



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultade de Medicina e Odontoloxía

Departamento de Psiquiatría, Radioloxía e Saúde Pública

**LA GLUTATHION S-TRANSFERASA M1, EL
CITOCROMO P450 1A1 Y LA EPÓXIDO HIDROLASA
COMO BIOMARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS DE
SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA DE LOS CÁNCERES DE
OROFARINGE.**

Memoria que, para optar al
grado de Doctor, presenta la
Licenciada en Farmacia,
Dña. Leonor Varela Lema.

Juan Miguel Barros Dios, Profesor Titular de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Santiago de Compostela y Alberto Ruano Raviña, Profesor Asociado de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMAN:

Que el trabajo titulado *“La glutathion S-transferasa M1, el citocromo P450 1A1 y la epóxido hidrolasa como biomarcadores epidemiológicos de susceptibilidad genética de los cánceres de orofaringe”*, que presenta la Licenciada en Farmacia Dña. **Leonor Varela Lema** para optar al Grado de Doctor, fue realizado bajo nuestra dirección, y que reúne los requisitos, una vez concluido, para su presentación con el fin de que pueda ser juzgado por el Tribunal correspondiente. Lo que firmamos en Santiago de Compostela a 9 de enero de 2009.

AGRADECIMIENTOS

Dedico esta tesis a mi marido y a mis hijos, por haber estado a mi lado en todo momento. Sin su cariño nunca habría sido posible la finalización de este proyecto.

Deseo expresar mi agradecimiento a mis directores Dr. Juan Barros Dios y Dr. Alberto Ruano Raviña, por su paciencia, constante apoyo y valiosa ayuda en la elaboración de esta tesis, así como por la confianza depositada en mi. Al Dr. Alberto Ruano le quiero agradecer especialmente el haber sido un excelente compañero y haberme animado a seguir adelante con la tesis durante todos estos años, incluso en los momentos en los que yo perdía la fé.

Quiero agradecer a la Dra. Lourdes Loidi y al personal del laboratorio de Medicina Molecular del CHUS su dedicación, asesoramiento y tiempo invertido en este trabajo. Agradecer también al departamento de Antropología de la Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela la ayuda prestada.

Finalmente, un especial agradecimiento a mis padres por los diversos apoyos y por enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son los caminos para lograr los objetivos.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	13
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE CAVIDAD ORAL Y FARINGE	17
1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE CAVIDAD ORAL Y FARINGE	18
1.2.1. Incidencia	18
1.2.2. Prevalencia	24
1.2.3. Mortalidad	27
1.2.4. Supervivencia	33
1.3. FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER ORAL Y DE FARINGE	34
1.3.1. Tabaco.	34
1.3.2. Alcohol	43
1.3.3. Dieta	50
1.3.4. Estado bucal y utilización de enjuague bucal	52
1.3.5. Ocupación	52
1.3.6. Papilomavirus humano (HPV)	53
1.3.7. Otros factores de riesgo	53
1.4. ETAPAS EN LA CARCINÓGENESIS DEL CÁNCER DE CAVIDAD ORAL Y FARINGE.	54
1.5. ENZIMAS DE “FASE I” Y “FASE II” EN LA CARCINOGENESIS	57
1.5.1. CITOCROMOS P450	58
1.5.1.1. Antecedentes	58
1.5.1.2. CYPs y activación de sustancias precancerígenas	59
1.5.1.3. Citocromo P4501A1	63
✓ <i>Mecanismo de activación e inducción</i>	63
✓ <i>Polimorfismos genéticos del CYP1A1</i>	65
✓ <i>Correlación de los distintos polimorfismos del CYP1A1 con la capacidad de inducción, actividad enzimática y biomarcadores de efecto.</i>	65
1.5.2. GLUTATION S-TRANSFERASAS (GST)	67
1.5.2.1. Antecedentes	67
1.5.2.2. GST y detoxificación de sustancias cancerígenas.	68
1.5.2.3. Mecanismos de activación e inducción de las GST.	71
✓ <i>Polimorfismos genéticos de la GSTM1</i>	74
✓ <i>Relación entre los polimorfismos de la GSTM1 y distintos biomarcadores de efecto.</i>	74
1.5.3. EPÓXIDO HIDROLASAS (EH)	76
1.5.3.1. Antecedentes y Nomenclatura	76
1.5.3.2. Detoxificación de sustancias cancerígenas en humanos.	77
1.5.3.3. Polimorfismos genéticos de las epóxido hidrolasas microsomales	78
✓ <i>Correlación entre los polimorfismos de la mEH y la actividad enzimática “in vivo”.</i>	80
1.5.4. Otras enzimas potencialmente relevantes en el cáncer de cavidad oral y faringe	81
1.6. REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS GSTM1 (ALELO NULO), CYP1A1 (ILE/VAL) Y EPÓXIDO HIDROLASA (EXÓN 4 HIS 139 ARG) CON EL CÁNCER DE CAVIDAD ORAL Y FARINGE: META Y POOLED ANÁLISIS	83
1.6.2. Resultados	84
✓ <i>Frecuencia de los polimorfismos</i>	84
✓ <i>Meta-análisis</i>	85
✓ <i>Pooled análisis</i>	88
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	109
2.1. HIPÓTESIS	109

2.2. OBJETIVOS	110
3. SUJETOS Y MÉTODOS	113
3.1. DISEÑO	113
3.2. SELECCIÓN Y RECOGIDA DE CASOS	113
3.3. SELECCIÓN Y RECOGIDA DE CONTROLES	114
3.5. RECOGIDA DE INFORMACIÓN	116
3.6. DESCRIPCIÓN Y DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES	117
3.7. MÉTODOS DE LABORATORIO.	121
√ <i>Obtención y extracción de ADN</i>	121
√ <i>Determinación de los polimorfismos genéticos</i>	124
3.8. ANÁLISIS DE DATOS	130
√ <i>Análisis univariante</i>	130
√ <i>Análisis bivariante</i>	130
√ <i>Análisis multivariante</i>	131
4. RESULTADOS.	135
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO	135
4.2. DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS	137
4.3. TABACO	139
4.3.1. Características del consumo de tabaco	139
4.3.2. Asociación entre el tabaco y el cáncer de cavidad oral y faringe	139
4.4. ALCOHOL	145
4.4.1. Características del consumo de alcohol	145
4.4.2. Asociación entre el alcohol y el cáncer de cavidad oral y faringe	146
4.5. POLIMORFISMOS DE LA GSTM1 (ALELO NULO), CYP1A1 (ILE/VAL) Y MEH EXÓN 4 (139 ARG→HIS) Y SU ASOCIACIÓN CON EL CÁNCER DE LA CAVIDAD ORAL Y DE FARINGE	150
4.5.1. Características de la población sometida a la determinación genotípica	150
4.5.2. Asociación entre los polimorfismos genéticos de la GSTM1 (alelo nulo), CYP1A1 (Ile/Val) y meH (exón 4) y el riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe.	152
5. DISCUSIÓN	159
5.1. DISCUSIÓN DE LA HIPÓTESIS A ESTUDIO	159
5.2. DISCUSIÓN DEL MÉTODO	160
5.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	163
5.3.1. Tabaco	163
5.3.2. Alcohol	167
5.3.3. Polimorfismos genéticos	169
6. CONCLUSIONES	177
7. BIBLIOGRAFÍA	181
8. ANEXOS	207
ANEXO I. DESCRIPCIÓN DE LOS ESTUDIOS INCLUIDOS Y EXCLUIDOS EN EL META-ANÁLISIS	207
ANEXO II. FORMULARIO DE RECOGIDA DE DATOS	225
ANEXO III. ARTÍCULO DE REVISIÓN SISTEMÁTICA-META Y POOLED ANÁLISIS	227
ANEXO IV. ARTÍCULO SOBRE EL TABACO	229
ANEXO V. ARTÍCULO SOBRE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS	231

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasas de incidencia del cáncer de la cavidad oral a nivel mundial (GLOBOCAN 2002)...	21
Figura 2. Tasas de incidencia del cáncer de faringe a nivel mundial (GLOBOCAN 2002)	22
Figura 3. Mapas de la distribución mundial del cáncer de cavidad oral y faringe en hombres.....	23
Figura 4. Prevalencia del cáncer oral en España	24
Figura 5. Prevalencia del cáncer oral en los distintos países europeos.....	26
Figura 6. Prevalencia del cáncer de faringe en los distintos países europeos.....	27
Figura 7. Mortalidad por cáncer de la cavidad bucal y faringe en España (Hombres).....	28
Figura 8. Mortalidad por cáncer de cavidad bucal y faringe en mujeres.....	29
Figura 9. Evolución del COF en España y Galicia ⁶	30
Figura 10. Mapa mundial de la mortalidad por COF en hombres.....	31
Figura 11. Evolución de la mortalidad por COF en Europa	33
Figura 12. Mecanismos de la carcinogénesis ⁸⁴	55
Figura 13. Diagrama de los diferentes tipos de polimorfismos genéticos que condicionan el funcionamiento anormal de las enzimas.....	58
Figura 14. Mecanismo de activación del benzo[a]pireno.....	60
Figura 15. Conversión del 4-aminobifenil en un intermediario carcinogénico.....	61
Figura 16. Mecanismo de activación de la N-nitrosodimetilamina.....	62
Figura 17. Etapas en la activación e inducción de los CYP 1A1 y CYP1A2.....	64
Figura 18. Estructura del gen P4501A1 humano y localización de los polimorfismos genéticos.....	65
Figura 19. Desactivación del benzo[a]pireno por parte de la GST	70
Figura 20. Distintas etapas en la activación e inducción de la GST.....	73

Índice de figuras

Figura 21. Distintas vías de metabolización del benzo[a]pireno por parte de los citocromo P450 y la epóxido hidrolasa.....	79
Figura 22. Distribución de los niveles de estudios entre los casos y los controles.....	136
Figura 23. Diagrama box-plot del consumo de tabaco y alcohol entre los casos y los controles	136
Figura 24. Distribución de las ocupaciones de alto riesgo entre los casos y os controles	137
Figura 25. Distribución de los tumores según localización (n; %).....	137

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tasas ajustadas, con la población europea, de incidencia de COF de los diferentes registros poblacionales españoles.....	19
Tabla 2. Resumen de los estudios que investigan la asociación entre el tabaco y el cáncer de cavidad oral y faringe.	37
Tabla 3. Principales sustancias carcinogénicas encontradas en el humo de tabaco.	42
Tabla 4. Resumen de los estudios que investigan la asociación entre el tabaco y el cáncer de cavidad oral y faringe.	44
Tabla 5. Resumen de los principales estudios que investigan la asociación entre el alcohol y el cáncer de cavidad oral y faringe.....	46
Tabla 6. Principales mecanismos carcinogénicos de acción del alcohol	49
Tabla 7. Isoenzimas responsables de la detoxificación de distintas sustancias potencialmente cancerígenas en humanos y ratas ¹¹⁵	69
Tabla 8. Polimorfismos de la mEH y predicción de actividad.	80
Tabla 9. Descripción de los estudios incluidos en el meta-análisis para los polimorfismos GSTM1	92
Tabla 10. Descripción de los estudios incluidos en el <i>meta-análisis</i> para evaluar los polimorfismos CYP1A1 (exón 7).....	94
Tabla 11. Descripción de los estudios incluidos en el <i>meta-análisis</i> para evaluar los polimorfismos CYP1A1 (msp1)	95
Tabla 12. Descripción de los estudios incluidos en el <i>meta-análisis</i> que evalúan la interacción GSTM1-CYP1A1	96
Tabla 13. OR global y estratificado de la asociación entre la delección GSTM1 y COF- <i>Pooled análisis</i>	97
Tabla 14. Odds Ratio global y estratificado de la asociación entre la mutación CYP1A1 (<i>msp1</i>) y COF.....	99
Tabla 15. Odds Ratio global y estratificado de la asociación entre la mutación CYP1A1 (exón7) y el cáncer de cavidad oral y faringe- <i>Pooled análisis</i>	101
Tabla 16. Asociación de los polimorfismos GSTM1 y CYP1A1 y el cáncer de cavidad oral y faringe según la localización del tumor- <i>Pooled análisis</i>	103

Índice de tablas

Tabla 17. Riesgo global y estratificado de la asociación entre los polimorfismos GSTM1/CYP1A1 (<i>msp1</i>) con el cáncer de cavidad oral y faringe- <i>Pooled análisis</i>	104
Tabla 18. Variables originales y variables recodificadas.....	120
Tabla 19. Principales características de los sujetos a estudio.	135
Tabla 20. Localizaciones de los tumores de cavidad oral y faringe.....	138
Tabla 21. Principales características de los sujetos en cuanto al consumo de tabaco.	139
Tabla 22. Riesgo del cáncer de la cavidad oral según el estado de fumador y tipo de tabaco.	140
Tabla 23. Riesgo de cavidad oral y faringe en relación a la cantidad fumada, duración del hábito y consumo acumulado a lo largo de la vida (paquetes año).....	143
Tabla 24. Asociación entre los años del cese del hábito tabáquico, edad de inicio y el cáncer de cavidad oral y faringe.....	144
Tabla 25. Características del consumo de alcohol.....	145
Tabla 26. Riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe en función del tipo de consumo	146
Tabla 27. Riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe en función de la cantidad de bebida consumida a la semana.....	147
Tabla 28. Riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe en función del consumo alcohólico	148
Tabla 29. Riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe en función de la clase de bebida.	148
Tabla 30. Interacción entre el tabaco y el alcohol.....	149
Tabla 31. Descripción de las características de los sujetos sometidos a determinación genotípica.	150
Tabla 32. Descripción de las frecuencias de los polimorfismos.....	151
Tabla 33. Asociación entre los polimorfismos genéticos de la GSTM1 (alelo nulo), CYP1A1 (Ile/Val) y mEH exón 4 y el riesgo de cavidad oral y faringe.....	152
Tabla 34. Riesgo asociado a los diferentes polimorfismos estratificados por categorías de consumo de tabaco.....	154
Tabla 35. Riesgos para los diferentes polimorfismos estratificados por consumo alcohólico.	155
Tabla 36. Interacción entre los polimorfismos mEH y GSTM1 y el cáncer de orofaringe.....	156

LISTA DE ABREVIATURAS

AD: aldehido dehidrogenasas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARG: arginina

CCAA: Comunidad Autónoma

CIG: cigarrillos

CNE: Centro Nacional de Epidemiología

COF: cáncer de cavidad oral y faringe

CYP: genes del citocromo P450

EEUU: Estados Unidos

EH: epóxido hidrolasa

GST: glutathion-S-transferasas

HIS: histidina

HPV: papilomavirus humano

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

IC: intervalo de confianza

ILE: isoleucina

MN: micronúcleos

NAT: N-acetil transferasas

OR: razón de odds

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAH: hidrocarburos aromáticos policíclicos

PB: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RPM: revoluciones por minuto

SEER: Surveillance Epidemiology and End Results

SCE: intercambio de cromátides hermanas

UBE: unidad de bebida estándar

VAL: valina

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de cavidad oral y faringe (COF) comprende genéricamente muchas localizaciones anatómicas diferentes y se engloba dentro de los tumores de cabeza y cuello, que constituyen todos los tumores que afectan a la región de la cabeza y cuello (tumores de la cavidad nasal, senos paranasales, cavidad bucal, labios, glándulas salivares, faringe, laringe y cuello). Parte de estos tumores también forman parte de los denominados tumores del tracto respiratorio superior, que incluyen las localizaciones de la nariz, cavidad oral, faringe, laringe y tráquea. Aunque muchos estudios evalúan estos tumores de forma conjunta se reconoce que los factores de riesgo pueden ser diferentes según las localizaciones. En el presente trabajo de investigación se evaluará específicamente el cáncer de cavidad oral y faringe, excluyendo el labio. A continuación se describe la clasificación de este tipo de cáncer.

1.1. Clasificación del cáncer de cavidad oral y faringe

Según la décima edición de la “*Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas relacionados con la Salud*” (CIE-10) editada por la Organización Mundial de la Salud, el cáncer de cavidad oral y de faringe comprende las localizaciones C00-C14¹:

Cáncer de la cavidad oral:

C00- Tumor maligno de labio

C01- Tumor maligno de la base de la lengua

C02- Tumor maligno de otras partes y de las no especificadas de la lengua

C03- Tumor maligno de la encía

C04- Tumor maligno del piso de la boca

C05- Tumor maligno del paladar

C06- Tumor maligno de la mucosa de la mejilla

C07- Tumor maligno de la glándula parótida

C08- Tumor maligno de otras glándulas salivales y de las no especificadas

Cáncer de faringe:

C09- Tumor maligno de la amígdala

C10- Tumor maligno de la orofaringe

C11- Tumor maligno de la nasofaringe

C12- Tumor maligno del seno piriforme

C13- Tumor maligno de la hipofaringe

C14- Tumor maligno de la faringe, parte no especificada

1.2. Epidemiología del cáncer de cavidad oral y faringe

El cáncer de cavidad oral y faringe representa un importante problema de salud a nivel mundial. Según los datos de GLOBOCAN 2002, proporcionados por la IARC (International Agency for Research on Cancer)² se estiman 484.628 casos nuevos de cáncer de cavidad oral y faringe en todo el mundo y 261.784 muertes anuales por esta patología. La tasa de incidencia y prevalencia de estos tumores es el doble en hombres que mujeres y afectan fundamentalmente a países de la Melanesia, Asia Central y a algunos países europeos, aunque las distribuciones varían dependiendo del sexo y de la localización del tumor.

1.2.1. Incidencia

✓ *España*

En España, el cáncer de la cavidad oral es el sexto tumor que aparece con más frecuencia en la población masculina². Según los datos proporcionados por la IARC (GLOBOCAN 2002) se estiman 4.036 casos nuevos de cáncer oral y 2.353

casos de faringe en hombres, lo que conforma el 6,5% de todos los cánceres nuevos que aparecen en este sexo. Datos de la Unión Europea de 1998 estimaban 31,71 casos nuevos/100.000 en hombres y 3,89/100.000 en mujeres (tasas estandarizadas por la población europea)³.

Dentro de nuestro país, los datos de algunos registros poblacionales españoles disponibles ponen de manifiesto importantes diferencias en las tasas de incidencia de cáncer de cavidad bucal y faringe para las distintas regiones y provincias evaluadas. Mientras que ciertas provincias como Zaragoza, Girona y Navarra no superan los 25 casos/100.000 habitantes en hombres, otras como el País Vasco alcanzan los 40 casos/100.000 habitantes (tasas ajustadas a la población europea)⁴. Aunque son pocos los registros existentes de forma general parece apreciarse un aumento en la incidencia de estos tumores.

Tabla 1. Tasas ajustadas, con la población europea, de incidencia de COF de los diferentes registros poblacionales españoles

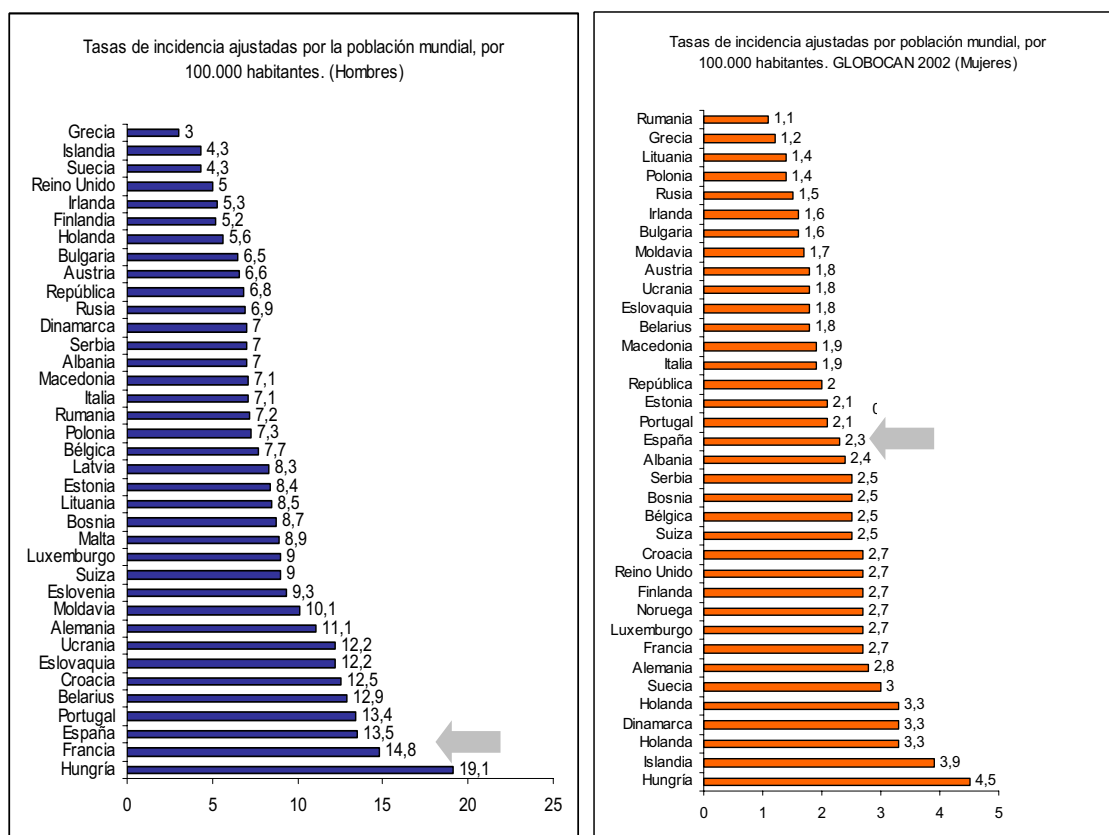
Provincia	Año del registro	Tasas de incidencia	
		Hombres	Mujeres
Albacete	1993-1997	29,39	3,24
Cuenca	1993-1997	28,32	3,74
Girona	1994-1997	23,82	3,09
Granada	1993-1997	32,27	3,05
Murcia	1993-1996	27,38	3,90
Navarra	1993-1997	25,95	3,54
Asturias	1992-1995	26,23	3,37
Canarias	1993-1995	35,50	4,36
Tarragona	1993-1997	25,40	3,34
Zaragoza	1991-1995	23,52	2,66
País Vasco	1988-1991	40,37	3,38

✓ *Comparaciones internacionales*

Dentro de Europa se estima que en el 2006 aparecieron 78 500 casos nuevos de cáncer de la cavidad oral y faringe (4,6% del total de nuevos cánceres diagnosticados dentro de Europa)⁵.

En hombres, el cáncer de cavidad oral es el octavo tumor más incidente a nivel mundial, siendo éste responsable del 3% de los nuevos cánceres diagnosticados en este sexo². Las tasas de incidencia (estandarizadas por la población mundial) más altas se observan en Nueva Guinea (40,9 casos nuevos/100.000 habitantes) e islas Salomón (34,1 casos nuevos/100.000 habitantes). A continuación se sitúan ciertos países europeos y Sri Lanka pero con valores inferiores a 20 casos/100.000 habitantes. En mujeres, sobresalen igualmente Nueva Guinea e Islas Salomón y ciertos países de Asia (Bangladesh y Pakistán) pero con tasas de incidencia inferiores a 30 casos/100.000 habitantes.

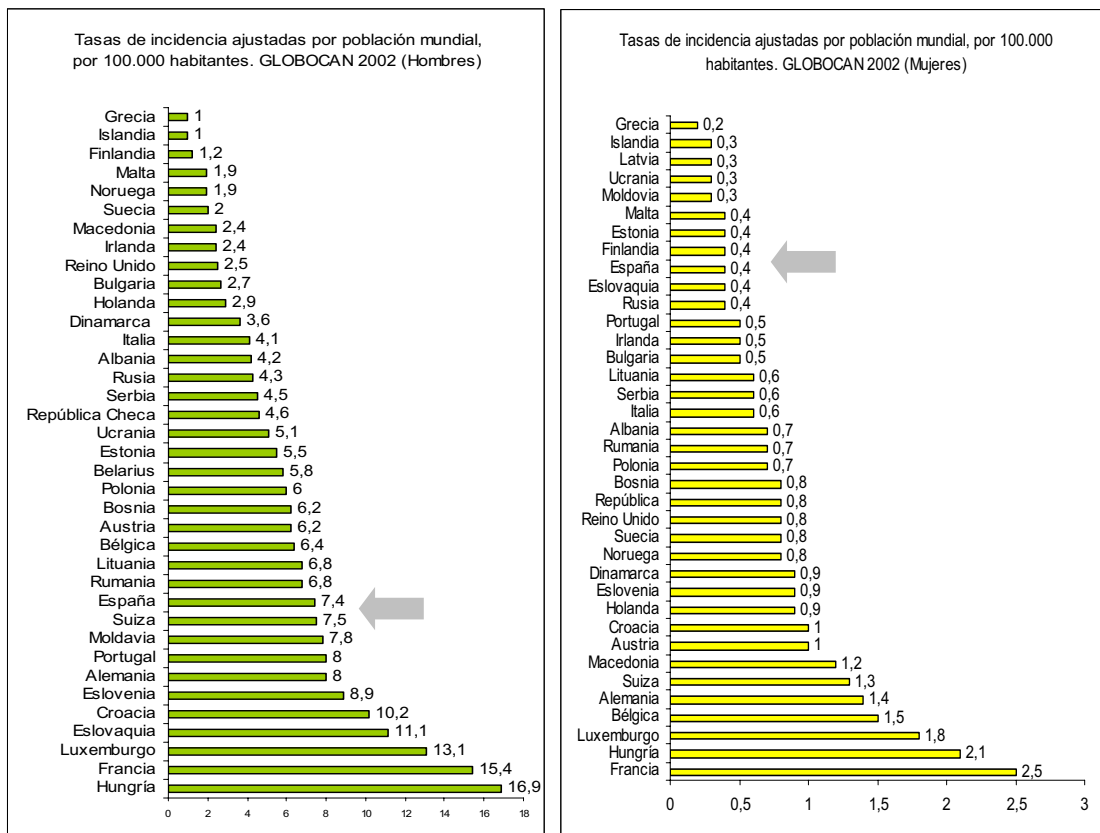
Dentro de Europa, las tasas más elevadas de cáncer de la cavidad oral se observan en los países del Oeste y Sur². España es, después de Hungría y Francia el tercer país europeo con más incidencia de casos de cáncer de la cavidad oral en este sexo. Entre los países con menores tasas de incidencia destaca Grecia, seguida por varios países del Norte (Islandia, Suecia, Reino Unido, Finlandia y Holanda), todos ellos con cifras inferiores a los 6 casos/100.000 habitantes. En mujeres europeas, los tumores de la cavidad oral son raros y no superan los 5 casos nuevos/100.000 habitantes. Con la excepción de Hungría, el patrón de distribución geográfica es inverso al observado en los hombres. Los valores más altos de incidencia se presentan en los países del Norte y Oeste de Europa y los más bajos en los países del Este (ver figura 1).

Figura 1. Tasas de incidencia del cáncer de la cavidad oral a nivel mundial (GLOBOCAN 2002)

En cuanto a los tumores de faringe (sin incluir la nasofaringe) se puede observar que en hombres las incidencias más altas se presentan igualmente en los países europeos y Asia Central pero las tasas de incidencia (estandarizadas por la población mundial) halladas son inferiores a 16,9. Profundizando en los datos europeos se aprecia un patrón de distribución geográfica similar al observado en relación al cáncer de cavidad oral, encontrándose las tasas más elevadas en los países del Oeste y Sur de Europa y las más bajas en los países del Norte. Destacan una vez más países como Hungría, Francia y Luxemburgo, con tasas de incidencia que duplican las de la mayoría de los países Europeos. España está entre los primeros 15 países con mayores tasas de incidencia (7,4 casos nuevos/100.000). En mujeres se observa el mismo patrón de distribución pero estas últimas presentan

valores inferiores a 2,5 casos nuevos/100.000. En España, las incidencias para estos tumores en mujeres son muy bajas².

Figura 2. Tasas de incidencia del cáncer de faringe a nivel mundial (GLOBOCAN 2002)

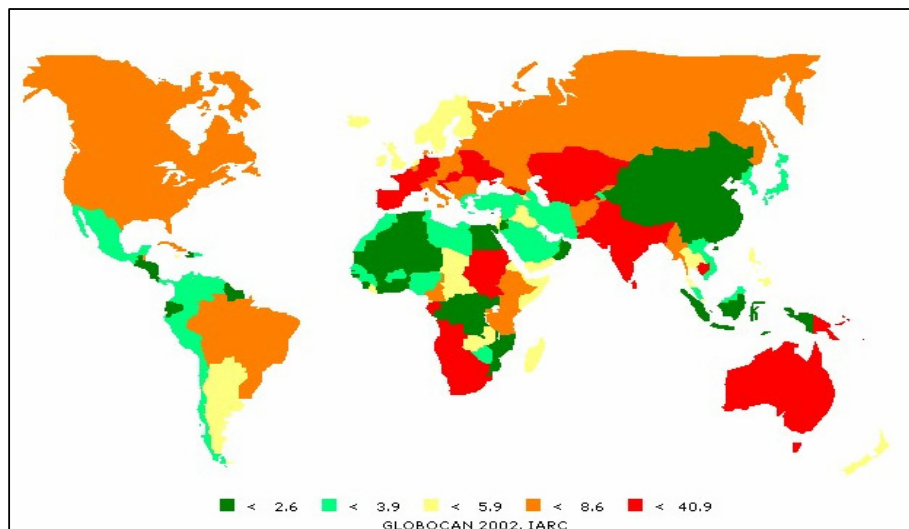


En la figura 3 se puede observar un mapa en el que se representan las tasas de incidencia mundiales para el cáncer de cavidad oral y faringe.

