Steinhoff C, Golka K, Roemer HC, Anastasiadis AG, et al. Methyl group metabolism gene polymorphisms and susceptibility to prostatic carcinoma. *Prostate*. 2000;45:225-31.
34. 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.
35. Yang CX, Matsuo K, Ito H, Shinoda M, Hatooka S, Hirose K, et al. Gene-environment interactions between alcohol drinking and the MTHFR C677T polymorphism impact on esophageal cancer risk: results of a case-control study in Japan. *Carcinogenesis*. 2005;26:1285-90.
36. Wang Y, Guo W, He Y, Chen Z, Wen D, Zhang X, et al. Association of MTHFR C677T and SHMT(1) C1420T with susceptibility to ESCC and GCA in a high incident region of Northern China. *Cancer Causes Control*. 2007;18:143-52.
37. Gao S, Liu N, Ma Y, Ying L. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms as predictive and prognostic biomarkers in ovarian cancer risk. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13:569-73.
38. Perez AB, D'Almeida V, Vergani N, de Oliveira AC, de Lima FT, Brunoni D. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): incidence of mutations C677T and A1298C in Brazilian population and its correlation with plasma homocysteine levels in spina bifida. *Am J Med Genet A*. 2003;119:20-5.
39. Rodrigues JO, Galbiatti AL, Ruiz MT, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino-Bertelli EC, et al. Polymorphism of methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and risk of head and neck squamous cell carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76:776-82.
40. Ferreira-Fernandes H, Costa PN, Fernandes HF, Araújo-Neto AP, Motta FJ, Canalle R, et al. Prevalence of variants that confer risk for venous thromboembolism in an elderly population of northeastern Brazil. *Genet Mol Res*. 2013;12:3698-707.
41. Galbiatti AL, Ruiz MT, Rodrigues JO, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino EC, et al. Polymorphisms and haplotypes in methylenetetrahydrofolate reductase gene and head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol Biol Rep*. 2012;39:635-43.
42. Dionisio Tavares Niewiadonski V, Dos Santos Bianchi JV, de Almeida-Neto C, Gaburo N Jr, Sabino EC. Evaluation of a high throughput put method for the detection of mutations associated with thrombosis and hereditary hemochromatosis in Brazilian blood donors. *PLoS ONE*. 2015;10:e0125460.
43. de Carvalho SC, Muniz MT, Siqueira MD, Siqueira ER, Gomes AV, Silva KA, et al. Plasmatic higher levels of homocysteine in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutr J*. 2013;12:37.
44. Capaccio P, Ottaviani F, Cuccarini V, Cenzuales S, Cesana BM, Pignataro L, et al. Association between methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphisms, alcohol intake and oropharyngolaryngeal carcinoma in northern Italy. *J Laryngol Otol*. 2005;119:371-6.
45. Neumann AS, Lyons HJ, Shen H, Liu Z, Shi Q, Sturgis EM, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk

- of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. *Int J Cancer*. 2005;115:131-6.
46. Suzuki T, Matsuo K, Hasegawa Y, Hiraki A, Wakai K, Hirose K, et al. One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of head and neck squamous cell carcinoma: case-control study. *Cancer Sci*. 2007;98:1439-46.
47. Cao Y, Miao XP, Huang MY, Deng L, Liang XM, Lin DX, et al. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase are associated with a high risk of nasopharyngeal carcinoma in a smoking population from Southern China. *Mol Carcinog*. 2010;49:928-34.
48. Kruszyna L, Lianeri M, Rydzanicz M, Gajecka M, Szyfter K, Jagodziński PP. Polymorphic variants of folate metabolism genes and the risk of laryngeal cancer. *Mol Biol Rep*. 2010;37:241-7.
49. Yakub M, Moti N, Parveen S, Chaudhry B, Azam I, Iqbal MP. Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS genes and homocysteine levels in a Pakistani population. *PLoS ONE*. 2012;7:e33222.