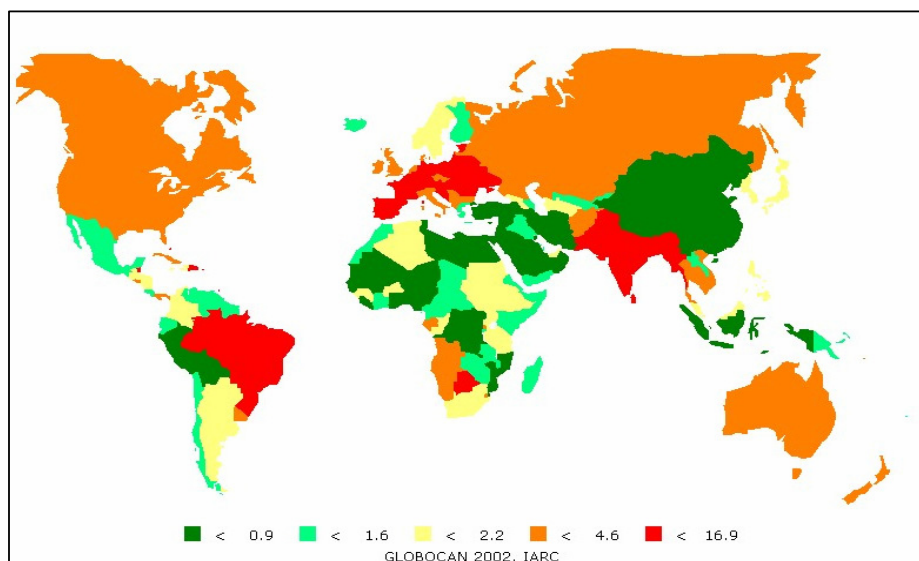
Figura 3. Mapas de la distribución mundial del cáncer de cavidad oral y faringe en hombres.

Tasas de incidencia andarizadas por la población mundial por 100.000 habitantes

CAVIDAD ORAL (C00-C08)



FARINGE (C09, C10, C12-C14)



Los tumores de nasofaringe muestran tasas de incidencia similares a las de faringe en los países de Asia Central, pero en Europa las tasas de incidencia son muy bajas e inferiores a 1,7 casos nuevos/100.000 habitantes. En mujeres, los tumores de

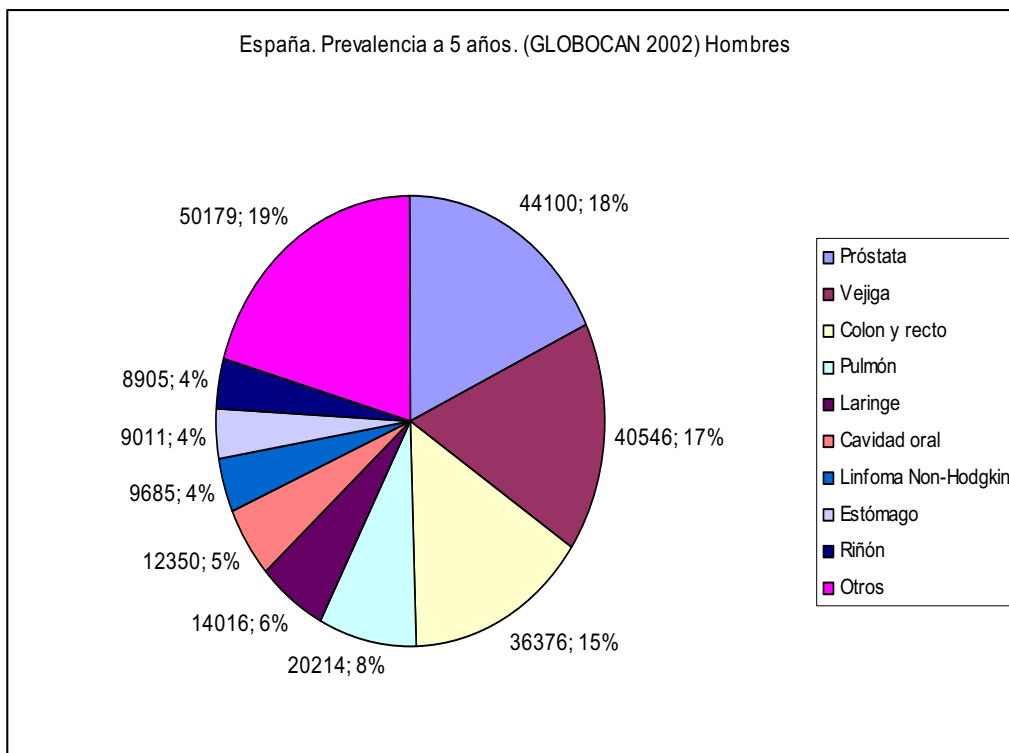
nasofaringe son muy raros y se presentan casi exclusivamente en algunos países de Asia Central².

1.2.2. Prevalencia

✓ España

En España, el cáncer oral es el sexto tumor más prevalente y en hombres es responsable del 5% de todos los casos de cáncer que existen en este sexo (ver figura 4)². Según datos de la IARC (GLOBOCAN 2002) se estiman en nuestro país 3.524 casos a 1 año y 12.350 casos a 5 años. En mujeres la prevalencia estimada es muy inferior, estimándose 821 y 3.136 casos a 1 y 5 años, respectivamente.

Figura 4. Prevalencia del cáncer oral en España



Respecto al cáncer de faringe, según los datos de la IARC los hombres presentan una prevalencia a 5 años de 4.653 casos y las mujeres una prevalencia de 352 casos.

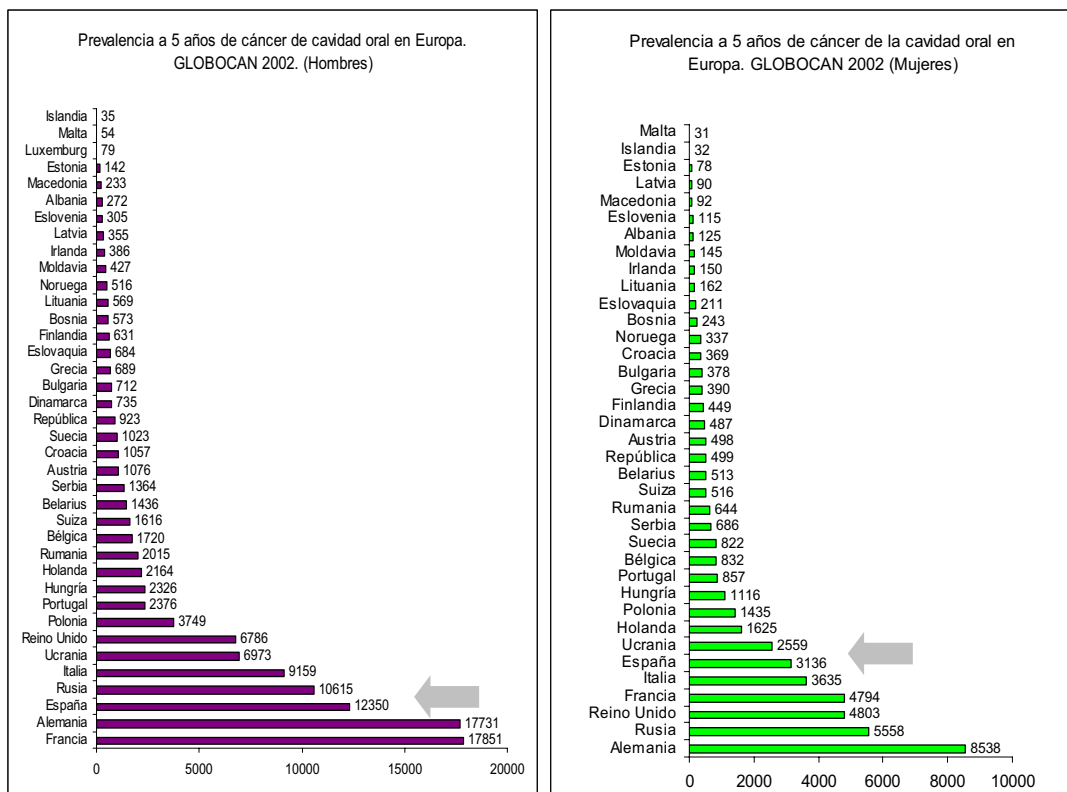
Los datos de la mortalidad y prevalencia de la Unión Europea para 1998 (EUCAN) ponían de manifiesto una prevalencia de 5.284 casos a 1 año y 22.202 casos a 5 años para la totalidad de tumores de la cavidad bucal y faringe.

✓ *Comparaciones internacionales*

A nivel mundial el cáncer oral, es al igual que en España, el sexto tumor más prevalente en hombres y representa el 4% de todos los tumores que se producen en este sexo. Según los datos de la IARC para el 2002 se estiman en hombres 466.683 casos a 5 años². Es una enfermedad que prevalece sobre todo en determinados países de Asia Central, Norteamérica y Oeste de Europa. Despuntan la India y Estados Unidos con 127.573 y 51.654 casos prevalentes a 5 años. Analizando los datos europeos observamos que según los datos de incidencia, los países del Oeste, Este y Sur de Europa presentan más enfermedad de cáncer oral y los del Norte menor prevalencia. España es, después de Francia y Alemania, el tercer país con mayor prevalencia de cáncer de la cavidad oral (ver figura 5).

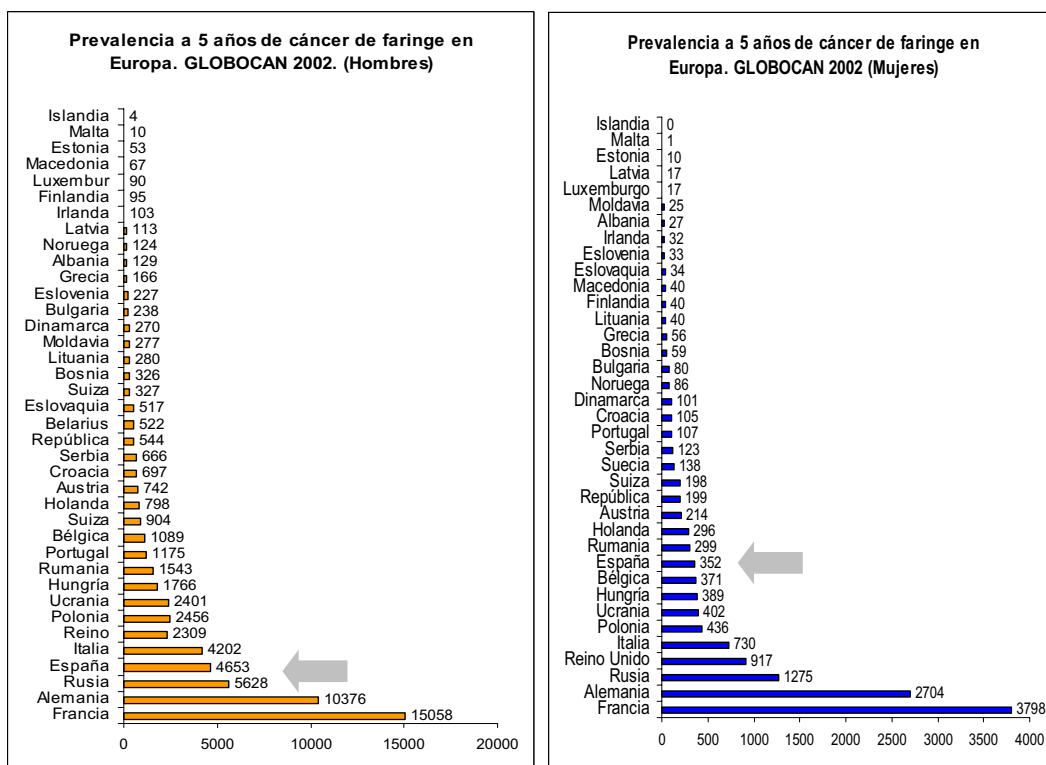
En mujeres se estiman 273.356 casos de la cavidad oral a nivel mundial². Al igual que ocurría en hombres, las prevalencias más altas se presentan en la India y EEUU pero los valores son aproximadamente la mitad de los observados en el anterior sexo (77.170 y 27.625 casos a 5 años, respectivamente). De forma general, se puede decir que en Europa la prevalencia es baja ya que sólo 10 de los 37 países que presentan datos superan los 1.000 casos a 5 años. Son excepciones países como Alemania, Rusia, Reino Unido, Francia, Italia y España con valores que superan a los 3.000 casos a 5 años (ver figura 5).

Figura 5. Prevalencia del cáncer oral en los distintos países europeos.



El patrón de distribución geográfica del cáncer de faringe es similar al observado en relación al cáncer de la cavidad oral para ambos sexos, aunque la prevalencia en la mayoría de los países es significativamente inferior. A nivel mundial destacan igualmente la India y Estados Unidos con 70.384 y 22.021 casos prevalentes a 5 años en hombres y 14.558 y 5.438 casos a 5 años en mujeres. En Europa, despuntan claramente Francia y Alemania con prevalencias muy superiores al resto de los países de su entorno (ver figura 6). En mujeres estos tumores son casi exclusivos de estos anteriores países, Rusia, Reino Unido e Italia. En los países restantes las prevalencias a 5 años son inferiores a 500 casos. Esta enfermedad es prácticamente inexistente en los países del Norte de Europa².

Figura 6. Prevalencia del cáncer de faringe en los distintos países europeos.



1.2.3. Mortalidad

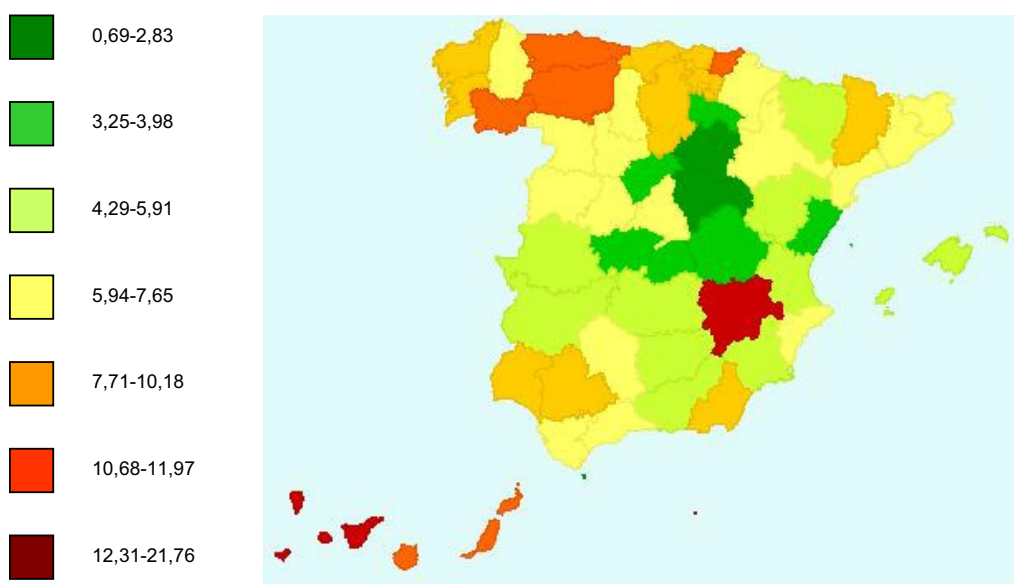
✓ España

Según los datos más recientes proporcionados por el proyecto Cáncer en Cifras⁶, financiado por el Centro Nacional de Epidemiología (CNE), el cáncer de cavidad bucal y faringe (sin incluir tumores de labio y nasofaringe) fue en 2006 responsable de 1.730 fallecimientos en hombres y 412 defunciones en mujeres. La edad promedio al fallecimiento fue de 63,71 y 68,14 años, respectivamente. La tasa de mortalidad (estandarizada por edad y por población europea) fue de 7,34 y 1,24 muertes/100.000 habitantes. Datos del CNE⁷ para el 2005 atribuyen a estos tumores 14.144,78 años potenciales de vida perdidos, lo que equivale al 1,65% del total de años potenciales de vida perdidos por todas las causas de muerte. En

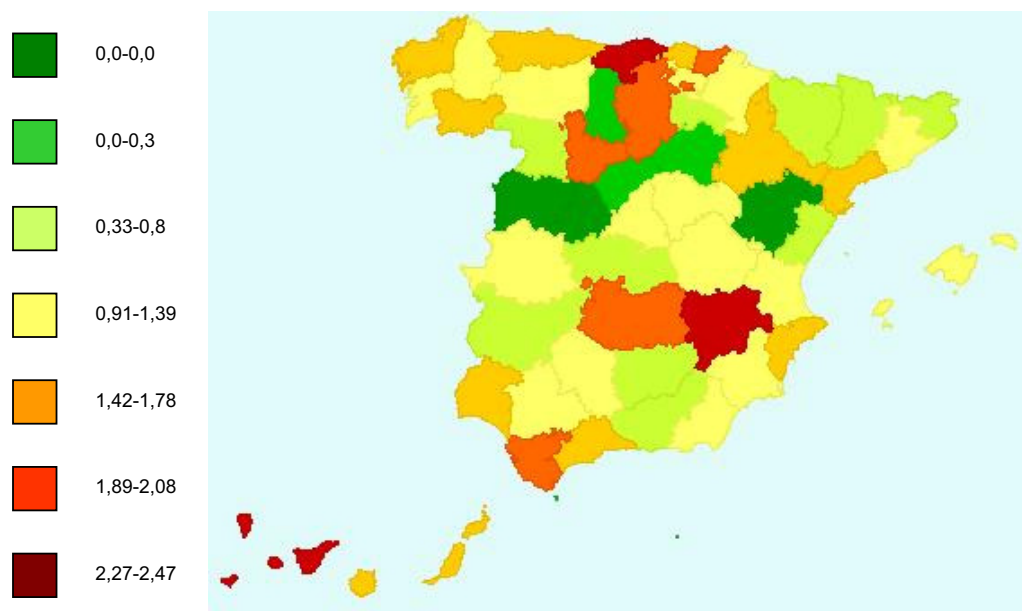
mujeres se atribuyen a estos tumores 2.628,6 años potenciales de vida perdidos, valor equivalente al 0,72% del total de años de vida perdidos por todas las causas.

En hombres, las tasas de mortalidad más elevadas se observan en Melilla (21,76 muertes/100.000 habitantes) seguida de Canarias, Albacete y ciertas provincias de las comunidades del Norte de España (Asturias, León, Galicia y País Vasco), con tasas que ligeramente superan las 10 muertes/100.000 habitantes⁶ (ver figura 7). Dentro de Galicia las provincias de Orense y La Coruña son las que presentan las mayores tasas de mortalidad (11,28 y 9,94 muertes/100.000 habitantes)⁶.

Figura 7. Mortalidad por cáncer de la cavidad bucal y faringe en España (Hombres).

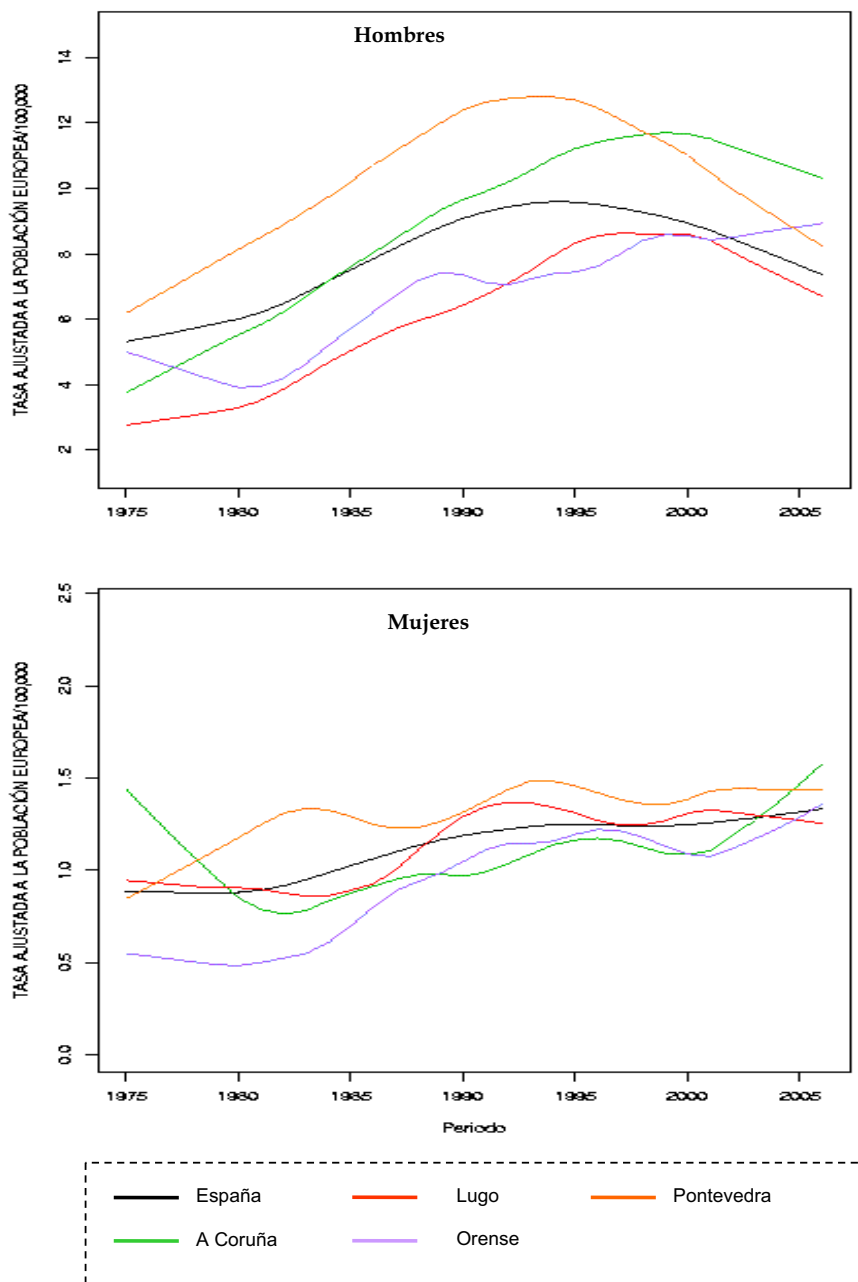


En mujeres las tasas de mortalidad del cáncer de cavidad bucal y faringe ajustadas a la población europea son ≤ 2 muertes/100.000 habitantes en todas las provincias, exceptuando Santander, Tenerife y Albacete. Las tasas de mortalidad son en todos los casos inferiores a 3 muertes/100.000 habitantes (ver figura 8).

Figura 8. Mortalidad por cáncer de cavidad bucal y faringe en mujeres.

En cuanto a la evolución temporal de la enfermedad se puede observar que la tendencia es la misma para Galicia que para el resto de España (ver figura 9). Según los datos del CNE⁷ y los datos presentados en el proyecto Cáncer en Cifras⁶, la mortalidad en hombres aumentó bruscamente durante los años 80, se mantuvo ligeramente constante durante la década de los 90 y muestra una clara tendencia a la baja en los últimos 10 años. En mujeres el patrón es muy diferente, observándose un aumento en todas las provincias a partir de 1985.

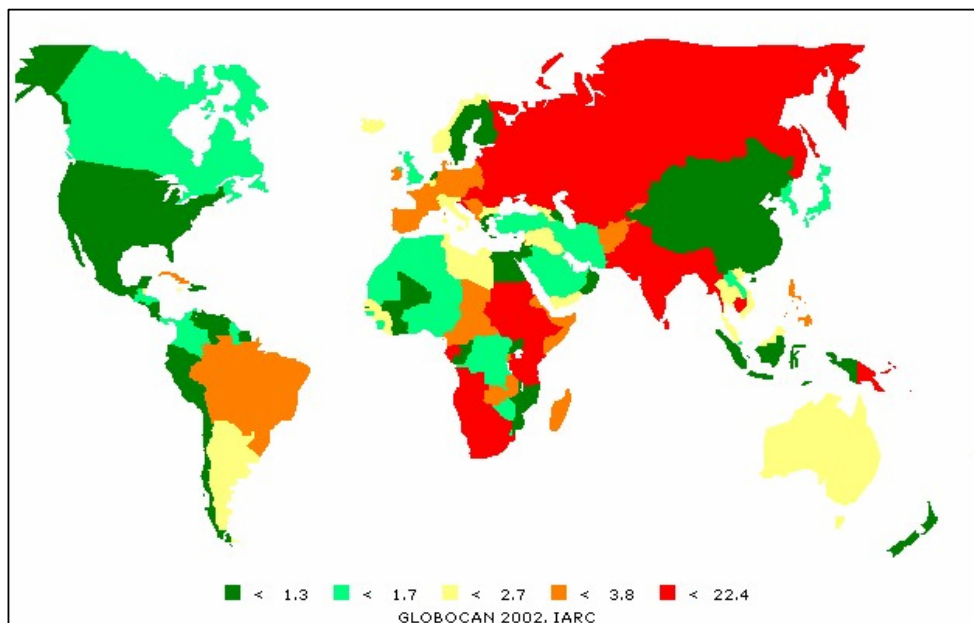
Figura 9. Evolución del COF en España y Galicia⁶



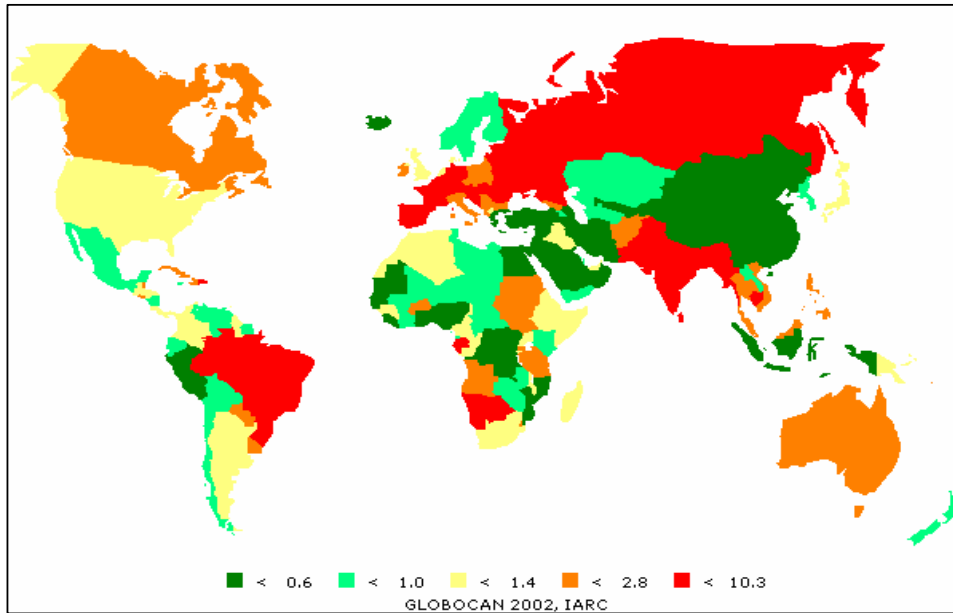
✓ *Comparaciones internacionales*

A pesar de que España se encuentra entre los países con mayores tasas de incidencia y prevalencia para los cánceres de cavidad oral y faringe en hombres, las tasas de mortalidad son muy inferiores a las encontradas en los países asiáticos y en los de Europa del Este². De forma general, se puede afirmar que la mortalidad es similar a la hallada en otros países del Sur y Oeste de Europa, pero elevada en relación a la de Estados Unidos y a la de países del Norte de Europa como Reino Unido, Finlandia, Islandia y Suecia (ver figura 10).

Figura 10. Mapa mundial de la mortalidad por COF en hombres.
(Tasas de mortalidad estandarizadas por 100.000 habitantes)

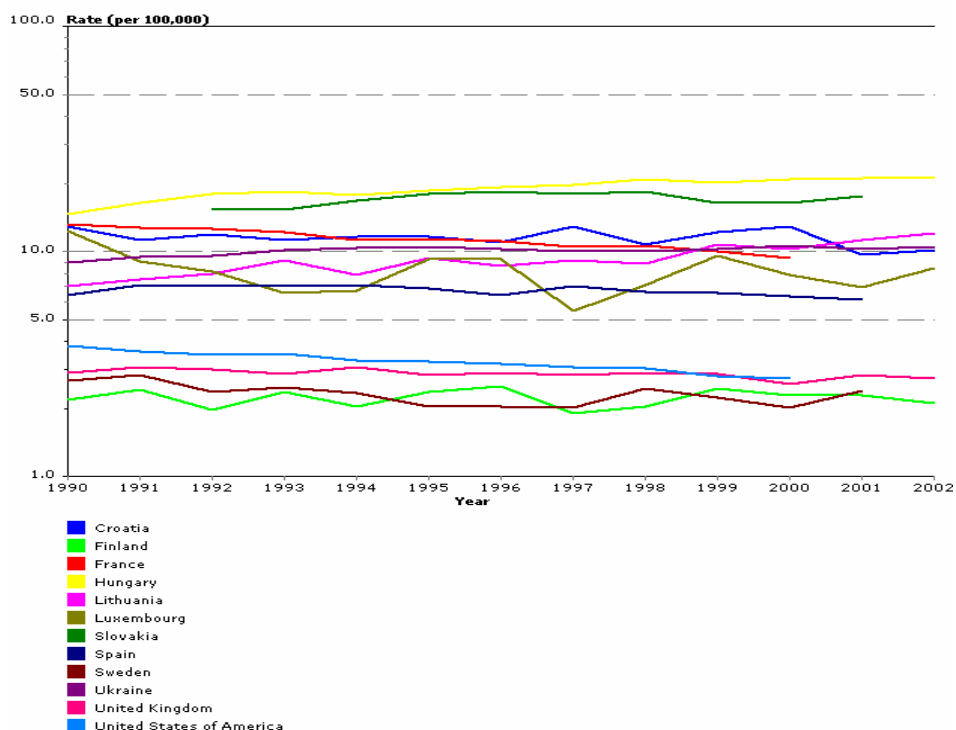
CAVIDAD ORAL (C00-C08)

FARINGE (C09, C10, C12-C14)



En cuanto a la evolución temporal de la mortalidad por cáncer de cavidad oral y faringe en Europa se deduce que, de forma global no existen grandes variaciones en la última década aunque las tendencias varían en función de la distribución geográfica (ver figura 11). Mientras que en ciertos países del Oeste como Luxemburgo y Francia parece observarse una clara tendencia negativa, países del Este como Hungría, Lituania y Ucrania mantienen una tendencia positiva (GLOBOCAN 2002)².

Figura 11. Evolución de la mortalidad por COF en Europa



1.2.4. Supervivencia

Según los resultados del proyecto EURO CARE-3, estudio que incluyó 1.815.584 pacientes adultos y 23.500 niños con cáncer de los registros participantes que fueron diagnosticados durante 1990-1994, la probabilidad de sobrevivir 5 años tras el diagnóstico de cáncer de cavidad oral y faringe es del 36% para hombres y del 52% para mujeres⁸. Globalmente, la supervivencia en España es similar a la de los países de nuestro entorno aunque ligeramente inferior a la de ciertos países como Suiza, Holanda, Suecia e Inglaterra. Según el registro SEER "Surveillance Epidemiology and End Results", la supervivencia en EEUU es superior a la Europea (59,1%)⁹. De forma general, la probabilidad de sobrevivir a los 5 años es inferior para los tumores de orofaringe e hipofaringe que para los tumores de la cavidad oral.

1.3. Factores de riesgo del cáncer oral y de faringe

1.3.1. Tabaco.

El hábito tabáquico se introdujo en Europa por los colonizadores de Centroamérica y América del Sur en el Siglo XVI. En la actualidad el consumo de tabaco está extendido por todo el mundo. En el 2003 se estimaba que había 1.300 millones de fumadores en el mundo¹⁰. Mientras que en los países desarrollados el tabaco se consume habitualmente en forma de cigarrillos, en los países asiáticos y en los países en vías de desarrollo predominan otras formas de tabaco. Los *bidis*, que consisten en tabaco envuelto en una hoja de temburni son las formas de consumo más común en Asia y en la India. Los *kreteks* que son cigarrillos con sabor a *clove*, contienen muchas sustancias con sabores exóticos y eugenol, se fuman con frecuencia en Indonesia. En los países asiáticos y en Sudamérica también es muy frecuente la preparación de tabaco para mascar (*betel quid* o *pan*), a menudo asociado con nuez de areca y envuelto en hoja de betel, aunque también puede contener otros ingredientes que le confieren sabor y aroma (lima, aceite de sésamo, índigo, mentol, etc).

Según los datos proporcionados en el último informe de la OMS (Organización Mundial de la Salud) sobre la epidemia de tabaco de 2008¹¹, el consumo de tabaco a nivel mundial prevalece sobretodo en hombres y es más frecuente en países asiáticos y europeos. De forma general, dentro de Europa, el mayor consumo de tabaco se produce en los países del Este, con un porcentaje de hombres fumadores que superan el 60% en países como Rusia, Bielorrusia e Ucrania. Los consumos más bajos se encuentran en los países del Norte (Suecia, Islandia, Irlanda y Finlandia). En España el consumo es intermedio. Este anterior informe estima un 36,4% de fumadores entre los hombres y un 32,7% de fumadores entre las mujeres. A nivel nacional, los datos preliminares de la encuesta domiciliaria sobre alcohol y drogas 2007-2008¹², ponen de manifiesto que un 41,7% de la población española

entre 15-64 años ha consumido tabaco en el último año y un 29,6% lo consume diariamente. La encuesta nacional de salud del año 2006, estimaba un 26,4% de fumadores diarios, un 3% de fumadores ocasionales y un 20,5% de exfumadores. De los fumadores diarios un 42,3% fumaba 20 o más cigarrillos al día¹³. En Galicia, los porcentajes observados en el último informe publicado sobre el consumo de drogas en Galicia 2006 son similares¹⁴. Un 31,3% de la población mayor de 12 años fumaba a diario (38,1% de hombres y 25,1% de mujeres).

✓ *Evidencia epidemiológica de la asociación entre el tabaco y el cáncer de cavidad oral y faringe*

La primera asociación del tabaco con el cáncer de cavidad oral y faringe data de 1837, cuando se describió el primer caso de cáncer de lengua en un mascarador de tabaco¹⁵. Estudios epidemiológicos llevados a cabo en todo el mundo desde entonces han demostrado un aumento en el riesgo para los individuos fumadores, que, a su vez, parece incrementarse al aumentar el consumo diario y los años fumados, pero la magnitud del riesgo parece diferir significativamente entre los distintos estudios. De forma general, parecen existir indicios de que el riesgo es mucho mayor en España, Italia y Latinoamérica que en los países del Norte de Europa, EEUU o los países asiáticos (ver tabla 2).

En España, el estudio de *Castellsagué et al*¹⁶ que incluye 375 casos incidentes de cavidad oral y faringe y 375 controles hospitalarios, muestra un riesgo aproximadamente 6 veces mayor para los fumadores actuales frente a los no fumadores (OR=6,4 IC95% 3,3-12,4). El riesgo aumenta proporcionalmente con el consumo diario (OR_{1-10cig/día}=3,6; OR_{>41cig/día}=12,2) y con la duración del hábito, y es de 2 a 4 veces mayor para los fumadores de tabaco negro. El riesgo en los exfumadores es aproximadamente 3 veces menor que en los fumadores actuales. El grupo de *Sánchez et al*¹⁷, con 375 casos y 375 controles plantea riesgos similares para los fumadores actuales (OR=5.9 IC95% 3,1-11,4). *Moreno-López et al*¹⁸

investigaron 75 casos de la cavidad oral y obtuvieron riesgos similares a los anteriores (OR=5,3).

Los estudios llevados a cabo en Italia muestran riesgos ligeramente superiores a los hallados en los estudios españoles. Uno de los más recientes y de mayor tamaño (736 casos de cavidad oral y faringe y 1.877 controles hospitalarios) encuentra un riesgo de 17,7 veces mayor para los fumadores en comparación a los no fumadores (OR=17,7 IC95% 11,6-26,8)¹⁹. En este estudio el riesgo en fumadores sólo se reduce sustancialmente a partir de los 10-19 años del cese del hábito tabáquico (OR=4,9 IC95% 3-8,1). *Rodríguez et al*²⁰, con 137 casos y 298 controles, muestran que el riesgo aumenta con el consumo de cigarrillos/día y oscila entre 4,37 para los que fuman menos de 15 cig/día a 17,5 para los que fuman más de 25 cig/día. En los estudios llevados a cabo con anterioridad se observa igualmente un aumento en el riesgo con el consumo de cigarrillos, variando éste entre 2,4 y 5,3 para los que consumen menos de 15 cig/día y entre 9,1 y 14,8 para los que consumen más de 25 cig/día²¹⁻²³. En el estudio de *Franceschi et al*²² publicado en 1990 el riesgo de cáncer de la cavidad oral en exfumadores en relación a no fumadores desaparece a partir de los 10 años de abandono del hábito tabáquico.

En los estudios realizados en Latinoamérica los riesgos de padecer distintos tumores de cavidad oral y faringe en individuos fumadores varían entre 5,5 y 23,3²⁴⁻²⁶. Uno de los estudios de mayor tamaño, realizado en Uruguay, incluye 776 casos de cavidad bucal y faringe y 1.501 controles²⁴. En él se encuentra una OR de 11,0 para el cáncer oral y una OR de 25,7 para el cáncer de faringe. El riesgo en no fumadores se reduce significativamente a los 10 años de dejar de fumar. *Garrote et al* llegan a las mismas conclusiones en un estudio llevado a cabo en Cuba²⁵. En Brasil, *Franco et al*²⁶ estratifican los resultados de cáncer de la cavidad oral por localización y encuentran un riesgo muy superior para el cáncer de lengua que para otros tumores de la cavidad oral.

En dos estudios llevados a cabo en el Norte de Europa los riesgos de padecer cáncer de cavidad oral y faringe como consecuencia del tabaco son inferiores a los demostrados en los anteriores países para todos los niveles de consumo^{27,28}. En el Reino Unido y EEUU los riesgos son todavía más bajos llegando a ser no significativos para los fumadores de menos de 20 cigarrillos/día o para los que fumaron durante menos de 40 años²⁹⁻³¹. En la tabla 2 se proporciona un resumen de los principales resultados de los estudios que investigan la asociación entre el tabaco y el cáncer de cavidad oral y faringe.

Tabla 2. Resumen de los estudios que investigan la asociación entre el tabaco y el cáncer de cavidad oral y faringe.

Autor, año y origen	Características del estudio	Número casos/controles	OR fumadores (IC95%)	OR _{ex} -fumadores (IC95%)
Muwonge et al (2008) ³² India	-Estudios de casos y controles anidado. -Casos incidentes de cáncer oral.	-282 casos (58% H) -1.410 controles (57.8% H)	Fumadores de cigarrillos: 1,0 (0,6-1,9) Fumadores de bidi: 1,9 (1,1-3,2)	Exfumadores: 1,0 (0,5-2,1)
Bosetti et al (2008) ¹⁹ Italia	-Análisis de 2 estudios de casos y controles sobre cáncer oral y faringe llevados a cabo en Italia. -Controles hospitalarios.	-736 casos (100%H) -1.877 controles (100%H)	17,68 (11,6-26,8)	<10 años: 10,98 (7-17,2) 10-19 años: 4,96 (3-8,1) ≥20 años: 2,89 (1,6-5,2)
De Stefani et al (2007) ²⁴ Uruguay	-Estudio de casos y controles. -Casos incidentes de cavidad bucal (43.2%) y faringe (56.8%). -Exclusión de labio y nasofaringe. -Controles hospitalarios	-776 casos (100%H) -1501 controles (100% H)	Fumadores actuales: Cáncer oral: OR= 11,0 (6,0-25,9) 1-9 cig/día: 2,1 (0,8-5,3) 10-19 cig/día: 6,2 (2,9-13,4) 20-29 cig/día: 10,8 (5,1-22,9) > 30 cig/día: 14,0 (6,8-30,7) Cáncer de faringe: OR= 25,7 (10,3-64,4) 1-9 cig/día: 7,1 (2,6-19,3) 10-19 cig/día: 13,2 (5,1-33,8) 20-29 cig/día: 22,8 (9,0-57,6) > 30 cig/día: 28,3 (11,2-71,4) Alguna vez fumadores: Cáncer oral: 7,7 (4,2-18,0) Cáncer de faringe: 18,6 (7,4-46,3)	Cáncer oral: Exfumadores: 4,3 (2,0-9,3) Exfumadores 1-9 años: 0,65 (0,44-0,94) Exfumadores 10-19 años: 0,16 (0,08-0,32) Exfumadores > 20 años: 0,15 (0,07-0,31) Cáncer de faringe Exfumadores: 10,1 (10,3-64,4) Exfumadores 1-9 años: 0,64 (0,45-0,91) Exfumadores 10-19 años: 0,22 (0,13-0,39) Exfumadores > 20 años: 0,22 (0,12-0,4)

Introducción

Autor, año y origen	Características del estudio	Número casos/controles	OR fumadores (IC95%)	OR _{ex-fumadores} (IC95%)
Vlajinac et al (2006) ³³ Serbia	-Estudio de casos y controles -Casos de orofaringe -Controles hospitalarios	100 casos (89% H) 100 controles	Fumadores actuales: 6,85 (2,16-21,77)	5,71 (2,05-15,8)
Rodríguez et al (2004) ²⁰ Italia	-Análisis de 2 estudios de casos y controles llevados a cabo en Italia. -Casos de COF en menores de 46 años. -Controles hospitalarios emparejados por edad, sexo y procedencia	-137 casos (83% H) -298 controles (76% H)	< 15 cig/día: 4,37 (1,7-11,23) 15-24 cig/día: 11,2 (4,48-28,3) ≥ 25 cig/día: 17,5 (6,54-46,7)	Exfumadores: 2,3 (0,9-5,86) Exfumadores 1-5 años: 3,45 (1,14-10,45) Exfumadores > 5 años: 1,37 (0,43-4,32)
Llewellyn et al (2004) ³¹ Reino Unido	-Estudio de casos y controles. -Casos de cáncer oral (< 45 años)	-116 casos (55% H) -207 controles (55% H)	Hombres ≤ 10 cig/día: 0,6 (0,2-1,5) 11-20 cig/día: 1,4 (0,6-3,5) ≥ 21 cig/día: 1,3 (0,4-3,8) Mujeres ≤ 10 cig/día: 0,7 (0,3-1,8) 11-20 cig/día: 1,1 (0,5-2,6) ≥ 21 cig/día: 1,5 (0,5-4,6)	Hombres 1,2 (0,6-2,6) Mujeres 0,8 (0,3-1,9)
Castellsagué et al (2004) ¹⁶ España	-Estudio de casos y controles -Casos incidentes de COF. -Controles hospitalarios	-375 casos (81,1% H) -375 controles (81,1% H)	Fumadores actuales: 6,41 (3,32-12,37) 1-10 cig/día: 3,66 (1,42-9,43) 11-20 cig/día: 8,48 (3,71-19,4) 21-30 cig/día: 8,81 (3,8-20,3) 31-40 cig/día: 7,30 (2,8-18,8) ≥41 cig/día: 12,2 (4,08-36,5) Fumadores en algún momento: 4,10 (2,19-7,69)	Exfumador: 2,36 (1,21-4,60) Exfumador de 1-40 años: 2,4 (1,2-4,9) Exfumador ≥ 41 años: 2,8 (1,2-6,3)
Znaor et al (2003) ³⁴ India	-Estudio de casos y controles -Casos de cáncer oral (labio, lengua y boca), faringe y esófago. -Controles hospitalarios	1.563 casos de cáncer oral, 636 de faringe y 566 de esófago (100% H) -3.638 controles (100% H)	Cáncer oral: Fumadores de cigarrillos: 0,99 (0,79-1,23) Fumadores de bidis: 2,15 (1,75-2,6) Cáncer de faringe: Fumadores de cigarrillos: 1,79 (1,29-2,5) Fumadores de bidis: 4,68 (3,5-6,27)	Cáncer oral Exfumador de 2-4 años: 0,49 (0,34-0,71) Exfumador ≥ 15 años: 0,51 (0,34-0,76) Cáncer de faringe Exfumador de 2-4 años: 0,42 (0,23-0,67) ≥ 15 años: 0,24 (0,12-0,48)

Autor, año y origen	Características del estudio	Número casos/controles	OR fumadores (IC95%)	OR ex-fumadores (IC95%)
Sánchez et al (2002) ¹⁷ España	-Estudio de casos y controles. -Casos incidentes de COF. -Controles hospitalarios	-375 casos (81% H) - 375 Controles (81% H)	Fumadores actuales: 5,96 (3,12-11,4)	Exfumadores: 2,16 (1,12-4,16)
Garrote et al (2001) ²⁵ Cuba	-Estudio de casos y controles. -Casos de cavidad oral y oro-faringe. -Controles hospitalarios	-200 casos (71.5% H) -200 controles (32% H)	Fumadores actuales: < 20 cig/día: 6,3 (2,75-14,36) 20-29 cig/día: 9,6 (4,3-21,6) ≥ 30 cig/día: 20,8 (8,9-48,3)	Exfumador: 6,31 (2,97-13,4) Exfumador < 10 años: 2,3 (1,1-4,8) Exfumador ≥ 10 años: 0,37 (0,16-0,85)
Moreno López et al (2000) ¹⁸ España	-Estudio de casos y controles. -Casos de cáncer de cavidad oral -Controles hospitalarios	-75 casos (84% H) -150 controles	Fumadores: 5,03 (2,42-10,45) 1-20 cig/día: 3,08 (1,41-6,71) > 20 cig/día: 8,33 (3,41-20,4)	Exfumadores: 0,87 (0,33-2,31)
Bosetti et al (2000) ³⁵ Italia y Suiza	-Combinación de 2 estudios de casos y controles -Casos de COF.	197 casos (Mujeres) 1.113 controles (Mujeres)	Fumadores actuales: 1-14 cig/día: 3,63 (2,34-5,64) ≥ 15 cig/día: 4,56 (2,72-7,62)	1,60 (0,90-2,85)
Talamini et al (2000) ²¹ Italia	-Estudio de casos y controles -Casos incidentes de cavidad oral -Controles hospitalarios	-132 casos (75% H) -148 controles (30.4%)	Fumadores actuales: 1-14 cig/día: 2,4 (1,0-5,9) 15-24 cig/día: 5,7 (2,2-15,0) ≥ 25 cig/día: 14,8 (3,1-70,4)	2,4 (1,0-5,8)
Franceschi et al (1999) ²³ Italia	-Estudio de casos y controles -Casos de COF. -Controles hospitalarios	-344 (80% H) casos de cavidad oral (81% H) y 410 casos de faringe (89% H)	Fumadores actuales: < 25 cig/día: 5,2 (3,7-7,3) ≥ 25 cig/día: 9,1 (5,9-14,0)	Exfumadores: 2,1 (1,4-3,0)
Lewin et al (1998) ²⁸ Suecia	-Estudio de casos y controles. -Casos incidentes de cabeza y cuello -Controles poblacionales	128 casos de cavidad oral, 138 casos de faringe, 157 de laringe y 123 de esófago. -756 controles	Fumadores actuales: 6,5 (4,4-9,5) < 15 g/día: 3,4 (2,3-5,1) 15-24g/día: 4,4 (2,9-6,5) ≥ 25 g/día: 4,8 (2,9-8,1) Fumadores en algún momento: 4,0 (2,8-5,7)	Exfumadores: 1,9 (1,3-2,8) Exfumadores ≤ 10 años: 3,2 (2,0-5,2) Exfumadores 11-20 años: 1,7 (1,0-2,9) Exfumadores ≥ 21 años: 0,9 (0,5-1,7)
Takezaki et al (1996) ³⁶ Japón	-Estudio de casos y controles. -Casos primarios de cáncer oral. -Controles hospitalarios	-266 casos (71% H) -36.528 (27% H)	1-19 cig/día: 2,4 (1,5-3,6) 20-39 cig/día: 2,8 (1,8-4,5) >40 cig/día: 3,5 (1,8-7,0)	Exfumadores 1-4 años: 4,1 (2,1-7,9) Exfumadores de 5-14 años: 1,6 (0,8-3,2) Exfumadores > 15 años: 1,7 (0,8-3,7)

Introducción

Autor, año y origen	Características del estudio	Número casos/controles	OR fumadores (IC95%)	OR _{ex} -fumadores (IC95%)
Bundgaard et al (1995) ²⁷ Dinamarca	-Estudio de casos y controles. -Casos incidentes de cáncer intra-oral de células escamosas. -Controles poblacionales	-161 casos (60% H) -400 controles (62.5% H)	Fumadores actuales: 1-20g/día: 2,1 (1,3-5,0) >21 g/día: 5,8 (3,1-10,9)	No se proporcionan datos
Rao et al (1994) ³⁷ India	-Estudio de casos y controles. -Casos incidentes de cáncer oral. Exclusión de la base de la lengua y paladar blando. -Controles hospitalarios	-713 casos (100% H) -635 controles (100% H)	Fumadores de bidi: 1,59 (1,25-2,03) Fumadores de cigarrillos: 0,56 (0,38-0,81) Otros fumadores (chillum, hukka): 5,01 (1,35-21,9)	No se proporcionan datos
Day et al (1993) ²⁹ Estados Unidos	-Estudio de casos y controles. -Casos incidentes de COF. Exclusión de labio, glándulas salivares y nasofaringe. -Controles poblacionales (> 65 años)	Raza blanca 871 casos (67% H) 979 controles (66% H) Raza negra 194 casos (75% H) 203 controles (69% H)	Raza blanca 1-19 cig/día: 1,2 (0,8-1,7) 20-39 cig/día: 2,2 (1,6-2,9) ≥ 40 cig/día: 3,3 (2,3-4,6) Raza negra 1-19 cig/día: 1,2 (0,5-2,6) 20-39 cig/día: 2,1 (1,0-4,4) ≥ 40 cig/día: 2,8 (1,0-7,7)6	Raza blanca Exfumadores 1-19 años: 1,1 (0,7-1,6) Exfumadores ≥ 20 años: 0,6 (0,3-0,9) Raza negra Exfumadores 1-9 años: 1,1 (0,4-3,1) Exfumadores de 10-19 años: 0,1 (0,0-1,3) Exfumadores ≥ 20 años: 0,3 (0,1-1,7)
Marshall et al (1992) ³⁰ Nueva York	-Estudio de casos y controles -Casos de cáncer oral. -Controles del vecindario	-290 casos (69% H) -290 controles (69% H)	1-20 paquetes-año: 1,3 (0,7-2,4) 21-30 paquetes-año: 2,7 (1,2-6,0) 31-40 paquetes-año: 2,9 (1,5-5,9) 41-50 paquetes-año: 7,0 (3,3-15,1)	No se proporcionan datos
Franceschi et al (1990) ²² Italia	-Estudio de casos y controles. -Casos del tracto respiratorio superior (> 75 años). Exclusión de nasofaringe y glándulas salivares. -Controles hospitalarios.	-157 casos de la cavidad oral y 134 casos de faringe (100% H). -1272 controles (100% H)	Cavidad oral: Fumadores de cigarrillos: 11,1 (3,4-34,8) ≤ 14 cig/día: 5,3 (1,5-17,6) 15-24 cig/día: 14,3 (4,4-46,7) >25 cig/día: 14,3 (4,2-48) Faringe: Fumadores de cigarrillos: 12,9 (3,1-52,9) ≤ 14 cig/día: 8,0 (1,9-34,5) 15-24 cig/día: 14,2 (3,4-59,3) >25 cig/día: 17,6 (4,1-74,7)	Cavidad oral: Exfumadores < 10 años: 5,7 (1,6-20,8) Exfumadores ≥ 10 años: 1,1 (0,3-5,1) Faringe: Exfumadores < 10 años: 11,3 (2,6-49,4) Exfumadores ≥ 10 años: 3,7 (0,8-18,0)

Autor, año y origen	Características del estudio	Número casos/controles	OR fumadores (IC95%)	ORex-fumadores (IC95%)
Franco et al (1989) ²⁶ Brazil	-Estudio de casos y controles. -Casos incidentes de cavidad oral. Exclusión de labio o glándulas salivares. -Controles hospitalarios	-232 casos -464 controles	Cigarrillos industriales: Fumadores actuales: <i>Lengua:</i> 23,3 (2,9-186) <i>Boca:</i> 9,3 (3,4-25,9) <i>Otras:</i> 5,5 (1,7-18,6) Cigarrillos de liar: Fumadores actuales: <i>Lengua:</i> 32,2 (4,0-262) <i>Boca:</i> 14,4 (5,2-40,0) <i>Otras:</i> 10,0 (2,9-34,6)	Cigarrillos industriales: Exfumadores de 1-10 años: <i>Lengua:</i> 6,3 (0,7-58,7) <i>Boca:</i> 2,9 (0,9-9,2) <i>Otras:</i> 1,8 (0,4-7,7) Cigarrillos de liar: Exfumadores de 1-10 años: <i>Lengua:</i> 17,5 (1,9-158) <i>Boca:</i> 4,9 (1,6-14,8) <i>Otras:</i> 2,2 (0,6-8,8)

✓ *Mecanismos de la carcinogénesis*

El efecto carcinogénico del tabaco fumado en forma de cigarrillos proviene de la presencia de un gran número de sustancias reconocidas como carcinogénicas presentes en el humo de tabaco, siendo las más abundantes y perjudiciales las N-nitrosaminas (la N-nitrosornicotina, N-nitrosopirrolidina, N-nitrosodietilamina y N-metilnitrosamino-1-3-piridil-1-butanona) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre los que destaca el benzo[a]pireno. En la tabla 3 se describen las principales sustancias carcinogénicas encontradas en el humo de tabaco, con independencia de su procedencia (aditivos, papel, filtro, etc) según la lista proporcionada por la IARC y el Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos^{38,39}.

Tabla 3. Principales sustancias carcinogénicas encontradas en el humo de tabaco.

Fase vapor	Fase de partículas
Acetaldehído	Alquitrán
Monóxido de carbono	Nicotina
Benzeno	Fenol
Tolueno	Catecol
Formaldehído	Cresol
Acroleína	Hidroquinona
Acetona	Anilina
Piradina	2-toluidina
3-metilpiridina	2-naftilamina
3-vinilpiridina	3-aminobifenil
Hidrazina	4-aminobifenil
Metilamina	benzo[a]antraceno
Dimetilamina	benzo[a]pireno
Oxidos de nitrógeno	g-butirolactona
N-nitrosodimetilamina (NDMA)	quinolina
N-nitrosodietilamina (NDEA)	N-nitrosoanatabina (NAT)
N-nitrosopirrolidina (NPYR)	N-nitrosornicotina (NNN)
Acido fórmico	N-metilnitrosoamino-1-(3-piridil)1-
Estireno	butanona (NNK)
Acido acético	N-Nitrosodietilatanolamina
Cloruro de metilo	Cadmio
1-3 butadieno	Niquel
Metilcriseno	Mercurio
	Zinc
	Polonio-210
	Acido benzoico

1.3.2. Alcohol

El alcohol se ha producido y bebido durante miles de años pero no ha sido hasta hace poco cuando se ha identificado su potencial carcinogénico. La Unión Europea se encuentra entre las zonas del mundo con mayor consumo alcohólico (11 litros de alcohol puro/adulto anualmente)⁴⁰. Dentro de Europa el consumo es mayor en los países del Este y Centro Europa que en los países del Sur. Los consumos más bajos registrados son en tres países Nórdicos (Islandia, Noruega y Suecia).

En cuanto al tipo de consumo de alcohol se calcula que en Europa casi la mitad se consume en forma de cerveza (43%) y el resto en forma de vino (34%) y licores (23%). De todas formas estos consumos dependen en gran medida de la región geográfica. De forma general en el norte de Europa se consume mayoritariamente cerveza y en el Sur vino⁴⁰.

En España la experiencia con el alcohol es casi universal. Según los datos de la encuesta domiciliaria 2005-2006 sobre alcohol y drogas, el 93,7% de la población de 15-64 años había consumido alcohol alguna vez durante los últimos 12 meses. La mayoría de la población lo consumía de forma esporádica o habitual (76,7% en el último año, 64,6% en el último mes y un 14,9% a diario)⁴¹. Por grupos de bebidas, la cerveza/sidra fueron las bebidas más consumidas durante el fin de semana (20,8%), seguidas del vino/champán (15,9%) y los combinados/cubatas (10,8%). En días laborables las bebidas más consumidas fueron el vino/champán seguidos de la cerveza/sidra. Un 10,4% y 7,7% de la población, respectivamente, había consumido estas bebidas todos los días laborables. Datos preliminares de la encuesta domiciliaria 2007-2008 muestran que el consumo durante el último año ha sido ligeramente inferior (72,9% consumidores esporádicos y un 10,2% de consumidores diarios)¹².

✓ *Evidencia epidemiológica de la asociación entre el alcohol y el cáncer oral y de faringe*

A pesar de no ser carcinogénico en animales, los estudios epidemiológicos han proporcionado evidencias suficientes para poder concluir que el consumo excesivo de bebidas alcohólicas está asociado al cáncer oral y de faringe.

*Bagnardi et al*⁴² llevaron a cabo una revisión sistemática y meta-análisis en el 2001 para investigar la relación entre el consumo alcohólico y el riesgo de varios tipos de cánceres, entre ellos los tumores de cavidad oral y faringe. Incluyeron en el meta-análisis 26 estudios sobre la cavidad oral y faringe, con un total de 7.954 casos. La asociación con el alcohol fue significativa en todas las categorías de consumo y se observó una fuerte relación dosis-respuesta. El riesgo asociado a un consumo de 25 g/día fue de 1,8 IC95% (1,7-1,8), aumentando a 2,8 IC95% (2,7-3,0) para consumos de 50 g/día y a 6,0 IC95% (5,5-6,6) para consumos superiores a 100mg/día.

En el 2003 *Zeka et al*⁴³ llevaron otra revisión sistemática para investigar la asociación entre el tabaco y el alcohol y el riesgo de padecer tumores del tracto aerodigestivo. Según los resultados de esta investigación los efectos del tabaco y del alcohol son sustancialmente independientes ya que no existen importantes desviaciones del modelo aditivo de interacción (ver tabla 4).

Tabla 4. Resumen de los estudios que investigan la asociación entre el tabaco y el cáncer de cavidad oral y faringe.

Consumo de tabaco	Localización del tumor	OR asociado al consumo de alcohol		
		0 bebidas/día	>0-4 bebidas/día	> 4 bebidas/día
0 cigarrillos/día	Orofaringe	1,0	1,5	7,2
	Faringe	1,0	1,7	12,6
1-30 cigarrillos/día	Orofaringe	1,3	2,0	9,7
	Faringe	1,3	2,3	16,7
> 30 cigarrillos/día	Orofaringe	2,9	4,5	21,2
	Faringe	2,8	4,8	35,6

*Hashibe et al*⁴⁴ realizaron un meta-análisis en el 2007 para investigar el efecto independiente del alcohol y del tabaco, calculando el riesgo de consumir alcohol en nunca fumadores y el riesgo de fumar en nunca bebedores. Según estos resultados, entre los nunca bebedores el consumo de cigarrillos se asociaba significativamente con el riesgo de padecer cáncer de cabeza y cuello (OR= 2,1 IC95% 1,5-2,9) y se observaba una relación dosis-respuesta con la frecuencia, duración y número de cigarrillos-día. Entre los no fumadores, el consumo de alcohol se asociaba con el cáncer de cabeza y cuello únicamente a consumos elevados (OR para consumos ≥ 3 bebidas/día = 2,0 IC95% 1,3-3,2).

En una revisión reciente de los estudios publicados a partir del 2000⁴⁵ se observa igualmente una relación dosis-respuesta con el consumo pero, a diferencia del caso anterior, parecen existir evidencias de que el consumo de alcohol se asocia con el riesgo de cáncer de cavidad oral y faringe únicamente a elevados niveles de consumo. La magnitud del riesgo es variable y muy elevada en varios estudios llevados a cabo en España, Italia y Alemania. En un estudio llevado a cabo por *Dal Maso et al*⁴⁶ se valora el riesgo del alcohol consumido sólo con las comidas y entre comidas, observándose riesgos significativamente mayores para los bebedores entre comidas, tanto para cáncer de la cavidad oral como para el de faringe. En la tabla 5 se resumen los principales resultados de los estudios llevados a cabo en los últimos años.

Tabla 5. Resumen de los principales estudios que investigan la asociación entre el alcohol y el cáncer de cavidad oral y faringe

Autor, año y origen	Características del estudio	Número casos/controles	OR bebedores según frecuencia de consumo	OR según tipo de alcohol
Muwonge et al (2008) ³² India	-Estudios de casos y controles. -Casos incidentes de cáncer oral. -Controles anidados.	-282 casos (58% H) 1410 controles (57,8%)	Bebedores actuales: 1,4 (0,9-2,2) Exbebedores: 1,3 (0,7-2,4) 1-3 días/semana: 1,5 (0,7-2,9) 4-7 días/semana: 1,7 (1,0-2,7)	Toddy: 2,5 (0,6-10,9) Arrack: 2,0 (0,9-4,4) Licores extranjeros: 2,1 (0,9-5,2)
De Stefani et al (2007) ²⁴ Uruguay	-Estudio de casos y controles. -Casos incidentes de cavidad bucal (43,2%) y faringe (56,8%). -Exclusión de labio y nasofaringe. -Controles hospitalarios	-776 casos (100% H) -1501 controles (100% H)	Cáncer oral Bebedores actuales: 3,4 (2,3-5,2)) Exbebedores: 3,0 (1,9-4,7) Riesgos varían de 1,2 (0,8-2,0) a 7,0 (4,2-11,5) según el nivel de consumo Cáncer faringe Bebedores actuales: 4,5 (3,0-6,8)) Exbebedores: 3,9 (2,5-6,1) Riesgos varían de 1,4 (0,9-2,2) a 11,7 (7,2-18,9) según el nivel de consumo	Cáncer oral : <i>Para grandes bebedores :</i> Cerveza: 0,4 (0,2-0,9) Vino: 1,4 (0,9-2,4) Licores fuertes: 1,4 (0,8-2,2) Cáncer faringe <i>Para grandes bebedores :</i> Cerveza: 0,3 (0,2-0,7) Vino: 2,5 (1,6-3,9) Licores fuertes: 0,9 (0,5-1,4)
Vlajinac et al (2006) ³³ Serbia	-Estudio de casos y controles -Casos de orofaringe -Controles hospitalarios	100 casos (89% H) 100 controles	1,52 (0,7-3,29) Media semanal ≤ 1,75 dl: 1,5 (0,7-3,3) Media semanal > 1,75 dl: 1,9 (1,3-3,0)	Para grandes bebedores respecto a no bebedores/bebedores ligeros: Brandy: 1,4 (1,1-1,8) Licores fuertes: 2,6 (1,2-5,9) Vino: 0,8 (0,5-1,4) Cerveza: 1,2 (0,8-1,8)
Rodriguez et al (2004) ²⁰ Italia	-Análisis de 2 estudios de casos y controles llevados a cabo en Italia. -Casos de COF menores de 46 años. -Controles hospitalarios emparejados por edad, sexo y procedencia	-137 casos (83% H) -298 controles (76% H)	Bebedores actuales: < 3 bebidas/día: 0,7 (0,3-1,8) Riesgos varían de 0,99 (0,3-2,8) a 4,9 (1,6-15,1) según el nivel de consumo	
Llewellyn et al (2004) ³¹ Reino Unido	-Estudio de casos y controles. -Casos de cáncer oral < de 45 años	-116 casos (55% H) -207 controles (55% H)	Grandes bebedores: 1,6 (0,8-3,1)	

Autor, año y origen	Características del estudio	Número casos/controles	OR bebedores según frecuencia de consumo	OR según tipo de alcohol
Castellsagué et al (2004) ¹⁶ España	-Estudio de casos y controles -Casos incidentes de COF. -Controles hospitalarios	-375 casos (81,1% H) -375 controles (81,1% H)	Bebedores actuales: 3,5 (1,9-6,3) Exbebedores: 2,1 (1,1-3,9) Riesgos varían de 2,0 (1,0-3,8) a 13,7 (6,0-30,9) según el nivel de consumo.	Sólo cerveza: 1,2 (0,5-2,8) Sólo cerveza y vino: 1,9 (0,9-3,9) Sólo vino: 2,7 (1,3-5,6) Licores fuertes con o sin cerveza y/o vino: 7,3 (3,6-14,5)
Znaor et al (2003) ³⁴ India	-Estudio de casos y controles -Casos de cáncer oral (labio, lengua y boca), faringe y esófago. -Controles hospitalarios	1.563 casos de cáncer oral, 636 de faringe y 566 de esófago (100% H) -3.638 controles (100% H)	Bebieron alguna vez: 3,5 (2,9-4,2) Cavidad oral Riesgos varían de 1,2 (0,9-1,5) a 2,9 (2,3-3,8) según el nivel de consumo Faringe Riesgos varían de 1,1 (0,8-1,5) a 3,60 (2,7-4,8) según el nivel de consumo.	Cavidad oral Arrack: 7,2 (5,1-10,1) Licores nacionales: 1,7 (1,3-2,3) Licores fuertes: 1,0 (0,8-1,4) Faringe Arrack: 3,9 (2,5-6,16) Licores nacionales: 2,5 (1,8-3,6) Licores fuertes: 1,1 (0,8-1,6)
Altieri et al (2004) ⁴⁷ Italia y Suiza	-Estudio de casos y controles llevado a cabo en Italia y Suiza. -Casos de COF. -Controles hospitalarios	-749 casos (84,6% H) -1.772 controles (70,6% H)	Riesgos varían de 2,1 (1,5-2,9) a 21,1 (14,0-31,8) según el nivel de consumo.	<i>Vino:</i> Frente a los que no consumen o consumen 0-2 bebidas/día los riesgos varían de 2,6 (1,5-4,5) a 15,0 (5,5-40,4) según el nivel de consumo. <i>Cerveza:</i> Frente a los que no consumen o consumen 0-2 los riesgos varían de 2,0 (1,3-2,9) a 24,0 (15,1-38,2) según el nivel de consumo. <i>Licores fuertes:</i> Riesgos para consumos ≥ 3 licores día: 4,8 (0,7-32,8)
Dal Maso et al (2002) ⁴⁶ Italia y Suiza	-Datos de 3 estudios de casos y controles -Casos de cáncer del tracto aero-digestivo -Controles hospitalarios	Casos: cavidad oral (324), faringe (397), laringe (506), esófago (271) Grupo control: cavidad oral (1.545 para cavidad oral y faringe).	Cavidad oral <i>Beben sólo con las comidas:</i> Riesgos ascienden a 10,3 en los grandes bebedores. <i>Beben entre comidas:</i> Riesgos ascienden a 27,6 en los grandes bebedores Faringe <i>Beben sólo con las comidas:</i> Riesgos ascienden a 7,1 en los grandes bebedores. <i>Beben entre comidas:</i> Riesgos ascienden a 11,3 en los grandes bebedores.	

Introducción

Autor, año y origen	Características del estudio	Número casos/controles	OR bebedores según frecuencia de consumo	OR según tipo de alcohol
Sánchez et al (2002) ¹⁷ España	-Estudio de casos y controles. -Casos incidentes de COF. -Controles hospitalarios	-375 casos (81% H) - 375 Controles (81% H)	Bebedores actuales: 3,3 (1,8-6,0) Ex-bebedores: 2,0 (1,1-3,8)	
Garrote et al (2001) ²⁵ Cuba	-Estudio de casos y controles. -Casos de COF. -Controles hospitalarios	-200 casos (71.5% H) -200 controles (32% H)	Exbebedores: 1,0 (0,5-2,1) El riesgo en los bebedores actuales varía de 1,1 (0,5-2,6) a 5,7 (1,8-18,5) según el nivel de consumo.	<i>Para grandes bebedores:</i> Licores fuertes: 5,1 (1,1-23,3) Cerveza: 1,5 (0,5-4,5) Vino: 0,7 (0,2-3,2)
Schwartz et al (2001) ⁴⁸ EEUU	-Estudio de casos y controles. -Casos incidentes de cáncer de la cavidad oral de células escamosas. Controles poblacionales	-333 casos (71,2% H y 93,7% raza blanca) -541 controles (71,5% H y 94,5% raza blanca)	El riesgo en los bebedores varía de 1,0 (0,6-1,5) a 4,7 (2,4-9,4) según el nivel de consumo.	
Schlecht et al (2001) ⁴⁹ Brasil	-Estudio de casos y controles -Casos incidentes del tracto aerodigestivo superior (boca, faringe y laringe). -Controles hospitalarios	784 casos 1578 controles	El riesgo aumenta con el nivel de consumo pero se mantiene relativamente constante independientemente de la duración del consumo alcohólico.	Orofaringe <i>Cerveza:</i> Los riesgos oscilan entre 4,1 y 5,6 dependiendo de la duración y nivel de consumo semanal. <i>Vino:</i> Los riesgos oscilan entre 4,5 y 8,2. <i>Licores fuertes:</i> Los riesgos oscilan entre 4,5 y 12,3.
Bosetti et al (2000) Italia y Suiza	-Combinación de 2 estudios de casos y controles -Casos de COF.	197 casos (Mujeres) 1.113 controles (Mujeres)	< 2 bebidas/día: 1,45 (0,9-2,4) ≥ 2 bebidas/día: 2,7 (1,71-4,4)	
Moreno López et al (2000) ¹⁸ España	-Estudio de casos y controles. -Casos de la cavidad oral -Controles hospitalarios	-75 casos (84% H) -150 controles	1-50 g alcohol/día: 1,9 (0,8-4,5) > 50: 5,0 (1,8-13,8)	
Talamini et al (2000) ²¹ Italy	-Estudio de casos y controles -Casos incidentes de la cavidad oral -Controles hospitalarios	-132 casos (75% H) -148 controles (30.4%)	El riesgo en los bebedores varía de 1,2 (0,4-3,5) a 12,7 (2,8-56,4) según el nivel de consumo.	

Varias investigaciones de las anteriormente citadas han investigado el riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe en función del tipo de bebida. De forma general se puede observar que, a la dosis adecuada, la gran mayoría de las bebidas alcohólicas pueden estar implicadas en la aparición de estos tumores. Los estudios no son concordantes en cuanto a qué tipo de bebida ejerce el mayor riesgo.

✓ *Mecanismo de la carcinogénesis*

El mecanismo de acción del alcohol está todavía por esclarecer y se asume que depende en gran medida de la localización anatómica del tumor. En una revisión reciente de la IARC se han propuesto una serie de posibles mecanismos, así como una valoración del nivel de evidencia para cada uno de ellos⁵⁰. Éstos se exponen en la tabla 6.

Tabla 6. Principales mecanismos carcinogénicos de acción del alcohol

Mecanismo	Órgano diana
EVIDENCIA ELEVADA	
Alteraciones del ADN causadas por el acetaldehído.	Cabeza y cuello, esófago e hígado.
Aumento de la concentración de estrógenos.	Mama
EVIDENCIA MODERADA	
Actúa de solvente para otros cancerígenos	Cabeza y cuello y esófago
Producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.	Hígado y otros.
Cambios en el mecanismo del folato	Colon y recto, mama y otros.
EVIDENCIA LEVE	
Deficiencias nutricionales (ej. Vitamina A)	Cabeza y cuello y otros.
Disminución de la vigilancia inmunológica	Hígado y otros.
Carcinogenicidad de otros componentes diferentes al etanol.	Cabeza y cuello, esófago, hígado y otros.
Alteraciones del ADN causadas por el etanol	Cabeza y cuello, esófago e hígado.

1.3.3. Dieta

Según la Organización Mundial de la Salud se atribuyen a la dieta el 15% de los tumores de orofaringe⁵¹. El patrón dietético exacto o los nutrientes específicos que conseguirían disminuir el riesgo del cáncer oral y de faringe se desconoce en gran medida, aunque sí se puede afirmar que una dieta pobre en verduras, y sobretodo en fruta fresca predispone a un aumento en el riesgo de padecer dichos tumores. Estudios de casos y controles llevados a cabo en todo el mundo^{17,25,35,52-57} han establecido que el consumo frecuente de frutas y verduras disminuye considerablemente el riesgo de padecer estos tumores. Según los resultados de un meta-análisis llevado a cabo en el 2006⁵⁸, que incluye 15 estudios de casos y controles y 1 estudio de cohortes, cada porción de fruta consumida al día disminuye el riesgo de padecer cáncer de la cavidad oral (OR=0,5 IC95% 0,4-0,7). En relación al consumo de frutas, el meta-análisis muestra una reducción significativa igualmente en el riesgo global de padecer cáncer oral (OR=0,5 IC95% 0,4-0,6). Cuando el análisis se estratificó por tipo de frutas y verduras, no se observaron diferencias sustanciales para los diferentes tipos de frutas, pero la protección fue mayor con los cítricos que con el resto de las frutas (OR=0,38 IC95% 0,26-0,56).

El papel de otros alimentos en la aparición del cáncer de cavidad oral y faringe está todavía por esclarecer. El consumo de carne^{23,25,55,59,60}, huevos^{23,25,55}, mantequillas y grasas saturadas^{23,59,61,62} se ha relacionado en algunos estudios con un aumento en el riesgo, pero otras investigaciones no encuentran una asociación significativa^{17,30,52-54,56,63} u observan incluso que el riesgo es menor para los individuos que toman estos alimentos⁶⁴. Es importante destacar que este último estudio fue llevado a cabo en China, sociedad en la que el consumo de carnes en esa época estaba relacionado con un mayor nivel de vida, sugiriendo que quizá el exceso de riesgo pueda ser debido a una dieta pobre en micronutrientes. La relación entre los lácteos, el pescado y el cáncer oral también sigue siendo objeto

de discusión ya que diversos estudios se contradicen^{17,23,25,53,56}. Algunos estudios han mostrado un efecto protector para el aceite de oliva y grasas insaturadas^{23,60}.

A pesar de su aparente relevancia en la aparición de tumores, los estudios epidemiológicos tampoco consiguieron esclarecer del todo el papel que juegan los nutrientes y vitaminas en el cáncer oral y de faringe. Aunque parece existir cierta concordancia respecto al efecto protector de la vitamina C y la fibra encontradas en las frutas y verduras^{30,59,61,63,65,66}, la reducción en el riesgo suele ser inferior a la observada cuando se tiene en cuenta el consumo total, pudiendo significar esto que son meros indicadores de las anteriores fuentes. El caroteno (precursor de la vitamina A procedente de frutas y verduras)^{59,63,65-67} y la vitamina E^{65,66} se presentan frecuentemente como factores protectores y el retinol^{59,63} y la vitamina D como factores de riesgo^{23,59}.

Es importante tener en cuenta que los estudios de casos y controles diseñados para investigar la dieta tienen una metodología poco robusta. Uno de los aspectos más preocupantes es la baja participación de los sujetos, que hace necesario recurrir frecuentemente a familiares y a amigos para obtener la información. Cabe destacar también la gran dificultad que entraña el determinar el patrón dietético exacto de un individuo, ya que depende exclusivamente del investigador obtener información exacta de los hábitos en el pasado y las posibles modificaciones que el sujeto pueda achacar a la enfermedad. A la hora de analizar los resultados es muy difícil elaborar un modelo con todas las variables de confusión ya que la ingesta de determinados nutrientes puede estar correlacionada entre sí, y el patrón dietético en sí puede ser indicativo de una nutrición inadecuada o de determinadas enfermedades o problemas dentales. Recientemente se ha incidido en la importancia de no sólo tener en cuenta el consumo energético sino la actividad física y el índice de masa corporal como indicadores de posibles deficiencias nutricionales.

1.3.4. Estado bucal y utilización de enjuague bucal

El estado de la boca se ha relacionado desde hace mucho tiempo con el riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe. Existen evidencias de que el riesgo es mayor en sujetos con una mala higiene bucal^{21,25-27,57} y que aumenta a medida que se incrementa el número de piezas dentales perdidas y no reemplazadas, mostrando diferentes estudios un riesgo significativo a partir de la pérdida de 11-16 dientes^{25,27,30,57,64,68} (OR: 2,7-9,8). *Day et al*²⁹, con 1.065 casos y 1.182 controles, determinaron que el riesgo era significativo sólo para los sujetos de raza blanca y a partir de 32 pérdidas dentales (OR=1,7). La mayoría de los estudios son concordantes en cuanto a que no existe una asociación con la utilización de dentadura o la presencia de aftas^{25,29,57,64,68}.

Algunos estudios han sugerido que la utilización de enjuague bucal está asociada con un aumento en el riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe pero los resultados en algunos casos son contradictorios^{25,29,68}. En uno de los mayores estudios llevados a cabo sobre este tema⁶⁸ se encontró un aumento en el riesgo del 40% para hombres y un aumento del 60% para mujeres. El riesgo aumentó con la duración y la frecuencia y fue exclusivo para los enjuagues con un elevado contenido en alcohol.

1.3.5. Ocupación

Aunque el cáncer oral y de faringe no se considera tradicionalmente como un cáncer ocupacional, ciertas profesiones sí han sido relacionadas con estos tumores. Tal es el caso de los electricistas y trabajadores de la industria electrónica^{29,69,70}, pintores⁷¹, camareros y trabajadores de restaurantes y bares^{72,73}, trabajadores de la industria de papel⁷⁴, industria maderera y mueblería⁷⁵, mecánicos⁷⁶, instaladores de moquetas^{29,75} y agricultores^{17,25}.

1.3.6. Papilomavirus humano (HPV)

La evidencia epidemiológica sugiere una asociación entre la infección por papilomavirus y el riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe. Los resultados de una revisión sistemática reciente, que incluye un total de 60 estudios, muestran una prevalencia global de infección en el 25,9% de los cánceres de cabeza y cuello (25% para los carcinomas de células escamosas de orofaringe y 35,6% para los carcinomas espinocelular orales)⁷⁷. Los genotipos 16 y 18 fueron las formas alélicas más frecuentes. El estudio multicéntrico de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC)⁷⁸ detectó HPV16 en el 3,9% de las biopsias de la cavidad oral y en el 18,3% de las biopsias de orofaringe. Los anticuerpos HPV16 se asociaron con un aumento en riesgo para el cáncer de la cavidad oral (OR=1,5-2,9) y para el cáncer de orofaringe (OR=3,5-9,2). Otros estudios muestran igualmente riesgos elevados para el genotipo HPV16 en el cáncer oral y cáncer de orofaringe^{79,80}. En dos estudios recientes los riesgos hallados para los genotipos de alto riesgo (HPV16 y HPV18) fueron muy superiores a los anteriores (OR=61-63)^{81,82}.

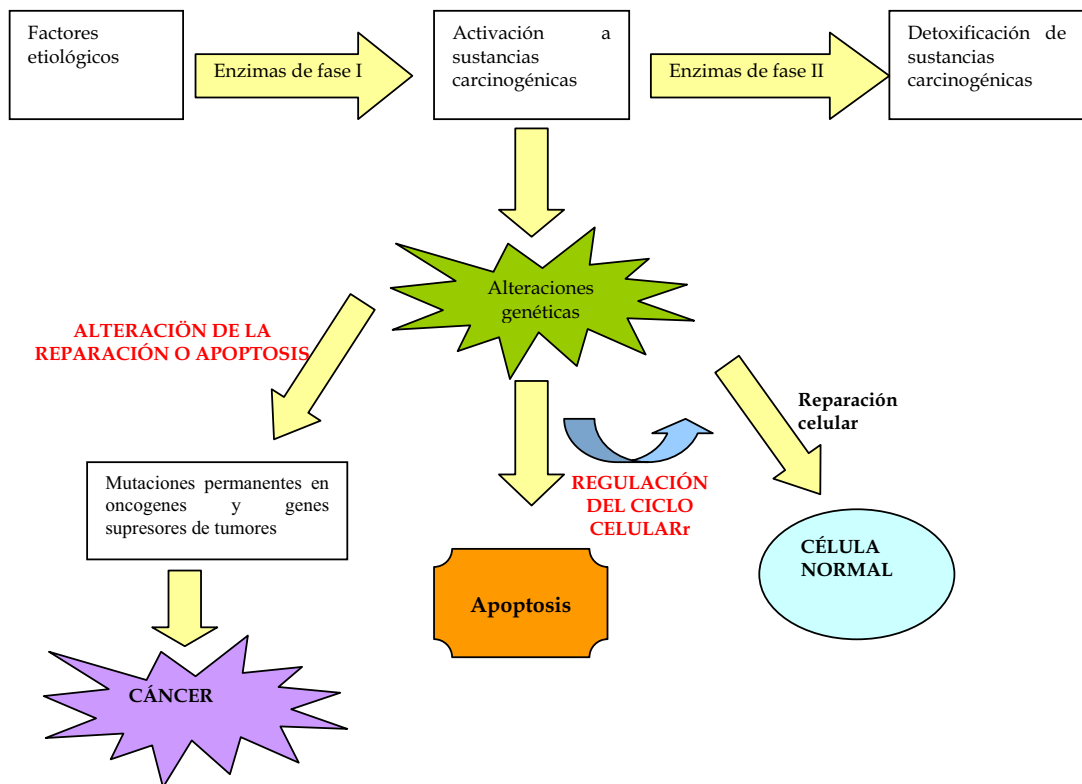
1.3.7. Otros factores de riesgo

El nivel educativo^{25,37} y la raza²⁹ se presentan también en algunos estudios como factores de riesgo para el cáncer de cavidad oral y faringe. Las infecciones por el Epstein Barr virus, el herpes virus y el citomegalovirus también se han propuesto como posibles factores de riesgo para estos tumores pero las evidencias no son suficientes para determinar su verdadera implicación.

1.4. Etapas en la carcinogénesis del cáncer de cavidad oral y faringe.

La carcinogénesis es un proceso multifactorial muy complejo que tiene lugar como resultado de una serie de acontecimientos aislados durante la iniciación y progresión a células malignas. Se mantiene la hipótesis de que una exposición prolongada a determinados agentes carcinogénicos, como el tabaco y el alcohol, ligada a una susceptibilidad genética, determinada en gran medida por la presencia de determinados polimorfismos genéticos que disminuyen la actividad de los enzimas encargados de la metabolización de estas sustancias (enzimas de fase I y fase II) puede ser responsable de la aparición de daños en genes individuales o daños en porciones del material genético, incluyendo los cromosomas⁸³. Entre las alteraciones genéticas más frecuentes cabe destacar: la pérdida de heterocigosidad, las deleciones, las traslaciones cromosómicas y las mutaciones genéticas como la amplificación, sustitución de pares de bases, inserciones y deleciones y pérdidas alélicas. La acumulación de estas alteraciones en el ADN podría desencadenar una serie de transformaciones en la célula que alteran el funcionamiento normal y ocasionan múltiples mutaciones permanentes en los genes. Cuando estos genes se corresponden con los genes encargados de la regulación celular, como es el caso de los oncogenes y los genes supresores de tumores, las células adquieren un ciclo celular diferente a las de su entorno y se convierten en células tumorales⁸⁴.

En la figura 12 se ilustra el proceso de la carcinogénesis.

Figura 12. Mecanismos de la carcinogénesis⁸⁴.

Los oncogenes proceden de los protooncogenes, que son responsables de la codificación de proteínas que intervienen en la homeostasis celular, es decir, mediadoras de las señales de crecimiento y diferenciación celular. Cuando un proto-oncogen se altera y se activa para dar lugar a un oncogen, puede promover la proliferación celular incontrolada y llevar a la carcinogénesis. Los genes supresores de tumores son genes encargados de inhibir el crecimiento celular, y controlar el proceso de reparación y apoptosis. La inactivación de estos genes, al igual que en el caso anterior podría llevar a un crecimiento descontrolado.

Las alteraciones en los oncogenes y genes supresores de tumores pueden ser heredadas o adquiridas como consecuencia de diversas exposiciones a sustancias carcinogénicas. Mientras que en el caso de los oncogenes la mayoría son adquiridas, en el caso de los genes supresores de tumores muchas son heredadas.

Se han descrito diversas alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores que han sido relacionados con la exposición al tabaco. De las mutaciones en los oncogenes, las que han sido asociadas con frecuencia al cáncer oral y a otros tumores de cabeza y cuello son: 1) la sobreexpresión de los oncogenes K-ras y H-ras, 2) la amplificación del gen PRAD-1 (ciclina D1/bcl1), que codifica para la ciclina D1/PRAD1/CCD1 y activa el pRb por fosforilación, 3) la activación de los c-myc y N-myc y 4) la sobre-expresión del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) y de su ligando, el factor de crecimiento TGF- α .^{83,85}

El gen supresor de tumores p53 es el gen mutado con más frecuencia en los cánceres de la cavidad oral, observando mutaciones hasta el 39% de los casos⁸³. La función del gen p53 es mantener la estabilidad genética, frenando el ciclo celular durante un tiempo suficiente para permitir la reparación celular y/o induciendo la apoptosis. De forma general, este gen aparece mutado en al menos la mitad de los tumores que aparecen en humanos, por lo que se considera que su función es crítica para evitar la aparición de tumores. Las mutaciones a nivel del gen p53 pueden ser heredadas o inducidas por diversos agentes exógenos, entre ellos el tabaco y el alcohol⁸⁶.

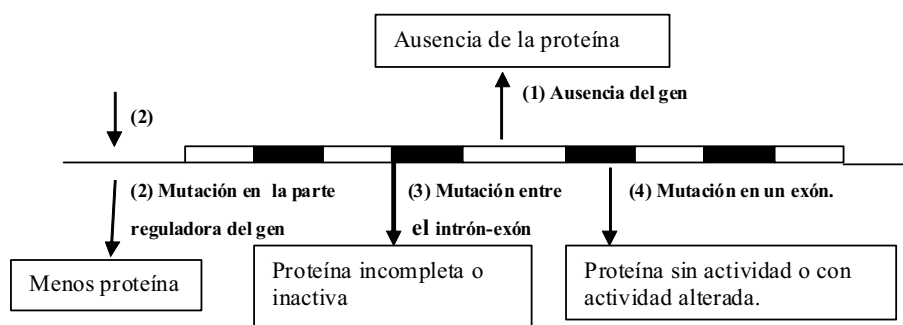
Se ha propuesto que las mutaciones aisladas en los oncogenes o genes supresores de tumores no son suficientes para iniciar el proceso de carcinogénesis. In vitro, *Goessel et al*⁸⁷ propusieron un posible modelo de desarrollo de cáncer oral y cáncer de esófago. Según este modelo la sobre-expresión de la ciclina D1 y la inactivación del p53 originaba una inmortalización de los queratinocitos. A continuación, la sobre-expresión del factor de crecimiento epitelial, seguida de una sobre-expresión c-myc y una inducción del factor de crecimiento epidérmico ocasionaba una transformación de las células epiteliales en malignas⁸⁷.

1.5. Enzimas de “fase I” y “fase II” en la carcinogénesis

Los compuestos carcinogénicos tal y como se encuentran en la naturaleza son habitualmente inertes y necesitan de una activación metabólica para convertirse en intermediarios electrofílicos capaces de unirse a macromoléculas celulares, tales como el ADN. La activación metabólica se produce principalmente por los enzimas denominados de fase I, grupo formado casi exclusivamente por la familia del citocromo P450. Los enzimas de fase II (la glutatión S-transferasa, la epóxido hidrolasa, la N-acetil transferasa, la sulfotransferasa, entre otros) actúan en la detoxificación de estos intermediarios genotóxicos aunque se sabe que también pueden actuar por sí mismos en la activación de determinadas sustancias químicas como el *benzo[a]pireno* y las *arilaminas*.

En la actualidad se reconoce que en la población general los enzimas de metabolización presentan diversos polimorfismos genéticos que vienen determinados genéticamente y que actúan como modificadores de efecto. Los polimorfismos genéticos son los responsables de las variaciones interindividuales en los niveles y las actividades de un gran número de enzimas encargados de la metabolización de sustancias genotóxicas. Dependiendo de la localización de la mutación en los genes que codifican estas proteínas enzimáticas, el resultado puede ser una disminución o ausencia del enzima o un enzima con una actividad alterada o totalmente inactivo (Fig 13), creando diferencias de susceptibilidad importantes frente a determinadas sustancias cancerígenas, de ahí su consideración como factores de susceptibilidad.

Figura 13. Diagrama de los diferentes tipos de polimorfismos genéticos que condicionan el funcionamiento anormal de las enzimas.



1.5.1. Citocromos P450

1.5.1.1. Antecedentes

Se cree que los citocromos P450 existieron desde el comienzo de la vida en la tierra, hace 3.5 billones de años. La palabra "Citocromo" procede del griego y literalmente significa "*sustancia coloreada*". La propiedad de adquirir color se la confieren los electrones externos de elementos de transición como el hierro (Fe). El término "P-450" hace referencia a un pigmento rojizo cuyo pico principal de absorción en cromatografía aparece aproximadamente a los 450 nm. Los primeros organismos probablemente utilizaron estas enzimas para la síntesis y metabolismo de moléculas esteroideas que formaban parte de la membrana celular⁸⁸. Se ha propuesto que debido a la necesidad de detoxificar ciertas toxinas naturales presentes en la dieta de los animales, estos sistemas evolucionaron y desde hace 400 o 500 millones de años sirven para metabolizar agentes químicos, entre los que se encuentran multitud de medicamentos.

En la actualidad "P-450" describe una familia de hemoproteínas (monooxigenasas que contienen un grupo hemo) considerada como la más importante en la activación de compuestos cancerígenos. Se reconoce la existencia de más de 270

familias CYP. Los humanos presentan 57 genes P450 aparentemente funcionales y 33 pseudogenes organizados en 18 familias y 42 subfamilias⁸⁹. Aunque durante muchos años existieron diferentes nomenclaturas para denominar a estos genes, miembros del comité para la nomenclatura CYP y miembros de la IARC acordaron que la nomenclatura sería la acordada en la página web <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>^{90,91}. Esta página web proporciona información actualizada sobre las diferentes variantes alélicas que se van descubriendo. Para nombrar el gen (Citocromo P450) se emplea el símbolo CYP, a continuación se le asigna un número para designar la familia, una letra para indicar la subfamilia y por último un número para representar al gen individual.

1.5.1.2. CYPs y activación de sustancias precancerígenas

Los CYP1A1 y 1A2 son junto con el CYP2E1, CYP2D6 y el 3A4 los citocromos P450 encargados de la activación de la gran mayoría de las sustancias precáncerígenas presentes en el medio ambiente e identificadas en el humo de tabaco. A continuación se detallan los mecanismos de detoxificación de las sustancias principales.

✓ *Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH)*

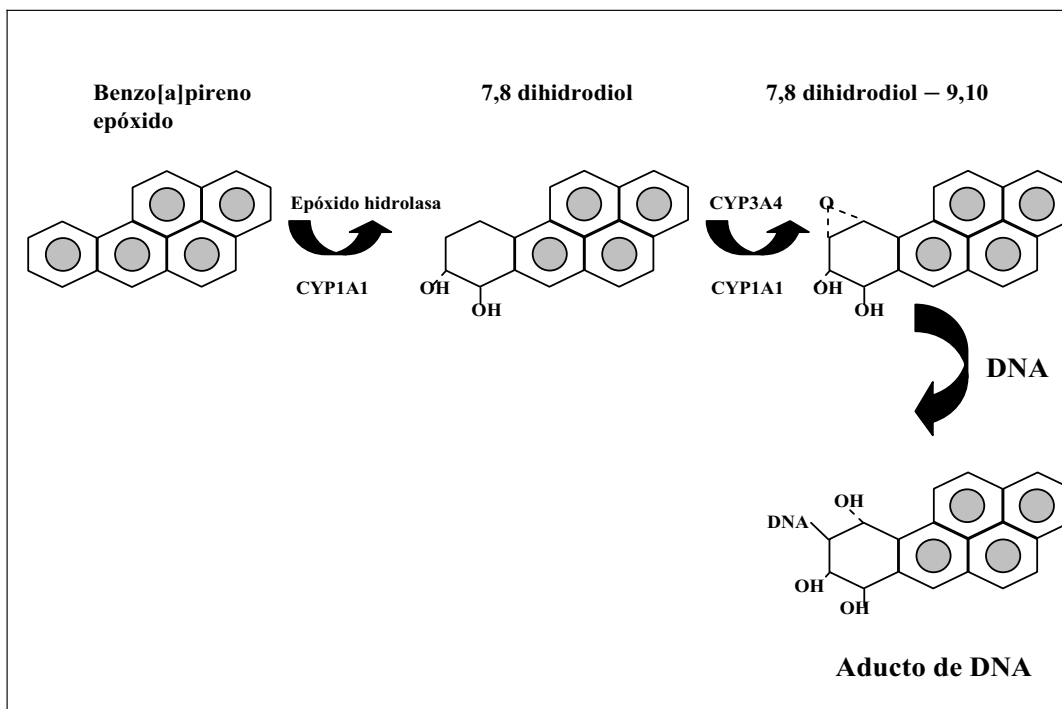
El CYP1A1 es uno de los principales enzimas implicados en la metabolización de hidrocarburos aromáticos policíclicos. De forma general, el CYP1A1 o el CYP1B1 participan en las etapas iniciales para producir un intermediario que se transforma mediante el CYP1A1, 1B1, 3A4, 1A2, 2B6 o 2C9 en un diolepóxido capaz de unirse de forma covalente con el ADN y originar lesiones irreversibles en el ADN⁹².

El benzo[a]pireno que es el PAH por excelencia, necesita de la activación del CYP1A1 para su conversión a la estructura capaz de unirse al ADN, el 7,8 dihidrodiol 9,10 epóxido. Diversos estudios demuestran que la conversión inicial del benzo[a]pireno a 7,8 dihidrodiol está catalizada por los sistemas CYP1A1 y la

epóxido hidrolasa microsomal y su posterior transformación en el carcinógeno final, el diolepóxido, por el CYP3A4 en el hígado y pulmón⁹³ y de forma general por el CYP1A1 en tejidos extrahepáticos⁹⁴ (Fig. 14). Otros citocromos como el CYP1B1 muestran cierta afinidad por el metabolito intermedio.

El 7,12 dimetil benzo[a]antraceno y el benzo[b]fluoranteno son también agentes que necesitan del CYP1A1 ó CYP3A4 para su transformación aunque el CYP1A2, 2B6 y 2C9 también pueden contribuir⁹².

Figura 14. Mecanismo de activación del benzo[a]pireno



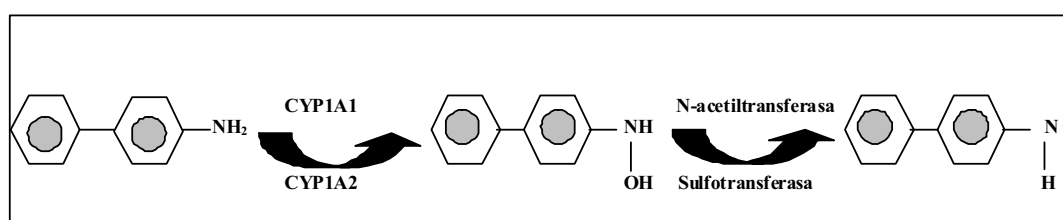
✓ *Aminas aromáticas heterocíclicas y arilaminas.*

Para la conversión de las aminas heterocíclicas en metabolitos mutagénicos es necesaria una N-hidroxilación seguida de una esterificación por la N-acetiltransferasa o sulfotransferasa para producir el éster que se transforma en el intermediario cancerígeno. La N-hidroxilación de las aminas heterocíclicas PhIP,

MeIQ, IQ, MeIQx se produce fundamentalmente por el CYP1A2 aunque el CYP1A1 también muestra cierta afinidad por estos compuestos. Para otras aminas heterocíclicas como el Trp P-1 el CYP1A1 es más efectivo⁹⁵.

Con respecto a las arilaminas, el CYP1A2, que es un enzima exclusivo del hígado, es considerado de forma general como el principal responsable de la N-hidroxilación del 2-aminofluoreno, 4-aminobifenil y 2-aminoantraceno⁹⁶. La conversión posterior en iones nitrenium se produce por acción de las transferasas cuando estos compuestos son transportados a otros órganos (Fig 15). Aunque existe un acuerdo general en cuanto a la actuación del CYP1A2, algunos estudios sugieren que para el 4-aminobifenil, el CYP1A1 tiene mayor actividad y el CY1B1 es más efectivo frente al 2-aminoantraceno. Para el 6-aminocriseno se han identificado dos vías de activación; una N-hidroxilación catalizada por el CYP3A4 y 2B6 y una epoxidación del 1,2 dihidrodiol catalizada principalmente por el CYP1A1 aunque también contribuyen el CYPA2, 1B1 y CYP3A4 en menor grado.

Figura 15. Conversión del 4-aminobifenil en un intermediario carcinogénico.

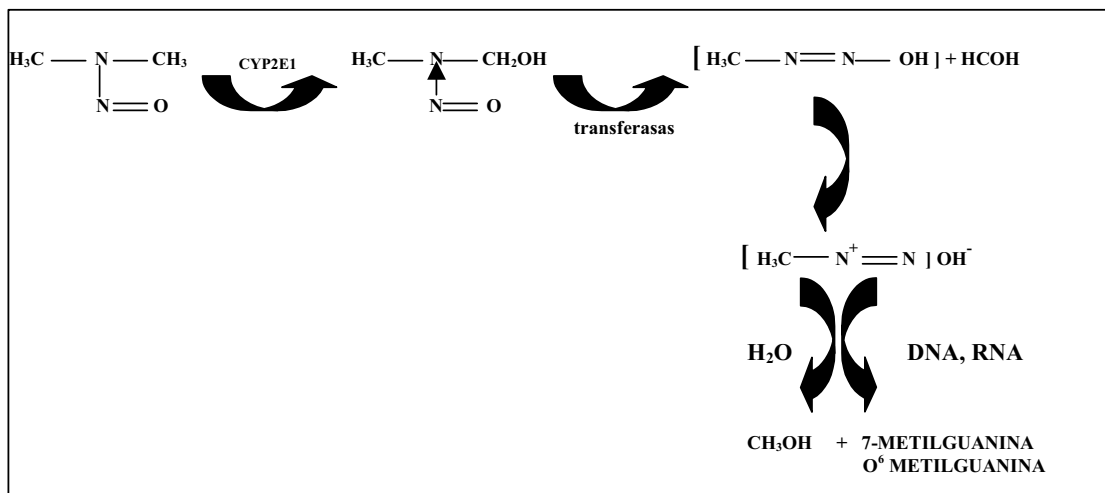


✓ *N-nitrosaminas*

Las N-nitrosaminas encontradas en el humo del tabaco, la NDMA, la NDEA, la NNN y la NNK, sufren un proceso de conversión mediado por los citocromos P450 similar a los dos compuestos anteriores; primero tiene lugar una α -hidroxilación y a continuación una conversión en un ión carbonium que actúa como agente alquilante del ADN y da lugar a la formación de aductos, entre los que destacan la 7-metilguanina, la O₆ metilguanina y O₄-metiltimina.

La N-nitrosodimetilamina, que ha sido la más estudiada, es metabolizada principalmente por el CYP2E1 para dar lugar a α -hidroxi NDMA que a continuación se rompe para dar lugar a formaldehído y un ión metanodiazonium que reacciona con el ADN y RNA para formar aductos⁹⁷ (Fig 16).

Figura 16. Mecanismo de activación de la N-nitrosodimetilamina.



Inicialmente se supuso que el CYP2E1 era el responsable de la activación de todos estos compuestos, pero en la actualidad se conoce que la α -hidroxilación de la NNN y NNK se atribuye mayoritariamente al CYP3A4, CYP2A6 y al CYP2D6^{96, 98}. Las dos nitrosaminas de menor peso molecular, la NDMA y la NDEA son metabolizadas por los sistemas CYP2E1 y CYP2A6^{96,99}.

✓ *Otras sustancias carcinogénicas*

Aunque los grupos de compuestos citados con anterioridad se consideran quizás los más importantes en cuanto a su actividad carcinogénica, otras sustancias como el benceno, el etileno, el cloroformo y los derivados del vinilo se encuentran con frecuencia en el medio ambiente y son también genotóxicos. Estos compuestos se activan fundamentalmente por el CYP2E1, que es un enzima que metaboliza un

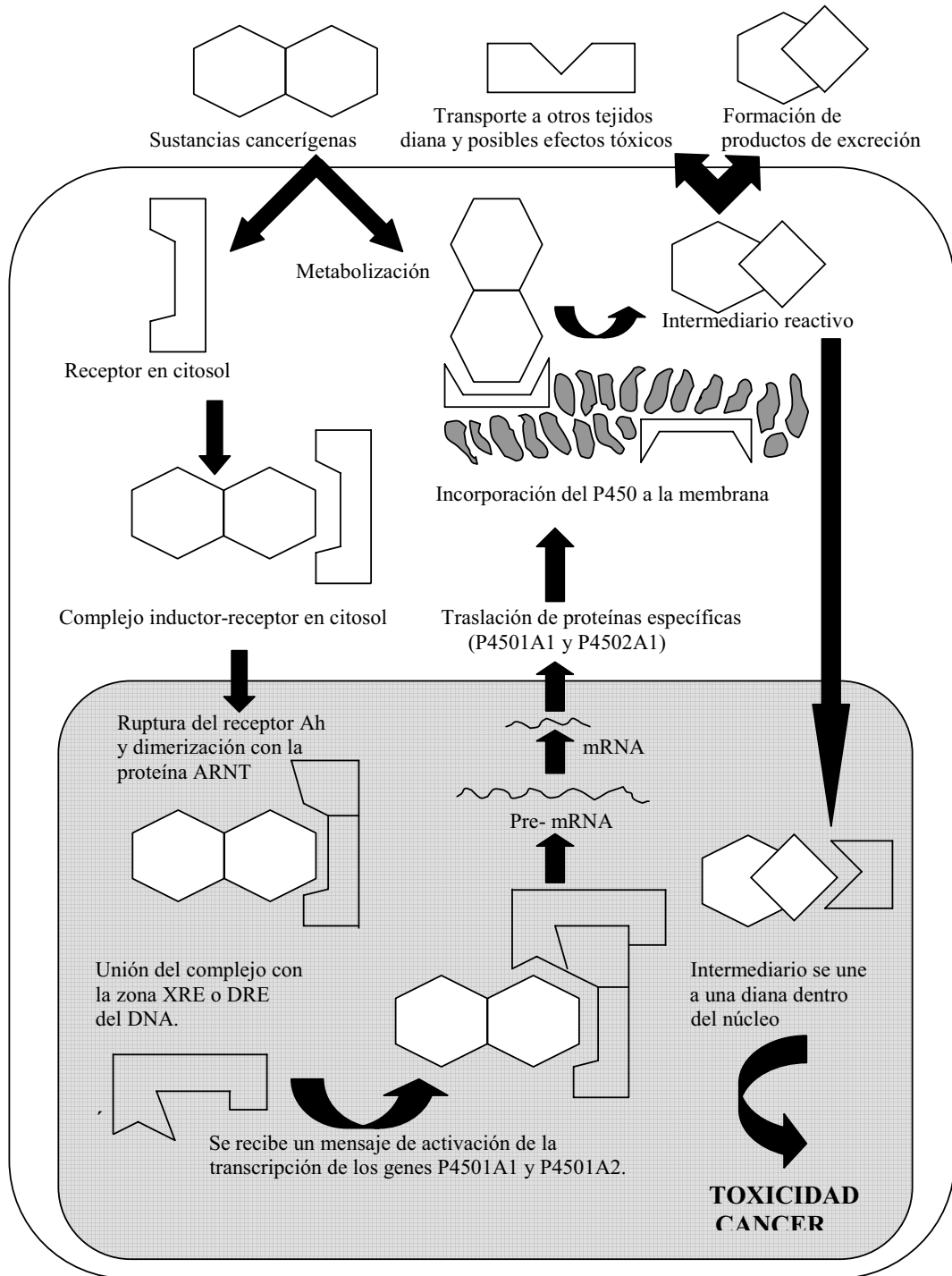
número elevado de moléculas de bajo peso molecular incluyendo también el etanol ^{98,100}.

1.5.1.3. Citocromo P4501A1

✓ *Mecanismo de activación e inducción*

Estudios llevados a cabo en ratones demuestran que tras la entrada en la célula por difusión pasiva, los compuestos precancerígenos forman un complejo con el receptor Ah presente en el citosol. Como consecuencia de esta unión se produce una disociación de la proteína “heat shock” del receptor y una dimerización con la proteína ARNT. El complejo formado interacciona con la zona XRE o DRE del ADN y se produce una activación de la transcripción de los genes P4501A1 y P4501A2, pero también de otros genes de enzimas de la fase II, como la Glutathion S-transferasa, la glucuroniltransferasa, etc¹⁰¹. El aumento de los niveles enzimáticos da lugar a una mayor metabolización de las sustancias, originando intermediarios reactivos que pueden transformarse en productos inocuos fácilmente excretables o pueden unirse a compuestos endógenos como el ADN y dar lugar a fenómenos de toxicidad o, cuando la exposición es prolongada, originar alteraciones irreversibles, que en ciertas circunstancias hacen que éstas células se transformen en malignas. En la figura 17 se ilustran las distintas etapas en la activación e inducción del los citromos P4501A1 y P4501A2¹⁰¹.

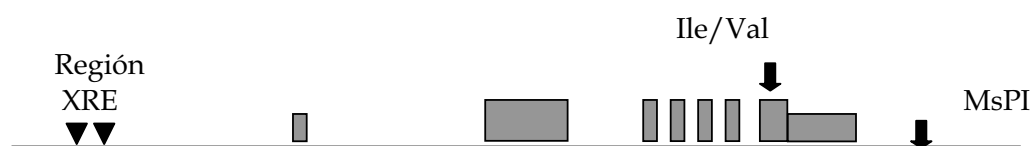
Figura 17. Etapas en la activación e inducción de los CYP 1A1 y CYP1A2.



✓ *Polimorfismos genéticos del CYP1A1*

El gen P450 1A1 ha sido localizado en el cromosoma 15q22-24¹⁰² y tras su clonación se han identificado varios polimorfismos, destacando entre ellos el CYP1A1*2B (MspI) y el CYP1A1*2C (Ile/Val o Ile⁴⁶²Val)¹⁰³. El primer alelo presenta una sustitución de timina por citosina a nivel de la posición 3801, creando un lugar de restricción MspI. El homocigoto predominante (m1m1) tiene una zona MspI ausente, el alelo homocigoto raro (m2m2) una sustitución de timina por citosina en esta zona y el heterocigoto (m1m2) tiene ambos alelos. El polimorfismo de la Isoleucina-Valina (Ile/Val) se produce como consecuencia de una sustitución de adenina por guanina en la posición 2455 del exón 7 del gen CYP1A1, que origina a su vez una sustitución de isoleucina por valina en el codón 462 del aminoácido, dando lugar a alelos heterocigotos (Ile/Val) y homocigotos (Val/Val). En caucásicos, este polimorfismo se considera que está directamente ligado al CYP1A1 MspI (CYP1A1*2B)¹⁰⁴. A nivel del exón 7 también se ha descrito otro polimorfismo que resulta de una sustitución de citosina por adenina en la posición 2453, ocasionando una sustitución Thr⁴⁶¹Asn (CYP1A1*4)¹⁰⁵.

Figura 18. Estructura del gen P4501A1 humano y localización de los polimorfismos genéticos.



✓ *Correlación de los distintos polimorfismos del CYP1A1 con la capacidad de inducción, actividad enzimática y biomarcadores de efecto.*

Teniendo en cuenta que tras la exposición a distintas sustancias carcinogénicas se activan los mecanismos de transcripción de los enzimas responsables de su metabolización, es lógico pensar que cualquier polimorfismo que altere la inducción de la transcripción del gen P450 aumentando o disminuyendo la síntesis

de proteínas (enzimas P450) o dé lugar a proteínas con distinta estructura y actividad puede originar diferencias genéticas de susceptibilidad.

Los estudios llevados a cabo para valorar la capacidad de inducción enzimática de los distintos polimorfismos CYP1A1 muestran resultados muy contradictorios. Mientras que *Crofts et al*¹⁰⁶ concluyen que no existen diferencias para los distintos alelos del MspI y que en los genotipos que contienen Val se aprecia una mayor capacidad de inducción, *Kiyohara et al*¹⁰⁷ establecen que la correlación existe para los polimorfismos del MspI y que no se encuentra asociación para el polimorfismo Ile/Val.

Los resultados de los ensayos in vitro realizados para evaluar la actividad catalizadora de las dos proteínas del CYP1A1, originadas cuando en la región hemo se sustituye la Ile por la Val, tampoco son concordantes. En Japón, los resultados de *Kawajiri et al*¹⁰⁸ mostraron que, aunque la actividad enzimática hacia el benzo[a]pireno es baja para ambas proteínas, la que contiene Val sobresale en actividad y mutagenicidad. En EEUU, *Crofts et al*¹⁰⁶ confirmaron estos resultados y hallaron una actividad 3 veces mayor en los portadores de los genotipos con Val. Otros autores^{109, 110} concluyeron que la formación de los metabolitos del benzo[a]pireno era comparable en las dos formas alélicas expresadas en el E.coli, encontrando incluso para el CYP1A1^{Ile} una actividad 3 veces mayor en la formación del 7,8-dihidrodiol.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos, tras haber sufrido un proceso de metabolización, en el que participa el enzima CYP1A1, se transforman en aductos de ADN. La determinación de estos aductos de ADN en linfocitos periféricos debería reflejar el efecto de los enzimas de metabolización pero los resultados no son concluyentes. *Rothman et al*¹¹¹ en una población de bomberos americanos consumidores de churrasco mostraron que los individuos con el alelo homocigoto (Val/Val) tenían niveles mas altos de aductos de ADN, aunque las diferencias

eran no significativas. *Mooney et al*¹¹² también encontraron que los grandes fumadores con este genotipo mostraban un mayor daño genético que los individuos con los otros dos alelos. En Suecia, *Ichiba et al*¹¹³ no llegaron a encontrar ninguna relación para el polimorfismo Ile/Val en limpiadores de chimeneas y paradójicamente observaron un aumento significativo de los aductos de ADN en individuos portadores del alelo homocigoto predominante del MspI (genotipo A). En pacientes con cáncer de pulmón *Shields et al*¹¹⁴ tampoco encuentran ninguna asociación entre los niveles de aductos y los polimorfismos Ile/Val.

1.5.2. Glutathion S-transferasas (GST)

1.5.2.1. Antecedentes

Se cree que las GST, al igual que los citocromos P450, existieron desde el comienzo de la vida en todas las especies eucariotas para garantizar su supervivencia frente a los productos nocivos generados por el propio organismo como consecuencia del estrés oxidativo. Estos sistemas se adaptaron y evolucionaron a medida que surgieron cambios medio-ambientales (temperatura, contaminación) o necesidades de detoxificar nuevas sustancias genotóxicas presentes en la dieta.

Aunque no existen criterios claros para denominar a las GST, en ratas y humanos se han agrupado en 5 familias (alfa, mu, pi, sigma, theta) en función de la homología encontrada en la secuencia de amino ácidos en el extremo N-terminal de la proteína¹¹⁵. Se acepta que cuando existe una similitud mayor al 40% un isoenzima se puede incluir en una determinada clase. En humanos se han identificado 4 clases; la clase alfa localizada en el cromosoma 6p12, la mu en el cromosoma 1p13, la pi en el cromosoma 11 y la theta en el cromosoma 22. Dentro de estas familias se han identificado varios isoenzimas para la clase alfa (A1-A12), mu (M1-M5), y theta (T1-T2) que presentan distintas subunidades formando monodímeros ó heterodímeros y que se designan según la estructura cuaternaria de la proteína en el caso de que el cADN haya sido aislado. La GSTM1, M2, M3, T1

y P1 se expresan en una gran variedad de tejidos incluyendo el epitelio de la cavidad oral¹¹⁶.

1.5.2.2. GST y detoxificación de sustancias cancerígenas.

Los isoenzimas de la GST catalizan una gran variedad de reacciones de detoxificación que tienen lugar entre el glutatión y compuestos electrofílicos. De forma general, los sustratos de la GST son compuestos genotóxicos o productos endógenos formados como consecuencia de la respiración aeróbica, las exposiciones a radiaciones ionizantes o cualquier proceso que cause daño celular.

Se ha sugerido que la GST actúa formando un complejo con el glutatión existente en el citosol para transformarlo en el ión tiolato (GS^-). Una vez formado, el complejo adquiere la capacidad de reaccionar de forma espontánea con compuestos con centros electrofílicos proporcionados por átomos de carbono, nitrógeno o azufre y el resultado suele ser un compuesto de menor actividad. Aunque el mecanismo de actuación es común a todas las GST, las diferentes subunidades confieren a cada isoenzima una actividad y especificidad determinada que puede variar en función de la especie. En humanos, la GSTM1, la GSTP1 y la GSTM1 son las isoenzimas responsables de la detoxificación de la mayor parte de las moléculas potencialmente carcinogénicas (Tabla 7).

Tabla 7. Isoenzimas responsables de la detoxificación de distintas sustancias potencialmente cancerígenas en humanos y ratas¹¹⁵

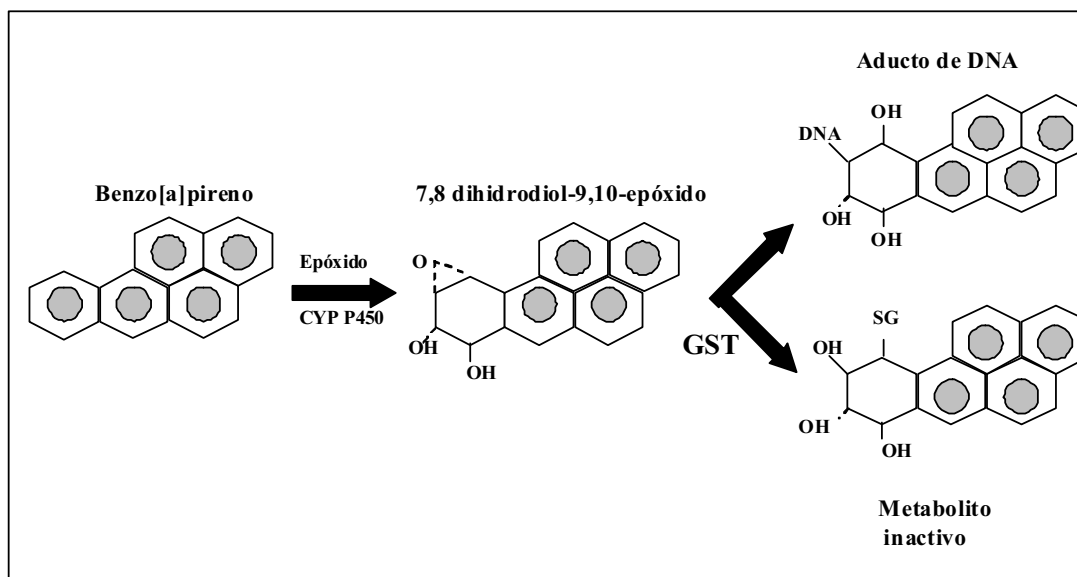
Sustancia potencialmente cancerígena	Subunidad con actividad en humanos	Subunidad con actividad en ratas
Benzo[a]pireno-7,8-diol-9,10-epóxido	M1, P1	M2, P1
Benzo[a]pireno 4,5-epóxido	M1, P1	M1, M2
4-fenil-3-buten-2-ona	M1,P1	M2
Benzo[a]antraceno-3,4-diol-2,2-epóxido	----	M2
Benzo[a]antraceno-8,9-diol-10,11-epóxido	----	M2
Benzo[a]antraceno-5,6-epóxido	----	M2
Criseno-1,2-diol-3,4-epóxido	----	M2
Sulfato de 5-Hidroximetilcriseno	----	T2
Dihidroximetilantraceno	----	T2
Aflatoxina B ₁ -8,9-endo-óxido	M1	M2
Oxido de estireno	M1	----
Oxido de estilbena	M1	----
4-nitroquinoleína-1-óxido	P1	M3
1-nitropireno-4,5-óxido	----	M1, M2
1-nitropireno-9,10-óxido	----	M1, M2
Acroleína	P1	----
N-Acetoxi-PhIP	A1,T1	A1, A2, A3, T2
CuOOH	A1,A2,T2	A3, P1, T1
Oxido de etileno	T1	----
Bromuro de metilo	T1	----
Cloruro de metilo	T1	----
1,3-butadieno	T1	----

A continuación se detalla el mecanismo de detoxificación de las principales sustancias carcinogénicas consideradas relevantes en el cáncer de cavidad oral y faringe.

✓ *Hidrocarburos aromáticos policíclicos.*

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos, por activación de la epóxido hidrolasa y de los CYP450 se transforman en metabolitos “diolepóxido”. Estos intermediarios tienen capacidad para unirse al ADN y originar efectos cancerígenos pero también pueden conjugarse con el glutatión (GS⁻) y dar lugar a compuestos inactivos fácilmente excretables. En humanos, la *GSTM1* y *P1* son los principales isoenzimas responsables de la detoxificación del benzo[a]pireno-7,8-diol-9,10-óxido, que es el principal carcinógeno encontrado en el humo del tabaco, y también de la 4-fenil-3-buten-2-ona^{117,118} (Fig. 19).

Figura 19. Desactivación del benzo[a]pireno por parte de la GST



✓ *Aminas heterocíclicas*

Una vez producido el derivado N-acetoxi las aminas aromáticas se consideran altamente cancerígenas. Estudios llevados a cabo in vitro utilizando GSTs humanas concluyen que la GSTA1-1, la GSTA1-2 y la GSTT2-2 actúan inhibiendo de alguna manera la unión del N-acetoxi- PhIP al ADN, actuando así en la detoxificación de esta sustancia. El papel que juegan estos enzimas en la desactivación del resto de las aminas no está muy claro. Se ha encontrado que la formación de aductos de ADN con el N-acetoxi MeIQx y el N-acetoxi IQ no se ve influenciada por la GST, pero la presencia de glutathione sí influye en la unión de estos intermediarios, sugiriendo que la desactivación se produce por una reacción no enzimática con el glutathione¹¹⁹.

✓ *Otras sustancias cancerígenas.*

A pesar de no estar muy clara la actuación del etanol como agente cancerígeno, se ha sugerido que el acetaldehído puede ser el responsable de ciertas alteraciones

producidas en el ADN que podrían desencadenar la aparición de tumores⁵⁰. El etanol ingerido se metaboliza en el hígado y se transforma en acetaldehído por acción de la alcohol dehidrogenasa y de la GSTM1. A continuación sufre otra transformación a acetato para finalmente convertirse en CO₂ y H₂O.

Aunque las GSTs no parecen estar implicadas en la desactivación de las N-nitrosaminas, sí intervienen en la detoxificación de otras sustancias químicas encontradas en el humo de tabaco y utilizadas con frecuencia en el medio laboral. *Pemble et al*¹²⁰ propusieron que la GSTT1 es la principal encargada de desactivar un gran número de agentes metilantes, solventes industriales y pesticidas, entre los que se encuentran los monohalometanos (cloruro de metilo, bromuro de metilo), el 1-3 butadieno, el óxido de etileno y el óxido de estilbena¹²⁰. Paradójicamente, la GSTT1 también puede intervenir en la activación de los dihalometanos y dihaloetanos encontrados en esas mismas fuentes. La GSTT1 cataliza la reacción entre los 1,2-dihaloalcanos y la GS⁻ para dar lugar a intermediarios altamente electrofílicos que actúan como agentes alquilantes y forman complejos con el ADN.

1.5.2.3. Mecanismos de activación e inducción de las GST.

Los mecanismos de activación de las GST son muy complejos y de forma general los compuestos inductores se pueden agrupar en 2 categorías; inductores monofuncionales e inductores bifuncionales.

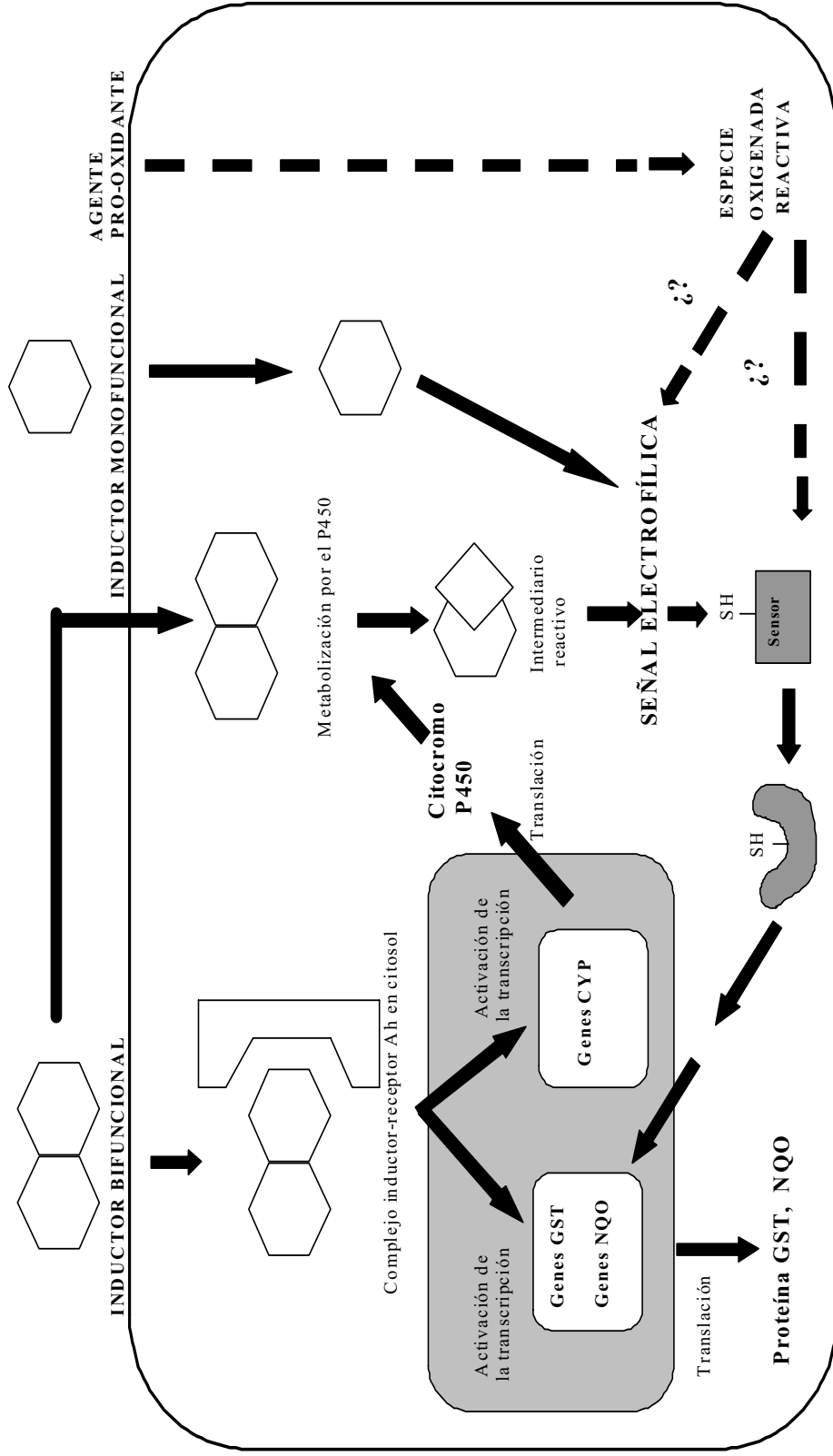
Los inductores bifuncionales, como el benzo[a]pireno, son compuestos que necesitan formar un complejo con el receptor Ah presente en el citosol para poder llegar a metabolizarse. El complejo formado interacciona o bien directamente con la zona XRE del gen GST y activa la transcripción de la enzima o actúa sobre la zona XRE del P4501A1 o 1A2 transformándose en un intermediario electrofílico con capacidad para actuar sobre el elemento de respuesta antioxidante (ARE) del gen GST y activar igualmente la transcripción y translación. Existen determinadas

sustancias como la tetraclorodibenzo-p-dioxina que sólo pueden inducir a la GST a través de la zona XRE y otras como los PAH y sus metabolitos, que actúan a través de los dos mecanismos¹²¹.

Los inductores monofuncionales son compuestos que contienen centros deficientes en electrones y actúan directamente sobre la zona ARE. La producción de especies oxigenadas reactivas en el organismo también da lugar a una inducción de las enzimas de la GST, aunque se desconoce si actúan directamente o es necesaria una reacción con otras moléculas dentro de la célula para originar intermediarios electrofílicos^{121,122}.

En la figura 20 se ilustran las diferentes etapas en la activación e inducción de la GST por inductores monofuncionales y bifuncionales.

Figura 20. Distintas etapas en la activación e inducción de la GST.



✓ *Polimorfismos genéticos de la GSTM1*

La GSTM1 pertenece a los genes de la clase mu identificados en el cromosoma 1p13 y expresados en un gran número de tejidos. En la actualidad se han descrito tres polimorfismos para este gen: el *GSTM1*A*, el *GSTM1*B* y el *GSTM1-0*. El *GSTM1A* y el *GSTM1B* difieren en una sustitución de citosina por guanina en la posición 534¹²³. Esta variante da lugar a monodímeros (*GSTM1A-1A*, *GSTM1B-1B*) o heterodímeros (*GSTM1a-1b*) con una sustitución de lisina por asparragina en la posición 172. Estudios in vitro parecen indicar que los dos alelos tienen actividades catalíticas similares¹²⁴. El alelo *GSTM1-0* también denominado genotipo nulo, se caracteriza por tener una delección en esta posición impidiendo la síntesis de la proteína GST.

✓ *Relación entre los polimorfismos de la GSTM1 y distintos biomarcadores de efecto.*

Dado que la GSTM1 actúa en la detoxificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, el grupo de cancerígenos ambientales más importantes, cabe esperar que los individuos con el genotipo nulo de la GSTM1 tengan una capacidad deficiente para desactivar compuestos como el benzo[a]pireno y como consecuencia se encuentre un aumento en los niveles de aductos de ADN, así como alteraciones en otros biomarcadores de daño genético (el intercambio de cromátides hermanas (SCE), los micronúcleos (MN) en linfocitos y las aberraciones cromosómicas).

No obstante, los estudios llevados a cabo para evaluar el efecto del polimorfismo GSTM1 en distintos grupos ocupacionalmente expuestos a hidrocarburos aromáticos policíclicos muestran resultados discordantes, quizá debido a los distintos niveles y fuentes de exposición. *Hemminki et al*¹²⁵ en 85 trabajadores de una fundición expuestos a niveles bajos de PAH, observaron que los aductos de ADN determinados en linfocitos eran independientes del

genotipo GSTM1. Estudios llevados a cabo en trabajadores de hornos de coque, expuestos a niveles mucho más altos de PAH, tampoco encontraron diferencias en los aductos de ADN, en el intercambio de cromátides ni en las aberraciones cromosómicas^{126, 127}. A diferencia de los anteriores, *Rojas et al*¹²⁸ en un estudio en el que los trabajadores de hornos de coque eran mayoritariamente fumadores encontraron que la totalidad de 59 individuos con el genotipo activo no tenían niveles detectables de aductos, mientras que los niveles eran apreciables en el 93% (69/74) de los sujetos con el genotipo GSTM1-0. Los 5 individuos GSTM1-0 que no tenían aductos detectables eran no fumadores o estaban expuestos a niveles bajos de PAH. De acuerdo con los anteriores, *Sram et al*¹²⁹, en un grupo de 90 conductores de autobuses, incluyendo fumadores, también mostraron unos niveles de aductos significativamente mayores que los que no expresaron este gen. *Hou et al*¹³⁰ no apreciaron diferencias significativas en 47 mecánicos de autobuses y 22 controles no fumadores.

La influencia de los polimorfismos GSTM1 en la formación de aductos de ADN en fumadores tampoco parece estar del todo clara, existiendo evidencias de que la asociación puede depender en gran medida del tejido en el que se haga la determinación, de las exposiciones acumuladas a lo largo de la vida y del consumo de ciertos nutrientes. *Grinberg-Funes et al*¹³¹ no observaron un aumento en los niveles de aductos de ADN en plasma para los fumadores con el genotipo nulo pero dicha asociación se hizo evidente cuando se estratificó por consumo de vitamina C. *Mooney et al*¹¹² en grandes fumadores sólo encontraron diferencias para los individuos GSTM1-0 cuando se tuvieron en cuenta los niveles de beta-caroteno, sugiriendo que los fumadores GSTM1-0 con niveles bajos de micronutrientes sufren un mayor daño genético. Diversos estudios llevados a cabo en el pulmón parecen concluir que en fumadores los niveles de aductos de ADN son mayores para los individuos con genotipos nulos^{132, 133}.

La frecuencia de intercambio de cromátides hermanas y la formación de micronúcleos en los linfocitos tampoco parece verse afectada por el genotipo nulo de la GSTM1 cuando se tiene sólo en cuenta el tabaco. *Rothman et al*¹³⁴ informaron de un elevado número de aberraciones cromosómicas en los grandes fumadores con el alelo GSTM1-0 pero no hallaron diferencias en los SCE ó MN. *Cheng et al*¹³⁵ encontraron una relación entre el GSTM1-0 y la frecuencia de SCE pero para los individuos no fumadores. El grupo de *Van Poppel et al*¹³⁶ sí detectaron mayores frecuencias de intercambios de cromátides en los fumadores.

1.5.3. Epóxido hidrolasas (EH)

1.5.3.1. Antecedentes y Nomenclatura

Las epóxido hidrolasas engloban a un grupo de enzimas que se caracterizan por añadir agua a los epóxidos y dar lugar a los correspondientes grupos diol y trans-dihidrodiol¹³⁷. Las epóxido hidrolasas se agrupan según la actividad enzimática y la separación bioquímica. En mamíferos se reconoce la existencia de 5 clases: las epóxido hidrolasas solubles o citosólicas (sEH), las epóxido hidrolasas microsomales (mEH) que se localizan en el retículo endoplásmico de las mitocondrias, la leucotrieno A₄ hidrolasa (LTA₄H), la colesterol epóxido hidrolasa y la hepoxilina hidrolasa¹³⁸. La LTA₄H y las formas solubles se caracterizan por su función en el metabolismo de sustancias endógenas. Intervienen en la síntesis de muchos productos derivados del ácido araquidónico, precursor de moléculas tan importantes para el organismo humano como las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. La forma microsomal mEH, en combinación con la sEH también actúa disminuyendo el efecto del estrés oxidativo causado por diversos agentes endógenos, pero su especial interés en la carcinogénesis deriva de su participación en la detoxificación de agentes genotóxicos y cáncérigenos. Estas enzimas hidrolizan

a los epóxidos para dar lugar a moléculas menos reactivas, menos mutagénicas y más solubles, facilitando así su excreción del organismo.

A pesar de la actual teoría de que los sistemas enzimáticos en mamíferos fueron evolucionando para defendernos de las sustancias nocivas, está todavía por esclarecer el origen y la relación que existe entre los enzimas que forman parte de este grupo. *Beetham et al*¹²⁶ analizan la secuencia de aminoácidos y en función de la homología encontrada entre las epóxido hidrolasas solubles y las dihalogenasas bacterianas sugieren que probablemente estos enzimas deriven de una fusión entre estos genes. La similitud entre las epóxido hidrolasas microsomales y las solubles indican que posiblemente el origen esté en una duplicación de los genes de las epóxido hidrolasas solubles. La falta de analogía con la LTA₄H parece implicar que este enzima proviene de una línea genética totalmente distinta.

1.5.3.2. Detoxificación de sustancias cancerígenas en humanos.

Las epóxido hidrolasas microsomales son la principales enzimas encargadas de la detoxificación de las sustancias cancerígenas exógenas. La mEH metaboliza un gran número de óxidos de alquenos, arenos y epóxidos del grupo de los hidrocarburos aromáticos y aminas heterocíclicas. Cabe destacar entre ellos el benzo[a]pireno, el benzo[a]antraceno y el criseno encontrados en el humo de tabaco. Enzimáticamente la mEH cataliza la hidrólisis de epóxidos a trans-dihidrodiolios¹³⁸. Aunque la conversión de los epóxidos es frecuentemente una reacción de inactivación, los metabolitos trans-dihidrodiol pueden sufrir posteriores activaciones por los citocromos P450 y dar lugar a intermediarios electrofílicos que pueden unirse de forma covalente al ADN e iniciar el proceso tumoral. El potencial carcinogénico de estas sustancias viene determinado en gran medida por la selectividad en la epoxidación por parte del citocromo P450 y en la hidratación por parte de las epóxido hidrolasas. Por ejemplo si el benzo[a]pireno se activa de forma predominante al 7,8-diol-9,10-epóxido, es

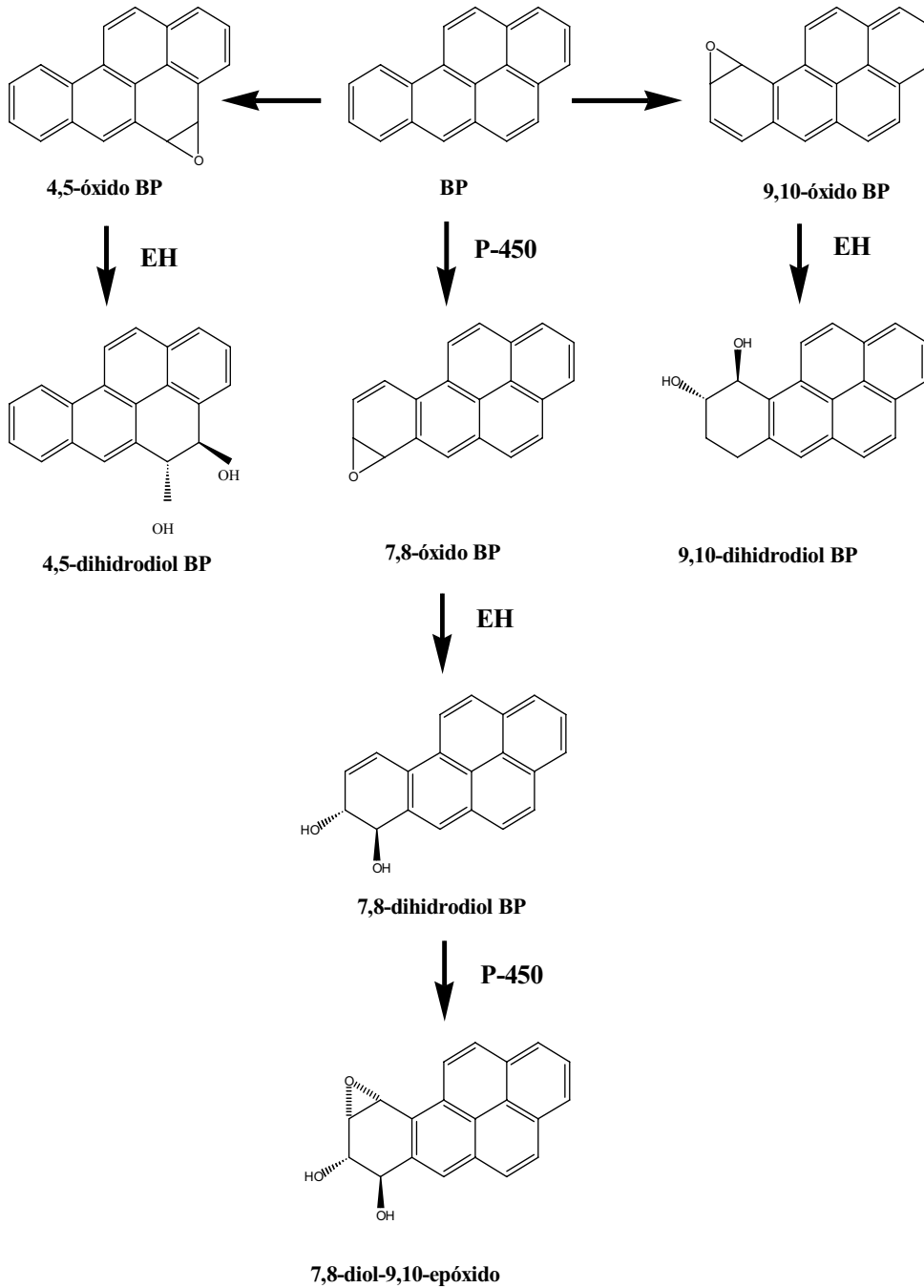
mucho más mutagénico y carcinogénico que el resto de los diol-epóxidos formados¹³⁹ (Fig 21).

La mEH también interviene en la detoxificación de otras sustancias carcinogénicas como el estireno y estudios llevados a cabo en *corynebacterium* parecen concluir que también puede actuar en el metabolismo del 1,3 dicloro-2-propanol (DCP) y el 3-cloro-1-2-epoxipropano. El DCP se utiliza como disolvente, intermediario en la síntesis de pinturas, barnices, lacas, acuarelas, etc.

1.5.3.3. Polimorfismos genéticos de las epóxido hidrolasas microsomales

El gen de la epóxido hidrolasa microsomal, también conocido como mEH, EPHX, EPHX1 o EPOX consiste en 9 exones y 8 intrones en el cromosoma 1q42.1. Hasta la actualidad se han notificado la existencia de dos polimorfismos en este gen^{140,141}. El primer polimorfismo se produce como consecuencia de una mutación de C por T a nivel del exón 3 del gen que codifica para este enzima, originando una sustitución de tirosina por histidina en el residuo 113. Esta variante alélica se ha conocido como el "alelo lento" ya que "in vitro" esta sustitución conlleva una disminución en la actividad del 40-60%^{140,141}. Este alelo se denomina el HYL*2. En el segundo polimorfismo la G sustituye a la A en el exón 4, ocasionando a su vez un emplazamiento de Histidina por Arginina en el residuo 139 (¹³⁹Arg→His). Este alelo se denomina el alelo rápido HYL*3 ya que como resultado de este cambio se produce un aumento del 25% en la actividad de la enzima. Teniendo en cuenta que las mutaciones pueden tener lugar de forma simultánea se podrían considerar otros dos alelos. El tercer alelo tendría dos mutaciones, una a nivel del residuo 113 y otra a nivel del residuo 139. El cuarto alelo no tendría mutación alguna.

Figura 21. Distintas vías de metabolización del benzo[a]pireno por parte de los citocromo P450 y la epóxido hidrolasa.



- ✓ *Correlación entre los polimorfismos de la mEH y la actividad enzimática “in vivo”.*

Teniendo en cuenta que los dos polimorfismos de la mEH afectan a la función de la enzima, algunos autores han presentado distintos índices para predecir su actividad in vivo. *Benhamou et al*¹⁴², basándose en estudios previos, categorizaron a la población en tres grupos de actividad (baja, intermedia y alta). *Smith y Harrison*¹⁴³ presentaron dos categorías: la primera, considerada de “actividad muy lenta” incluía a todos los individuos con His/His en el exón 3, independientemente del genotipo del exón 4; y la segunda englobaba al resto de los individuos. En la tabla 8 se exponen las dos modalidades y se puede observar que las actividades propuestas no son en algunos casos concordantes.

Tabla 8. Polimorfismos de la mEH y predicción de actividad.

Polimorfismo exón 4 (His ¹³⁹ Arg)	Polimorfismo exón 3 (Tyr ¹¹³ His)		
	Tyr/Tyr	Tyr/His	His/His
His/His	Intermedia ¹ <i>Intermedia</i> ²	Baja <i>Baja</i>	Baja <i>Muy baja</i>
His/Arg	Alta <i>Alta</i>	Intermedia <i>Intermedia</i>	Baja <i>Muy baja</i>
Arg/Arg	Alta <i>Alta</i>	Alta <i>Baja</i>	Intermedia <i>Muy baja</i>

¹ Clasificación de Benhamou et al¹⁴²

² Clasificación de Smith y Harrison¹⁴³

*Pastorelli et al*¹⁴⁴ llevaron a cabo una investigación en 44 pacientes con cáncer de pulmón y expuestos a hidrocarburos aromáticos policíclicos para averiguar si los polimorfismos influyen en los niveles de metabolitos en el organismo. En un principio los pacientes homocigotos y heterocigotos para la HYL*2 tendían a un menor número de aductos de ADN, aunque la diferencia no era significativa. Con respecto a la HYL*3 no se encontraba ninguna asociación con la frecuencia de aductos encontrados. Si se tenían en cuenta ambos alelos, los individuos con dos mutaciones en el exón 3 y ninguna en el exón 4 parecían tener una ausencia

de aductos de ADN. *London et al*¹⁴⁵ en función de estos hallazgos proponen que sólo los individuos con His/His en el exón 3 y 4 tienen una actividad reducida.

A pesar de las diferentes propuestas, algunas investigaciones sugieren que no es posible asignar una actividad basándose exclusivamente en la mutación en el exón 3 y 4, sino que influyen otros factores aún desconocidos¹⁴⁶. *Kitteringham et al*¹⁴⁷ presentan evidencias de que los niveles enzimáticos encontrados in vivo no se correlacionan con los datos predichos por el comportamiento in vitro.

1.5.4. Otras enzimas potencialmente relevantes en el cáncer de cavidad oral y faringe

Otras enzimas de metabolización potencialmente relevantes son las N-Acetil transferasas (NATs), las alcohol dehidrogenasas (ADH) y las aldehído dehidrogenasas (AD)⁸⁴.

Las NATs participan principalmente en la detoxificación de aminas e hidrazinas. En humanos se han identificado 3 genes: el pseudogen y 2 genes funcionales, la NAT1 y NAT2. Se han identificado polimorfismos de ambos genes funcionales que dan lugar a enzimas con una función alterada. El polimorfismo NAT1*10 ha sido asociado en algunas ocasiones al cáncer oral y de faringe. Respecto al NAT2, los polimorfismos más estudiados en relación con el cáncer de cavidad oral y faringe son el NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7 y NAT2*14 pero los resultados no son concordantes¹⁴⁸.

La alcohol deshidrogenasa (ADH) participa en la conversión del etanol a acetaldehído. La enzima está compuesta por 5 subunidades codificadas por 7 genes, ADH1 a ADH7. El ADH3 actualmente conocido como el ADH1C presenta dos alelos. El alelo ADH1C*1 (Ile349Val) presenta una mayor tasa de conversión de alcohol a acetaldehído y se ha asociado a un mayor riesgo de cáncer asociado al consumo de alcohol, aunque los resultados de un *pooled* análisis reciente de los estudios publicados no muestra una asociación importante con los tumores de cabeza y cuello¹⁴⁹. El ADH2 (ADH1B) también es

polimórfico y el alelo ADH1B*2 podría estar también asociado a un menor riesgo de padecer éste cáncer pero las evidencias no son concluyentes¹⁴⁸.

La aldehído deshidrogenasa (ALDH) también participa en la conversión de acetaldehído a acetato. La mayor parte del acetaldehído producido en el organismo es eliminado por el ALDH2. El alelo ALDH2*2, se considera inactivo. Su presencia ocasiona una acumulación de acetaldehído y también se ha relacionado con el cáncer de cavidad oral y faringe pero los resultados encontrados son contradictorios¹⁴⁸.

1.6. Revisión sistemática de la asociación de los polimorfismos GSTM1 (alelo nulo), CYP1A1 (Ile/Val) y epóxido hidrolasa (exón 4 His 139 Arg) con el cáncer de cavidad oral y faringe: *Meta y pooled análisis*¹.

Para analizar la relación entre los polimorfismos CYP1A1, GSTM1, la epóxido hidrolasa y el cáncer de cavidad oral y faringe se llevó a cabo un *meta-análisis* de la literatura científica identificada a través de una revisión sistemática y un *pooled-análisis* de los estudios registrados en la base de datos GSEC (Genetic Susceptibility to Environmental Carcinogens) (http://www.upci.upmc.edu/research/ccps/ccontrol/g_intro.html)^{151,152}. La base de datos GSEC es una recolección de datos de estudios de casos y controles publicados y no publicados que investigan polimorfismos genéticos y cáncer. Dado que sólo se encontraron dos artículos que presentaron datos sobre mEH^{153,154} y que sólo uno¹⁵³ permitía calcular el riesgo independiente de padecer cáncer de cavidad oral y faringe, no fue posible llevar a cabo un *meta o pooled* análisis para este gen. En el anexo I se presentan los principales resultados de estos dos artículos, así como los resultados de los estudios sobre CYP1A1 y GSTM1 incluidos en el *meta-análisis* y la lista de artículos excluidos con los correspondientes motivos de exclusión. La metodología de la revisión sistemática, así como la metodología empleada para llevar a cabo el *meta y pooled* análisis se puede consultar en la copia del artículo publicado en *Genetics in Medicine* que se adjunta en el anexo III.

¹ El *meta y pooled análisis* han sido publicados en *Genetics in Medicine* "Varela-Lema L, Taioli E, Ruano-Ravina A, Barros-Dios JM, Anantharaman D, Benhamou S, Boccia S, Bhisey RA, Cadoni G, Capoluongo E, Chen C-J, Foulkes WD, Goloni-Bertollo EM, Hatagima A, Hayes RB, Katoh T, Koifman S, Lazarus P, Manni JJ, Mahimkar M, Morita S, Park J, Park K-K, Pavarino Bertelli EC, de Souza Fonseca Ribeiro EM, Roy B, Spitz MR, Strange RC, Wei Q, Ragin CC. *Meta-analysis and pooled analysis of GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms and oral and pharyngeal cancers: a HuGE-GSEC review. Genet Med* 2008; 10: 369-384¹⁵⁰. Este artículo se presenta en el anexo III.

1.6.2. Resultados

De los 30 estudios incluidos en el meta-análisis, 17 fueron llevados a cabo en Asia, siete en América y seis en Europa. En 16 de estos estudios los controles fueron hospitalarios. El número de casos de los estudios incluidos en el meta-análisis que investigaron GSTM1 varió entre 21 y 451. Todos los estudios llevados a cabo en Europa incluyeron menos de 150 casos. El número de casos fue menor a 50 en dos de los estudios. Los estudios sobre CYP1A1 incluyeron entre 45 y 446 casos (ver tablas 9, 10, 11).

✓ *Frecuencia de los polimorfismos*

La frecuencia del alelo nulo de la GSTM1 en el grupo control varió entre el 24%-58,9%, observándose importantes diferencias en las frecuencias alélicas dependiendo del área geográfica donde se realizó el estudio. En Asia, las frecuencias variaron de forma importante en los diferentes países. En la India las frecuencias oscilaron entre el 24% y el 37%, en Japón entre un 39,8%-48,7% y el único estudio de Taiwán planteó una frecuencia del 57,7%. En los países de Sudamérica las frecuencias tomaron valores entre el 38,2% y el 48,7%. Las frecuencias en Europa y EEUU fueron del orden del 51-54,8%.

El polimorfismo CYP1A1 exón 7 también mostró una gran heterogeneidad geográfica. Mientras que en Europa la frecuencia del genotipo homocigoto para el alelo variante (Val/Val) fue prácticamente nula o muy baja (0-6%), en países asiáticos este genotipo heterocigoto estaba presente en un 32,4-53,4% de los controles. La frecuencia en los países de latinoamérica osciló entre un 19% y un 30%. El único estudio llevado a cabo en EEUU encontró una frecuencia para la combinación de alelos mutados (Ile/Val o Val/Val) del 7,4%.

El genotipo heterocigoto del alelo mutado del CYP1A1 MspI (m1/m2) se encontró en un 30-59,5% de la población asiática. Sólo se recuperó un estudio europeo que evaluó este polimorfismo y la frecuencia de este alelo variante

resultó ser del 9,3%. El alelo mutado homocigoto es muy raro en todas las poblaciones (1%-10,6%).

✓ *Meta-análisis*

- Asociación entre los polimorfismos de la GSTM1 y el cáncer de cavidad oral y faringe.

No se pudo determinar una OR global para el polimorfismo GSTM1 nulo debido a la gran heterogeneidad entre estudios (valor p de la prueba $Q < 0,001$). Se realizó un análisis de sensibilidad y se identificó un estudio que parecía influir en la OR global, sin embargo se siguió observando heterogeneidad después de excluir este estudio del análisis. Para explorar más en detalle la heterogeneidad observada se estratificaron los estudios por raza. En la tabla 9 se muestran las ORs de la GSTM1 específicas de cada estudio y las meta-OR globales para caucásicos, asiáticos y otras razas (estudios que no especificaron la raza o incluyeron más de un grupo étnico).

En poblaciones caucásicas no se observó un aumento en el riesgo en el cáncer oral y de faringe para los individuos con alelos nulos de la GSTM1 (OR=1,1 IC95% 0,9-1,3) y no se encontraron evidencias de un sesgo de publicación (valor p del test de Egger=0,19).

En los estudios realizados en asiáticos y otros grupos étnicos o poblaciones con poblaciones mixtas, se siguió detectando una gran heterogeneidad y por lo tanto no se pudo calcular la meta-OR global (valor p de la prueba $Q < 0,001$). Tampoco existieron evidencias de la existencia de un sesgo de publicación (valor p del test de Egger=0,77 para estudios asiáticos y 0,80 para los otros estudios). El análisis de sensibilidad en los estudios asiáticos identificó un estudio que parecía influir en el meta-OR. Cuando se excluyó este estudio se observó homogeneidad en los siguientes estudios (valor p de la prueba

Q=0,186). En estas poblaciones se encontró un aumento significativo en el riesgo de cáncer de cavidad oral y faringe para la delección GSTM1 (OR=1,6 IC95% 1,3-2,0). No se encontró sesgo de publicación (valor p del test Egger=0,819).

Para el resto de los estudios (estudios que no especificaron la raza o incluyeron más de un grupo étnico) se observó heterogeneidad aún después de excluir el estudio marginal¹⁵⁵, probablemente debido a la mezcla de poblaciones agrupadas dentro de esta categoría.

- Asociación entre los polimorfismos de CYP1A1 y el cáncer de cavidad oral y faringe

En la tabla 10 se resumen los resultados de los estudios que proporcionaron resultados de los polimorfismos CYP1A1 MspI y/o exón 7 (Ile/Val). En total, 11 estudios proporcionaron datos sobre el polimorfismo CYP1A1 exón 7 y siete estudios proporcionaron datos sobre el polimorfismo MspI.

Respecto al **polimorfismo Ile/Val**, nueve estudios documentaron la asociación entre los genotipos heterocigotos para el alelo mutado (Ile/Val) y el cáncer de cavidad oral y faringe, seis estudiaron la asociación de los genotipos homocigotos (Val/Val) y 11 presentaron resultados para la combinación de alelos (Ile/Val + Val/Val). Se encontró una heterogeneidad estadísticamente significativa para cada uno de estos grupos y por lo tanto no se calcularon las meta-ORs globales. No se encontró evidencia de sesgo de publicación (valor p del test de Egger: Ile/Val=0,945, Val/Val=0,625 y Ile/Val + Val/Val=0,199). La exclusión de un estudio que parecía influir en el meta-OR no resolvió la heterogeneidad. Esta heterogeneidad es probablemente debida al sesgo de clasificación, dado que la mayoría de los estudios más recientes empleaban métodos de laboratorio que no permitían diferenciar claramente las variantes alélicas del exón 7.

Entre los cinco estudios que investigaron el **polimorfismo CYP1A1 MspI**, todos, excepto uno, presentaron resultados de las variantes alélicas m1/m2, m2/m2 y de la combinación de ambas (m1/m2 + m2/m2) (tabla 11). Los estudios sobre m1/m2 o la combinación de variantes alélicas mostraron una heterogeneidad estadísticamente significativa, por lo tanto no se proporciona la meta-OR global. No se observó sesgo de publicación (valor p del test de Egger: m1/m2=0,389 y m1/m2+ m2/m2=0,339). Se observó un aumento significativo en el riesgo de cáncer de cavidad oral y faringe para la variante alélica m2/m2 (meta OR= 1,9 IC95% 1,4-2,7). Tampoco existieron evidencias de sesgo de publicación (valor p del test de Egger: m2/m2=0,595). El análisis de sensibilidad identificó un estudio que influyó en el meta-OR para la m1/m2 y para los alelos combinados (m1/m2 + m2/m2). Después de excluir estos datos se obtuvo homogeneidad. No se observó un aumento de riesgo de cáncer oral y de faringe para el alelo m1/m2 o la combinación de alelos (m1/m2, valor p del test Q= 0,625, OR= 0,9 IC95% 0,8-1,1; m1/m2+m2/m2, valor p del test Q= 0,798, OR= 1,0 IC95% 0,9-1,2). No se observaron evidencias de sesgo de publicación (valor p del test Egger: m1/m2=0,628; m1/m2 + m2/m2=0,407).

- Interacción entre la GSTM1 y el CYP1A1

Sólo un estudio de los incluidos evaluó la interacción entre los polimorfismos GSTM1 nulo y CYP1A1 (Ile/Val) y tres evaluaron la interacción entre los polimorfismos GSTM1 nulos y el CYP1A1 MspI (tabla 12). El meta-OR para el GSTM1 nulo + m1/m1 no se documenta porque los estudios presentaban heterogeneidad estadísticamente significativa (valor p de la prueba Q=0,002). Se observó un aumento en el riesgo de cáncer de cavidad oral y faringe para el GSTM1 salvaje + m1/m2 o m2/m2 (meta-OR=1,6 IC95% 1,0-2,7) y el GSTM1 nulo + m1/m2 o m2/m2 (meta-OR=3,0 IC95% 1,8-5,0). La asociación no fue significativa para ninguna de las variantes polimórficas. No se encontró sesgo de publicación en ninguno de estos análisis.

- ✓ *Pooled análisis*

El pooled análisis incluyó 21 estudios (3.130 casos y 6.267 controles). Se observó gran heterogeneidad entre los 20 estudios que proporcionaron datos sobre la GSTM1. Al igual que en el *meta-análisis*, uno de los estudios parecía contribuir a la heterogeneidad¹⁵⁵. Los análisis fueron estratificados por diferentes co-variables.

- Asociación entre los polimorfismos de la GSTM1 y el cáncer de cavidad oral y faringe

De forma global, no se observó una asociación significativa entre la delección GSTM1 y el cáncer de cavidad oral y faringe, aún cuando el análisis se limitó a controles poblacionales (ORajustada=1,1, IC95% 0,8-1,4) (tabla 13). Se observó una asociación marginalmente significativa para los fumadores actuales (OR ajustada=1,2 IC95% 1,0-1,4) y para los que fumaron en algún momento de su vida (OR ajustada=1,1 IC95% 1,0-1,3) pero no para los nunca fumadores (OR ajustada=1,0 IC95% 0,8-1,2). Las diferencias observadas entre los OR específicas

de los diferentes estratos de fumadores no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,1$). Las series de datos fueron homogéneas para los nunca, ex y fumadores actuales (valor p de la prueba Q $> 0,05$) pero no para los que fumaron en algún momento de su vida (valor p de la prueba Q=0,018). La *GSTM1* nula se asoció significativamente con el cáncer de cavidad oral y faringe en afroamericanos y africanos (OR=1,9 IC95% 1,1-3,3), pero esta asociación perdió la significación estadística cuando se ajustó por las variables confusoras (ORajustada= 1,7 IC95% 0,9-3,3). No se encontró una asociación significativa para caucásicos, asiáticos u otros grupos étnicos.

Cuando se evaluó el consumo de alcohol, se observó un ligero aumento en el riesgo con la delección de la *GSTM1* para los bebedores y no bebedores (ORajustada de bebedores= 1,2 IC95% 1,0-1,5; OR ajustada de no bebedores= 1,2 IC95% 1,0-1,3).

- Asociación entre los polimorfismos del CYP1A1 y el cáncer de cavidad oral y faringe

La OR resumen para la asociación entre los polimorfismos **CYP1A1 MspI** y el cáncer de cavidad oral y faringe no fue significativa para el genotipo m1/m2 pero sí para el genotipo m2/m2 (OR ajustada=2,0 IC95% 1,3-3,1) (tabla 14). Entre los cánceres de cavidad oral y faringe, la probabilidad de presentar el genotipo m2/m2 en comparación a los controles era dos veces mayor dentro del grupo de los nunca fumadores (ORajustada= 1,8 IC95% 1,1-2,9) pero no para los fumadores actuales o alguna vez fumadores. Se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon las OR específicas de los estratos de nunca y fumadores actuales (valor p=0,019). La asociación de la variante alélica m2/m2 también difirió cuando el análisis se restringió a controles poblacionales (OR ajustada=1,2 IC95% 0,7-2,2) o controles hospitalarios (ORajustada= 1,7 IC95% 1,1-2,7). Se observó una asociación

significativa del genotipo m2/m2 para caucásicos (ORajustada= 2,1 IC95% 1,4-3,3) pero no para otros grupos étnicos, aunque estos fueran poblaciones mixtas.

No se encontró una asociación entre el **polimorfismo CYP1A1 exón 7** y los cánceres de cavidad oral y faringe independientemente del tipo de control utilizado en el análisis (tabla 15). Sin embargo, se observó una asociación estadísticamente significativa del genotipo Val/Val para los alguna vez fumadores (ORajustada= 2,2 IC95% 1,1-4,5). Los casos procedentes de Asia tenían una probabilidad en torno a 4 veces mayor de tener el genotipo Val/Val cuando se comparaban con los controles (OR ajustada=3,5 IC95% 1,0-12,6).

No se observó una asociación del polimorfismo CYP1A1 exón 7 con el cáncer de cavidad oral y faringe según el consumo alcohólico pero se observó un aumento en el riesgo para el genotipo CYP1A1 m2/m2 en nunca bebedores (ORajustada= 2,6 IC95% 1,5-4,3).

- Análisis del riesgo para la GSTM1 y el CYP1A1 según la localización del tumor.

Se observó un aumento significativo en el riesgo para la delección GSTM1 cuando se examinaron los casos de cáncer de la cavidad oral (ORajustada=1,1 IC95% 1,0-1,2) y de faringe (ORajustada=1,3 IC95% 1,1-1,6), independientemente (tabla 16). Entre los sujetos con tumores de la cavidad oral, no se observó ninguna asociación para los polimorfismos CYP1A1 exón 7 y se observó una asociación marginalmente significativa para el CYP1A1 MspI; el genotipo m2/m2 se asoció significativamente con los tumores de la cavidad oral (ORajustada=2,0 IC95% 1,3-3,1). No fue posible determinar la asociación de esta variante alélica para sujetos con cáncer de faringe.

- Interacción entre los polimorfismos GSTM1 y CYP1A1

La combinación de los polimorfismos CYP1A1 MspI y CYP1A1 exón 7 no se asoció significativamente con el riesgo de padecer COF (tabla 17). La combinación de la GSTM1 nula y de la variante genotípica CYP1A1 m1/m2 aumentaron el riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe (OR ajustada= 1,3 IC95% 1,0-1,7). Se observaron resultados similares cuando se consideró la variante homocigota para el alelo mutado (m2/m2) (ORajustada=1,9 IC95% 1,0-3,9). Esta asociación se observó en nunca fumadores pero no en fumadores. La combinación de la GSTM1 nula y el CYP1A1 m1/m1 o m1/m2 aumentaron marginalmente el riesgo de COF en fumadores y nunca fumadores. La interacción entre la GSTM1 y el CYP1A1 MspI se observó para el cáncer de la cavidad oral pero no para los tumores de faringe.

Introducción

Tabla 9. Descripción de los estudios incluidos en el meta-análisis para los polimorfismos GSTM1

Autor (Año)	Fuente de controles	País	Localización del tumor	Emparejamiento	Casos	Controles	OR (IC95%) GSTM1 ausente vs. presente
ESTUDIOS EN CAUCÁSICOS							
Deakin et al. ¹⁵⁶ (1996)*	Hospital	Reino Unido	Cavidad oral		40	577	1,0 (0,5-1,9)
Coutelle et al. ¹⁵⁷ (1997)*	Clínica de alcohólicos	Francia	Orofaringe	Alcohol	21	37	1,7 (0,6-5,1)
Park et al. ¹⁵⁸ (1997)*	Población y Hospital	EEUU	Cavidad oral		109	109	0,9 (0,5-1,5)
Matthias et al. ¹⁵⁹ (1998)*	Hospital	Alemania	Cavidad oral y faringe		122	178	1,2 (0,8-1,9)
Jourenkova-Mironova et al. ¹⁶⁰ (1999)*	Hospital	Francia	Cavidad oral y faringe	Tabaco	121	172	0,8 (0,5-1,3)
Hahn et al. ¹⁶¹ (2002)	Población	Alemania	Cavidad oral	Raza	94	92	1,3 (0,7-2,3)
Gronau et al. ¹⁶² (2003)	Hospital	Alemania	Cavidad oral	Tabaco y alcohol	73	129	1,2 (0,7-2,2)
META					580	1.294	1,1 (0,9-1,3)†
Valor p, test Q							0,796
Valor p, test Egger							0,194
ESTUDIOS ASIÁTICOS							
Katoh et al. ¹⁶³ (1995)*	Población	Japón	Oral, SE		45	91	1,6 (0,8-3,3)
Hung et al. ¹⁶⁴ (1997)	Población	Taiwán	Oral, SE		41	123	1,0 (0,5-2,1)
Kihara et al. ¹⁶⁵ (1997)	Población	Japón	COF, sinus maxilares		75	472	1,8 (1,1-2,9)
Tanimoto et al. ¹⁶⁶ (1999)	Hospital	Japón	Cavidad oral	Edad y sexo	100	100	1,0 (0,6-1,8)
Katoh et al. ¹⁶⁷ (1999)	Hospital	Japón	Cavidad oral		92	147	1,7 (1,0-2,8)
Sato et al. ¹⁶⁸ (1999) (2000)	Población	Japón	Cavidad oral†	Edad y sexo	142	142	2,2 (1,4-3,6)
Nomura et al. ¹⁶⁹ (2000)	Población	Japón	Cavidad oral y faringe		114	33	2,5 (1,1-5,5)
Kietthubthwe et al. ¹⁷⁰ (2001)	Población	Tailandia	Cavidad oral	ocupación	53	53	3,0 (1,4-6,7)
Cha et al. ¹⁷¹ (2007)	Población	Korea	Oral, SE		72	209	0,7 (0,4-1,3)
Valor p, test Q					779	1.534	<0,001
Valor p, test Egger							0,777

Continuación tabla 9.

Autor (Año)	Fuente de controles	País	Localización del tumor	Emparejamiento	Casos	Controles	OR (IC95%) GSTM1 ausente vs. presente
OTROS ESTUDIOS							
Sreelekha et al. ¹⁷² (2001)		India	Oral, SE	Edad y sexo	98	60	1,9 (1,0-3,7)
Buch et al. ¹⁵⁵ (2002)*	Población	India	Cavidad oral	Región de origen	297	450	3,0 (2,2-4,0)
Xie et al. ¹⁷³ (2004)*	Población	Puerto Rico	Oral, SE		132	143	0,7 (0,4-1,2)
Sikdar et al. ¹⁷⁴ (2004)*	Hospital	India	Cavidad oral	Raza	256	259	1,0 (0,7-1,4)
Drummond et al. ¹⁷⁵ (2004)	Clínica dental	Brasil	Cavidad oral**	Estatus socio-económico, edad y sexo	70	82	2,0 (1,0-3,9)
Gattas et al. ¹⁷⁶ (2006)	Hospital	Brasil	Cavidad oral y faringe	Edad y sexo	81	102	2,5 (1,4-4,5)
Sharma et al. ¹⁷⁷ (2006)	Población	India	Oral, SE		40	87	2,2 (1,0-5,1)
Anantharaman et al. ¹⁷⁸ (2007)*	Población y clínica dental	India	Oral, SE	Edad, sexo, hábito tabáquico	451	727	1,3 (1,0-1,7)
Hatagima et al. ¹⁷⁹ (2007)**	Hospital	Brasil	Oral, orofaringe	Sexo, edad y raza	231	212	0,9 (0,6-1,3)
Valor p, test Q							<0,001
Valor p, test Egger							0,801

*Estudios incluidos en el pooled-análisis; **Los mismos sujetos que Marqués et al en tabla 2; †Otras sub-localizaciones orales no especificadas; ** Fumadores; SE = sin especificar; ~ No se proporcionan las estimaciones del meta-análisis debido a la heterogeneidad de los estudios. Estudios con grupos étnicos mixtos. # Estimación de efectos fijos

Introducción

Tabla 10. Descripción de los estudios incluidos en el *meta-análisis* para evaluar los polimorfismos CYP1A1 (exón 7)

Autor (Año)	Fuente de controles	País	Localización del tumor	Emparejamiento	Casos	Controles	OR (IC 95%) Ile/Ile	OR (IC 95%) Ile/Val	OR (IC 95%) Val/Val	OR (IC 95%) Ile/Val + Val/Val
Park et al. ¹⁵⁸ (1997)*	Población + Hospital	EEUU	Cavidad oral		108	108	1,0 ¹⁸⁰			2,5 (1,0-6,0)
Matthias et al. ¹⁵⁹ (1998)*	Hospital	Alemania	Cavidad oral y faringe		124	186	1,0 (ref)	1,1 (0,5-2,3)		1,0 (0,5-2,1)
Katoh et al. ¹⁶⁷ (1999)	Hospital	Japón	Cavidad oral		92	147	1,0 (ref)	1,3 (0,7-2,2)	1,3 (0,4-4,1)	1,3 (0,8-2,2)
Morita et al. ¹⁸¹ (1999)	Población	Japón	Faringe		45	164	1,0 (ref)	0,7 (0,4-1,2)	2,4 (0,9-6,4)	0,9 (0,5-1,5)
Sato et al. ¹⁶⁸ (2000)***	Hospital	Japón	†Cavidad oral	Edad y sexo	142	142	1,0 (ref)	1,6 (1,0-2,6)	4,2 (1,6-11,1)	1,9 (1,2-3,0)
Sreelekha et al. ¹⁷² . (2001)		India	Oral, SE	Edad y sexo	98	60	1,0 (ref)			5,2 (2,4-11,4)
Kao et al. ¹⁸² (2002)	Hospital	Taiwan	Cavidad oral		106	146	1,0 (ref)	5,1 (2,6-9,8)	18,9 (3,6-98,5)	5,4 (2,8-10,4)
Hahn et al. ¹⁶¹ (2002)	Población	Alemania	Cavidad oral	raza	94	92	1,0 (ref)	0,6 (0,2-2,3)		
Xie et al. ¹⁷³ (2004)*	Población	Puerto Rico	Oral, SE		132	143	1,0 (ref)	0,9 (0,6-1,6)	0,5 (0,2-1,8)	0,9 (0,5-1,4)
Marques et al. ¹⁸³ (2006)**	Hospital	Brasil	Oral, SE	Edad, sexo y color de la piel	231	212	1,0 (ref)	1,1 (0,7-1,8)	2,9 (0,6-14,3)	1,2 (0,7-1,9)
Leichsenring et al. ¹⁸⁴ (2006)*	Hospital	Brasil	Oral, SE		72	60	1,0 (ref)	1,0 (0,4-2,3)		1,0 (0,5-2,5)
Valor p, test Q					1.199	1.296	0,001	0,001	0,014	<0,001
Valor p, test Egger							0,945	0,625	0,199	

Tabla 11. Descripción de los estudios incluidos en el *meta-análisis* para evaluar los polimorfismos CYP1A1 (mspl)

Autor (Año)	Fuente de controles	País	Localización del tumor	Emparejamiento	Casos	Controles	OR (IC 95%) m1/m1	OR (IC 95%) m1/m2	OR (IC 95%) m2/m2	OR (IC 95%) m1/m2 + m2/m2
Matthias et al. ¹⁵⁹ (1998)*	Hospital	Alemania	Cavidad oral y faringe		122	205	1,0 (ref)	1,6 (0,8-3,2)	0,9 (0,1-9,9)	1,5 (0,8-3,0)
Sato et al. ¹⁸⁵ (1999)	Hospital	Japón	†Cavidad oral	Edad y sexo	142	142	1,0 (ref)	0,9 (0,6-1,6)	2,3 (1,1-4,7)	1,2 (0,7-1,9)
Tanimoto et al. ¹⁶⁶ (1999)	Hospital	Japón	Cavidad oral	Edad y sexo	100	100	1,0 (ref)	3,4 (1,8-6,4)	3,6 (1,4-9,5)	3,5 (1,9-6,2)
Kao et al. ¹⁸² (2002)	Hospital	Taiwan	Cavidad oral		106	146	1,0 (ref)	0,9 (0,5-1,5)	1,3 (0,6-3,1)	0,9 (0,6-1,6)
Gattas et al. ¹⁷⁶ (2006)	Hospital	Brasil	Cavidad oral y faringe	Edad y sexo	81	102	1,0 (ref)			0,9 (0,5-1,6)
Anantharaman et al. ¹⁷⁸ (2007) *	Población y clínica dental	India	Oral, SE	Edad, sexo, hábito tabáquico	446	727	1,0 (ref)	0,9 (0,7-1,2)	1,5 (0,9-2,3)	1,0 (0,8-1,3)
Cha et al. ¹⁷¹ (2007)	Población	Corea	Oral, SE		72	163	1,0 (ref)	0,8 (0,4-1,6)	3,2 (1,3-7,8)	1,1 (0,6-2,2)
Valor p, test Egger					1.069	1.585		0,003	0,342	0,007
Valor p, test Egger								0,389	0,595	0,339

*Estudios incluidos en el pooled análisis; ** Los mismos sujetos que Hatagima et al, tabla 1; ***Sato et al 1999 y Sato et al 2000 incluyeron los mismos sujetos †No se proporcionan las estimaciones del meta-análisis debido a la heterogeneidad de los estudios; † Otras sub-localizaciones orales no especificadas; SE = sin especificar.

Tabla 12. Descripción de los estudios incluidos en el *meta-análisis* que evalúan la interacción GSTM1-CYP1A1

Autor (Año)	Fuente de controles	País	Localización del tumor	Emparejamiento	Casos	Controles	OR (IC 95%) (+) Ile/Ile	OR (IC 95%) (-) Ile/Ile	OR (IC 95%) (+) Ile/Val o Val/Val	OR (IC 95%) (-) Ile/Val o Val/Val	OR (IC 95%) Todos los polimorfismos
GSTM1/CYP1A1 exón7											
Sato et al. ^{***} (2000) ¹⁶⁸	Hospital	Japón	†Cavidad oral	Edad y sexo	142	142	1,0 (ref)	2,3 (1,2-4,3)	1,9 (0,9-3,9)	4,0 (2,0-7,9)	2,6 (1,5-4,6)
GSTM1/CYP1A1 msp1											
Gattas et al. (2006) ¹⁷⁶	Hospital	Brasil	Cavidad oral y faringe	Edad y sexo	103	102	1,0 (ref)				2,4 (1,1-5,1)
Sato et al. ^{***} (1999) ¹⁸⁵	Hospital	Japón	†Cavidad oral	Edad y sexo	142	142	1,0 (ref)	2,7 (1,3-5,6)	1,4 (0,7-2,8)	2,7 (1,4-5,3)	2,2 (1,2-3,9)
Tanimoto et al. (1999) ¹⁶⁶	Hospital	Japón	Cavidad oral	Edad y sexo	100	100	1,0 (ref)	0,4 (0,2-1,0)	2,0 (0,9-4,1)	3,5 (1,6-8,0)	1,6 (0,9-3,0)
META					345	344	1,0 (ref)	0,002	0,485	3,0 (1,8-5,0)†	2,0 (0,4-2,9)†
Valor p, test Q								0,002	0,485	0,597	0,704

***Sato et al 1999 y Sato et al 2000 incluyeron los mismos sujetos; †Modelo de efectos fijos; ‡Otras sub-localizaciones orales no especificadas

Tabla 13. OR global y estratificado de la asociación entre la delección GSTM1 y COF-Pooled análisis

GSTM1	Controles (N)	Casos (N)	OR cruda (IC 95%)	OR*ajustada (IC 95%)
Número de estudios = 19[§]				
N = 7.046	4.658	2.388		
Presente	2.436	1.242	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ausente	2.222	1.146	1,0(0,9-1,1) [†]	1,0(0,9-1,1)
CONTROLES POBLACIONALES (N = 926)[‡]				
	556	370		
Presente	299	199	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ausente	257	171	1,0 (0,8-1,3)	1,1 (0,8-1,4)
CONTROLES HOSPITALARIOS (N = 2.966)[‡]				
	1.922	1.044		
Presente	943	542	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ausente	979	502	0,9 (0,8-1,0)	0,9 (0,8-1,1)
NUNCA FUMADORES(N = 2.751)				
	1.974	777		
Presente	1.059	428	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ausente	915	349	0,9 (0,8-1,1)	
EX FUMADORES (N = 864)				
	548	316		
Presente	265	157	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ausente	283	159	1,0 (0,7-1,3)	1,0 (0,7-1,3)
FUMADORES ACTUALES (N = 1.963)				
	1.150	813		
Presente	645	423	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ausente	505	390	1,2 (1,0-1,4)	1,2 (1,0-1,4)
FUMADORES EN ALGÚN MOMENTO (N = 3.651)				
	2.126	1.525		
Presente	1.122	776	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ausente	1.004	749		1,1 (1,0-1,3)
NUNCA BEBEDORES (1.859)				
	1.280	579		
Presente	691	282	1,0 (ref)	1,0(ref)
Ausente	589	297	1,2 (1,0-1,5)	1,2 (1,0-1,5)
BEBEDORES (2.963)				
	1.776	1.187		
Presente	938	587	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ausente	838	600	1,1 (1,0-1,3)	1,2 (1,0-1,3)
CAUCÁSICOS (N =5.851)				
	3.857	1.994		
Presente	1.987	1.034	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ausente	1.870	960	1,0 (0,9-1,1)	1,0 (0,9-1,1)
AFRO-AMERICANOS+AFRICANOS (N = 294)				
	195	99		
Presente	149	62	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ausente	46	37	1,9 (1,1-3,3)	1,7 (0,9-3,3)

Introducción

GSTM1	Controles (N)	Casos (N)	OR cruda (IC 95%)	OR*ajustada (IC 95%)
ASIÁTICOS (N =681)				
	491	190		
Presente	236	93	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ausente	255	97	1,0 (0,7-1.4)	1,2 (0,8-1,8)
OTROS (N = 220)				
	115	105		
Presente	64	53	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ausente	51	52	1,2 (0,7-2,0)	1,2 (0,7-2,1)

*Ajustado por número de estudio, edad (<54, 54-95), sexo, raza y tabaco (fumador/nunca fumador) cuando se consideró apropiado. † Datos de 1 estudio de la India excluidos por heterogeneidad. ‡ prueba Q (p=0,048); test Egger (p=0,825); prueba Q (p de todos los estratos > 0,05) exceptuando los fumadores (p=0,018); † Se incluyen 5 estudios con controles poblacionales; Se incluyen 8 estudios con controles hospitalarios; 6 estudios excluidos del sub-análisis por presentar una combinación de controles poblacionales y hospitalarios. Otros=latinos y otros grupos étnicos no especificados.

Tabla 14. Odds Ratio global y estratificado de la asociación entre la mutación CYP1A1 (*msp1*) y COF.

CYP1A1 (<i>msp1</i>)	Controles (N)	Casos (N)	OR Cruda (IC 95%)	OR Ajustada* (IC 95%)
Número de estudios para CYP1A1 (<i>msp1</i>) = 8				
N=4.063	2.581	1.482		
m1m1	1.415	796	1,0 (ref)	1,0 (ref)
m1m2	980	525	1,0 (0,8-1,1)†	1,2 (1,0-1,5)
m2m2	186	161	1,5 (1,2-1,9)†	2,0 (1,3-3,1)
m1m2 + m2m2	1.166	686	1,1 (0,9-1,2)†	1,3 (1,1-1,6)
NUNCA FUMADORES (N = 2.119)				
	1.318	801		
m1m1	652	365	1,0 (ref)	1,0 (ref)
m1m2	566	337	1,1 (0,9-1,3)	1,2 (0,9-1,5)
m2m2	100	99	1,8 (1,3-2,4)	1,8 (1,1-2,9)
m1m2 + m2m2	666	436	1,2 (1,0-1,4)	1,2 (1,0-1,6)
FUMADORES ACTUALES(N =822)				
	545	277		
m1m1	283	127	1,0 (ref)	1,0 (ref)
m1m2	219	114	1,2 (0,9-1,6)	1,3 (0,8-2,3)
m2m2	43	36	1,9 (1,1-3,0)	2,6 (0,9-7,5)
m1m2 + m2m2	262	150	1,3 (1,0-1,7)	1,5 (0,9-2,5)
FUMADORES EN ALGÚN MOMENTO (N = 1.320)				
	772	548		
m1m1	468	355	1,0 (ref)	1,0 (ref)
m1m2	258	154	0,8 (0,6-1,0)	1,2 (0,8-1,8)
m2m2	46	39	1,1 (0,7-1,8)	2,4 (0,9-5,8)
m1m2 + m2m2	304	193	0,8 (0,7-1,1)	1,3 (0,9-1,9)
NUNCA BEBEDORES (N=1.045)				
	635	410		
m1m1	356	210	1,0 (ref)	1,0 (ref)
m1m2	248	162	1,1 (0,9-1,4)	1,3 (1,0-1,7)
m2m2	31	38	2,1 (1,3-3,4)	2,6 (1,5-4,3)
m1m2 + m2m2	279	200	1,2 (1,0-1,6)	1,5 (1,1-1,9)
BEBEDORES (N=919)				
	546	373		
m1m1	346	281	1,0 (ref)	1,0 (ref)
m1m2	178	83	0,6 (0,4-0,8)	1,1 (0,8-1,5)
m2m2	22	9	0,5 (0,2-1,1)	1,0 (0,4-2,5)
m1m2 + m2m2	200	92	0,6 (0,4-0,8)	1,1 (0,8-1,5)
CONTROLES POBLACIONALES (N=1.109)‡				
	161	948		
m1m1	137	438	1,0 (ref)	1,0 (ref)
m1m2	23	391	0,9 (0,7-1,1)	1,1 (0,8-1,6)**
m2m2	1	119	1,3 (0,8-1,9)	1,2 (0,7-2,2)**

Introducción

CYP1A1 (msp1)	Controles (N)	Casos (N)	OR Cruda (IC 95%)	OR Ajustada* (IC 95%)
CONTROLES HOSPITALARIOS (N = 1,546)†				
	968	578		
m1m1	665	366	1,0 (ref)	1,0 (ref)
m1m2	256	168	1,2 (1,0-1,5)	1,3 (1,0-1,7)**
m2m2	47	44	1,7 (1,1-2,6)	1,7 (1,1-2,7)**
m1m2 + m2m2	303	212	1,3 (1,0-1,6)	1,4 (1,1-1,8)**
CAUCÁSICOS (N = 2.880)				
	1.769	1.111		
m1m1	1.059	645	1,0 (ref)	1,0 (ref)
m1m2	612	375	1,0 (0,9-1,2)	1,2 (1,0-1,5)
m2m2	98	91	1,5 (1,1-2,1)	2,1 (1,4-3,3)
m1m2 + m2m2	710	466	1,1 (0,9-1,3)	1,3 (1,1-1,6)
OTROS (N = 1.183)				
	812	371		
m1m1	356	151	1,0 (ref)	1,0 (ref)
m1m2	368	150	1,0 (0,7-1,3)	1,0 (0,7-1,4)
m2m2	88	70	1,9 (1,3-2,7)	1,6 (0,9-2,6)
m1m2 + m2m2	456	220	1,1 (0,9-1,5)	1,1 (0,8-1,6)

*Ajustado por número de estudio, edad (<54, 54-95), sexo, raza, alcohol (bebedor/nunca bebedor) y tabaco (fumador/nunca fumador) cuando se consideró apropiado.**Consumo de alcohol (bebedor/nunca bebedor) excluido del análisis por co-linealidad.

† Prueba Q (valor p): m1m2 = 0,973, m2m2 = 0,403, m1m1+m2m2 = 0,980; test Egger (valor p): m1m1 = 0,666, m2m2 = 0,327, m1m1+m2m2 = 0,515; ‡ Se incluyen 2 estudios con controles poblacionales; Se incluyen 4 estudios con controles hospitalarios; 2 estudios excluidos del sub-análisis por presentar una combinación de controles poblacionales y hospitalarios. Otros=Afroamericanos, Africanos, Asiáticos, Latinos y otros grupos étnicos no especificados.

Tabla 15. Odds Ratio global y estratificado de la asociación entre la mutación CYP1A1 (exón7) y el cáncer de cavidad oral y faringe-*Pooled análisis*

CYP1A1 (exón 7)	Controles (N)	Casos (N)	OR Cruda (IC 95%)	OR Ajustada* (IC 95%)
Número de estudios para CYP1A1 (exón7) = 10				
	2.295	1.519		
Ile/Ile	1.778	1.183	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ile/Val	479	298	0,9 (0,8-1,1)†	1,0 (0,8-1,1)
Val/Val	38	38	1,5 (1,0-2,4)†	1,5 (0,9-2,4)
Ile/Val+Val/Val	517	336	1,0 (0,8-1,1)†	1,0 (0,8-1,2)
NUNCA FUMADORES (N =1.194)				
	741	453		
Ile/Ile	568	352	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ile/Val	159	94	1,0 (0,7-1,3)	1,0 (0,7-1,3)
Val/Val	14	7	0,8 (0,3-2,0)	0,9 (0,3-2,2)
Ile/Val+Val/Val	173	101	0,9 (0,7-1,2)	1,0 (0,7-1,3)
FUMADORES ACTUALES (N=1.048)				
	533	515		
Ile/Ile	403	392	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ile/Val	123	104	0,9 (0,7-1,2)	0,9 (0,6-1,2)
Val/Val	7	19	2,8 (1,2-6,7)	2,3 (0,9-5,8)
Ile/Val+Val/Val	130	123	1,0 (0,7-1,3)	1,0 (0,7-1,3)
FUMADORES EN ALGÚN MOMENTO (N=1.751)				
	832	919		
Ile/Ile	641	712	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ile/Val	180	179	0,9 (0,7-1,1)	0,9 (0,7-1,1)
Val/Val	11	28	2,3 (1,1-4,6)	2,2 (1,1-4,5)
Ile/Val+Val/Val	191	207	1,0 (0,8-1,2)	1,0 (0,8-1,2)
NUNCA BEBEDORES (N=144)				
	81	63		
Ile/Ile	66	56	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ile/Val	14	6	0,5 (0,2-1,4)	0,3 (0,1-1,3)
Val/Val	1	1	1,2 (0,1-19,3)	4,9 (0,3-92,3)
Ile/Val+Val/Val	15	7	0,6 (0,2-1,4)	0,5 (0,1-1,7)
BEBEDORES (N=1.115)				
	534	581		
Ile/Ile	405	476	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ile/Val	121	92	0,7 (0,5-0,9)	0,8 (0,5-1,0)
Val/Val	8	13	1,4 (0,6-3,4)	2,0 (0,8-5,0)
Ile/Val+Val/Val	129	105	0,7 (0,5-0,9)	0,8 (0,6-1,1)
CONTROLES POBLACIONALES (N=1.876)‡				
	1.286	590		
Ile/Ile	952	442	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ile/Val	305	128	0,9 (0,7-1,1)	0,8 (0,6-1,0)
Val/Val	29	20	1,5 (0,8-2,7)	1,0 (0,5-1,9)
Ile/Val+Val/Val	334	148	1,0 (0,8-1,2)	0,8 (0,6-1,0)

Introducción

CYP1A1 (exón 7)	Controles (N)	Casos (N)	OR Cruda (IC 95%)	OR Ajustada* (IC 95%)
CONTROLES HOSPITALARIOS (N=1.787)†				
	949	838		
Ile/Ile	782	686	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ile/Val	158	143	1,0 (0,8-1,3)	1,0 (0,8-1,3)
Val/Val	9	9	1,1 (0,4-2,9)	1,1 (0,4-2,6)
Ile/Val+Val/Val	167	152	1,0 (0,8-1,3)	1,0 (0,8-1,3)
CAUCÁSICOS (N=2.085)				
	1.095	990		
Ile/Ile	872	793	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ile/Val	207	180	1,0 (0,8-1,2)	0,9 (0,8-1,2)
Val/Val	16	17	1,2 (0,6-2,3)	1,1 (0,5-2,3)
Ile/Val+Val/Val	223	197	1,0 (0,8-1,2)	1,0 (0,8-1,2)
ASIÁTICOS (N=261)				
	189	72		
Ile/Ile	122	45	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ile/Val	61	18	0,8 (0,4-1,5)	0,7 (0,4-1,3)
Val/Val	6	8	3,5 (1,2-10,8)	3,5 (1,0-12,6)
Ile/Val+Val/Val	67	26	1,0 (0,6-1,8)	0,9 (0,5-1,7)
OTROS (N = 1.468)				
	1.011	457		
Ile/Ile	784	344	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ile/Val	211	100	1,1 (0,8-1,4)	1,0 (0,7-1,3)
Val/Val	16	13	1,9 (0,9-3,9)	1,4 (0,6-3,2)
Ile/Val+Val/Val	227	113	1,1 (0,9-1,5)	1,0 (0,8-1,4)

*Ajustado por número de estudio, edad (<54, 54-95), sexo y raza cuando se consideró apropiado. † Prueba Q (valor p): Ile/Val = 0,435, Val/Val = 0,425, Ile/Val + Val/Val = 0,282; test Egger (valor p): Ile/Val = 0,968, Val/Val = 0,766, Ile/Val + Val/Val = 0,967; ‡ Se incluyen 4 estudios con controles poblacionales; Se incluyen 5 estudios con controles hospitalarios; 1 estudio fue excluido del sub-análisis por presentar una combinación de controles poblacionales y hospitalarios. Otros=Afroamericanos, Africanos, Latinos y otros grupos étnicos no especificados.

Tabla 16. Asociación de los polimorfismos GSTM1 y CYP1A1 y el cáncer de cavidad oral y faringe según la localización del tumor- *Pooled análisis*

	Controles (N)	Casos (N)	OR cruda (IC 95%)	OR*ajustada (IC 95%)
GSTM1*				
CAVIDAD ORAL (N=7.306)				
	5.329	1.977		
Presente	3.002	1,070	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ausente	2.327	907	1,1 (1,0-1,2)	1,1 (1,0-1,2)
FARINGE (N=5.807)				
	5.329	478		
Presente	3.002	232	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ausente	2.327	246	1,4 (1,1-1,7)	1,3 (1,1-1,6)
CYP1A1 (MspI)†				
CAVIDAD ORAL (N=3.936)				
	2.581	1.355		
m1m1	1.415	687	1,0 (ref)	1,0 (ref)
m1m2	980	507	1,1 (0,9-1,2)	1,2 (1,0-1,5)
m2m2	186	161	1,8 (1,4-2,2)	2,0 (1,3-3,1)
m1m2 + m2m2	1.166	668	1,2 (1,0-1,4)	1,3 (1,1-1,6)
FARINGE (N=2.708)				
	2.581	127		
m1m1	1.415	109	1,0 (ref)	1,0 (ref)
m1m2	980	18	0,2 (0,1-0,4)	1,1 (0,6-2,1)
m2m2	186	0	-	-
m1m2 + m2m2	1.166	18	0,2 (0,1-0,3)	1,0 (0,5-1,9)
CYP1A1 (exón 7)‡				
CAVIDAD ORAL (N=3.102)				
	2.083	1.019		
Ile/Ile	1.608	795	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ile/Val	439	201	0,9 (0,8-1,1)	0,9 (0,7-1,1)
Val/Val	36	23	1,3 (0,8-2,2)	1,1 (0,6-1,9)
Ile/Val+Val/Val	475	224	1,0 (0,8-1,1)	0,9 (0,8-1,1)
FARINGE (N=2.351)				
	2.083	268		
Ile/Ile	1.608	208	1,0 (ref)	1,0 (ref)
Ile/Val	439	51	0,9 (0,7-1,2)	1,0 (0,7-1,4)
Val/Val	36	9	1,9 (0,9-4,1)	1,8 (0,8-4,0)
Ile/Val+Val/Val	475	60	1,0 (0,7-1,3)	1,1 (0,8-1,5)

*Ajustado por número de estudio, edad (<54, 54-95), sexo, raza y tabaco (fumador/nunca fumador) cuando se consideró apropiado. †Ajustado por número de estudio, edad (<54, 54-95), sexo, raza, alcohol (bebedor/nunca bebedor) y tabaco (fumador/nunca fumador) cuando se consideró apropiado. ‡ Ajustado por número de estudio, edad (<54, 54-95), sexo y raza cuando se consideró apropiado

Tabla 17. Riesgo global y estratificado de la asociación entre los polimorfismos GSTM1/CYP1A1 (*msp1*) con el cáncer de cavidad oral y faringe-*Pooled análisis*

GSTM1/CYP1A1 (<i>msp1</i>)	Controles (N)	Casos (N)	OR Cruda (IC 95%)	OR Ajustada* (IC 95%)
Número de estudios: 8				
N=4.004	2.536	1.468		
+ /m1m1	809	419	1,0 (ref)	1,0 (ref)
+ /m1m2	608	292	0,9 (0,8-1,1)	1,4 (1,0-1,8)
+ /m2m2	116	96	1,6 (1,2-2,2)	2,4 (1,4-4,2)
+ /m1m2+m2m2	724	388	1,0 (0,9-1,2)	1,5 (1,1-2,0)
- /m1m1	571	368	1,2 (1,0-1,5)	1,3 (1,0-1,7)
- /m1m2	362	228	1,2 (1,0-1,5)	1,3 (1,0-1,7)
- /m2m2	70	65	1,8 /1,3-2,6)	1,9 (1,0-3,9)
- /m1m2+m2m2	432	293	1,3 (1,1-1,6)	1,3 (1,0-1,8)
NUNCA FUMADORES (N = 2.098)				
	1.304	794		
+ /m1m1	407	196	1,0 (ref)	1,0 (ref)
+ /m1m2	332	195	1,2 (1,0-1,6)	1,5 (1,0-2,1)
+ /m2m2	63	58	1,9 (1,3-2,8)	2,3 (1,2-4,3)
+ /m1m2+m2m2	395	253	1,3 (1,1-1,7)	1,6 (1,1-2,2)
- /m1m1	239	166	1,4 (1,1-1,9)	1,6 (1,1-2,3)
- /m1m2	226	138	1,3 (1,0-1,7)	1,3 (0,9-1,9)
- /m2m2	37	41	2,3 (1,4-3,7)	2,1 (0,9-4,6)
- /m1m2+m2m2	263	179	1,4 (1,1-1,8)	1,4 (0,9-2,0)
ALGUNA VEZ FUMADORES (N = 1.285)				
	743	542		
+ /m1m1	245	182	1,0 (ref)	1,0 (ref)
+ /m1m2	163	79	0,7 (0,5-0,9)	1,2 (0,7-2,0)
+ /m2m2	27	25	1,3 (0,7-2,2)	2,9 (1,0-8,8)
+ /m1m2+m2m2	190	104	0,7 (0,5-1,0)	1,3 (0,8-2,3)
- /m1m1	196	168	1,2 (0,9-1,5)	1,0 (0,7-1,5)
- /m1m2	93	74	1,1 (0,8-1,5)	1,3 (0,7-2,2)
- /m2m2	19	14	1,0 (0,5-2,0)	1,7 (0,3-8,4)
- /m1m2+m2m2	112	88	1,1 (0,8-1,5)	1,3 (0,8-2,2)
CAVIDAD ORAL (N = 3.880)				
	2.536	1.344		
+ /m1m1	809	369	1,0 (ref)	1,0 (ref)
+ /m1m2	608	285	1,0 (0,9-1,2)	1,4 (1,0-1,8)
+ /m2m2	116	96	1,8 (1,4-2,4)	2,5 (1,4-4,2)
+ /m1m2+m2m2	724	381	1,2 (1,0-1,4)	1,5 (1,1-2,0)
- /m1m1	571	312	1,2 (1,0-1,4)	1,3 (1,0-1,6)
- /m1m2	362	217	1,3 (1,1-1,6)	1,3 (0,9-1,8)
- /m2m2	70	65	2,0 (1,4-2,9)	2,0 (1,0-4,0)
- /m1m2+m2m2	432	282	1,4 (1,2-1,7)	1,3 (1,0-1,8)

GSTM1/CYP1A1 (msp1)	Controles (N)	Casos (N)	OR Cruda (IC 95%)	OR Ajustada* (IC 95%)
FARINGE (N =2.660)				
	2.536	124		
+ /m1m1	809	50	1,0 (ref)	1,0 (ref)
+ /m1m2	608	7	0,2 (0,1-0,4)	1,7 (0,6-5,1)
+ /m2m2	116	0	-	-
+ /m1m2+m2m2	724	7	0,2 (0,1-0,4)	1,7 (0,6-4,7)
- /m1m1	571	56	1,6 (1,1-2,4)	1,5 (0,9-2,6)
- /m1m2	362	11	0,5 (0,3-1,0)	1,0 (0,4-2,4)
- /m2m2	70	0	-	-
- /m1m2+m2m2	432	11	0,4 (0,2-0,8)	0,9 (0,4-2,1)

*Ajustado por número de estudio, edad (<54, 54-95), raza y tabaco (nunca/alguna vez) cuando se consideró apropiado..

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Hipótesis nulas (H_0):

1. El consumo de tabaco no influye en el riesgo de desarrollar cáncer de cavidad oral y faringe.
2. El alcohol no está asociado con la aparición de cáncer de cavidad oral y faringe.
3. Las mutaciones genéticas a nivel del CYP1A1 (exón 7), epóxido hidrolasa (exón 4) y GSTM1 (alelo nulo) no intervienen en la aparición del cáncer de cavidad oral y faringe. No existe modificación de efecto con factores de riesgo como el tabaco y el alcohol.

Hipótesis alternativas (H_1):

1. El consumo tabaco aumenta significativamente el riesgo de desarrollar cáncer de cavidad oral y faringe.
2. El alcohol aumenta significativamente el riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe.
3. Las mutaciones genéticas a nivel del CYP1A1 (exón 7), epóxido hidrolasa (exón 4) y GSTM1 (alelo nulo) influyen significativamente en el riesgo de desarrollar cáncer de cavidad oral y faringe. Este riesgo se modifica en combinación con factores de riesgo como el tabaco y el alcohol.

2.2. Objetivos

1. Analizar el papel que juega el tabaco (tipo de tabaco, intensidad (nº de cigarrillos/día), duración del hábito, cantidad acumulada, edad de inicio, años de abstinencia) en la aparición del cáncer de cavidad oral y faringe.
2. Investigar el riesgo de cáncer de cavidad oral y faringe asociado al consumo de alcohol (tipo de bebida alcohólica, frecuencia, intensidad (gr de alcohol/semana). Investigar la interacción entre el consumo de tabaco y alcohol.
3. Investigar la relación existente entre los polimorfismos genéticos del CYP1A1 (exon 7), epóxido hidrolasa (exón 4) y GSTM1 (alelo nulo) y el cáncer de cavidad oral y faringe. Analizar las posibles modificaciones de efecto inducidas por la combinación de estos genes, así como la interacción con el tabaco y el alcohol.

3. SUJETOS Y MÉTODOS

3. SUJETOS Y MÉTODOS

3.1. Diseño

Para cumplir con los objetivos del estudio se realizó un diseño de casos y controles de base hospitalaria. El reclutamiento de los casos y controles fue llevado a cabo entre enero de 1996 y agosto del 2000 en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago. Este Complejo reúne los hospitales de referencia para el Área Sanitaria de Santiago de Compostela, cuya superficie es de aproximadamente 5.000 kilómetros cuadrados y cubre, según datos publicados por el Servicio Gallego de Salud (<http://www.sergas.es/>) una población de 418.965 habitantes. En 1996, esta población era de 465.786 habitantes. Fundamentalmente incluye tres zonas geográficas: urbana, rural y costera. Casi la cuarta parte de los pacientes provienen del municipio de Santiago de Compostela, con unos 100.000 habitantes.

El estudio de casos y controles se restringió a sujetos de sexo masculino mayores de 20 años. Tras el consentimiento informado, todos los sujetos del estudio fueron entrevistados personalmente utilizando un cuestionario estructurado y se les extrajeron 6 ml de sangre. El protocolo de estudio había sido aprobado previamente por el Comité Ético de Investigaciones Clínicas de Galicia.

3.2. Selección y recogida de casos

Se consideraron como casos a todos los sujetos con diagnóstico anatomopatológico incidente de cáncer de cavidad oral y faringe (Clasificación Internacional de Enfermedades- Décima revisión (CIE-10): localizaciones C00-C14).

Se consideraron como criterios de exclusión:

- la presentación de neoplasias previas o sospecha de metástasis de cavidad oral y faringe.
- la presentación de tumores de labio por considerar que estos tumores presentan una etiología muy diferente a la del resto de tumores de cavidad oral y faringe
- Negativa a participar.

La identificación de los casos se llevó a cabo con la colaboración del Servicio de Otorrinolaringología. Semanalmente se revisaban los informes de Anatomía Patológica para detectar nuevos casos de cavidad oral y faringe. Se identificaron un total de 93 casos nuevos entre enero de 1996 y agosto del 2000. Sólo uno fue excluido por negarse a participar.

Con el permiso y colaboración de los responsables del Servicio de Otorrinolaringología se citaba a los sujetos, previo consentimiento informado, el día de la primera o segunda consulta para realizarles la entrevista. Las entrevistas fueron realizadas en el Servicio de Medicina Preventiva. Cuando fue posible, la extracción de sangre fue realizada a la vez que se realizaba la toma de sangre para otros procedimientos médicos, evitando de esta forma pinchazos innecesarios.

3.3. Selección y recogida de controles

Se consideraron como controles a sujetos que fueron programados para un Preoperatorio en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago por motivos de cirugía banal supuestamente no relacionada con el alcohol y el tabaco en el mismo período que se produjo el reclutamiento de los casos.

Se consideraron como criterios de exclusión:

- Sujetos con cirugías mayores.

- Sujetos que presentaron neoplasias previas, con independencia de la localización.

- Sujetos que padecieron patologías orales premalignas (leucoplasia, displasia, eritroplasia, eritroleucoplasia, etc).

- Negativa a participar.

Los controles fueron seleccionados mediante muestreo sistemático de todos los sujetos programados para cirugía banal. Se seleccionaron un total de 245 controles. De éstos nueve fueron excluidos por presentar neoplasias previas. Rechazaron participar en el estudio seis sujetos. Los controles procedieron en su mayoría del Servicio de Oftalmología ($\approx 40\%$) y Cirugía General Digestiva ($\approx 30\%$). De éstos, más del 80% estaban programados para ser intervenidos de cataratas y hernias inguinales. El otro procedimiento más frecuente fue de cirugía ortopédica.

Una vez localizados los controles se acudía al programa informático TNVT para averiguar la fecha en que tenían citas en consultas externas y programar la entrevista para ese mismo día. Tras obtener el consentimiento informado, los controles fueron citados el día de la consulta externa para acudir a la entrevista en el Servicio de Medicina Preventiva. Con la colaboración de la Unidad de Preoperatorio y el consentimiento informado del sujeto, la extracción de sangre fue realizada a la vez que se realizaba la toma de sangre para otros procedimientos médicos, evitando de esta forma pinchazos innecesarios.

3.5. Recogida de información

La información referente a los casos y a los controles fue obtenida mediante una entrevista personal empleando un cuestionario estructurado. Los casos fueron entrevistados antes de someter al individuo a procedimientos médicos mayores o tratamientos que pudiesen alterar sus hábitos, su habilidad para comunicarse o su capacidad de recuerdo. La entrevista a los casos se realizó lo antes posible y siempre en un intervalo de 15 días desde el diagnóstico. En la entrevista se recogió información sobre parámetros demográficos y socioeconómicos (fecha de entrevista, datos de filiación, situación laboral actual y precedente, exposición a productos químicos, nivel de estudios y datos económicos), antecedentes familiares de cáncer, antecedentes personales de enfermedades, consumo de medicamentos, hábito tabáquico, consumo de alcohol y dieta (anexo II)

Con el objetivo de minimizar el sesgo de información todas las entrevistas fueron realizadas por dos únicas personas y en la medida posible se intentó que todas fuesen realizadas en el ámbito hospitalario. En los casos fue posible entrevistar a todos los sujetos en el Servicio de Medicina Preventiva. De los controles un 16% (n=37) fue entrevistado en la casa del sujeto al no acudir éste a la consulta programada.

El cuestionario utilizado para la recogida de datos se elaboró introduciendo ligeras modificaciones en un cuestionario anterior que había sido validado para obtener información sobre los factores de riesgo en el cáncer de pulmón.

El cuestionario se estructuró en 11 apartados con una serie de preguntas específicas de cada tema:

1. Datos de filiación
2. Residencia
3. Actividad laboral

4. Nivel educativo
5. Nivel económico
6. Antecedentes familiares
7. Antecedentes personales
8. Consumo de tabaco
9. Consumo de alcohol
10. Encuesta sobre dieta

Las preguntas fueron mayoritariamente preguntas cerradas con respuestas dicotómicas o múltiples. En el anexo II se presenta una copia del cuestionario utilizado en el presente estudio.

3.6. Descripción y definición de las variables

Para poder llevar a cabo el análisis estadístico de los datos, se registró toda la información relevante obtenida a través del cuestionario y las variables de estudio fueron clasificadas en variables cuantitativas (continuas o discretas) o cualitativas (nominales u ordinales). Como variables de estudio se recogieron aquellas relacionadas con los principales factores de riesgo del cáncer de cavidad oral y faringe (tabaco, alcohol y ocupación), así como las relacionadas con los polimorfismos genéticos evaluados en el presente estudio. En algunos casos, para facilitar la interpretación y análisis de los resultados, las variables recogidas inicialmente fueron recodificadas en variables distintas.

Los fumadores fueron clasificados como nunca fumadores, fumadores actuales, o alguna vez fumadores. Los “alguna vez” fumadores fueron definidos como aquellos sujetos que fumaron al menos un cigarrillo por día durante un período mínimo de 6 meses. Los fumadores actuales fueron definidos como sujetos que tenían el hábito en el momento de la entrevista o que fumaron en los 6 meses anteriores. Se clasificaron como exfumadores a los sujetos que habían dejado el hábito tabáquico desde hace más de seis meses. Para los fumadores se

recogieron: el número de cigarrillos fumados al día, la duración del hábito, el tipo de tabaco, la edad de inicio y la edad de cese del hábito tabáquico. La exposición acumulada o la cantidad total de tabaco fumada durante la vida se calculó como paquetes-año. Los paquetes-año se calcularon multiplicando el número de paquetes fumados al día por el número de años que se fuma esa cantidad (1 paquete/año equivale a haber fumado un paquete de cigarrillos al día durante un año).

En base a la frecuencia de consumo de alcohol procedente del vino, cerveza y licores los sujetos fueron clasificados como nunca consumidores, consumidores ocasionales (2-3 veces/mes), consumidores regulares (1-6 veces/semana) y consumidores diarios. Para los consumidores regulares y diarios se registró el número de bebidas consumidas por día o semana.

Los datos sobre la cantidad de alcohol ingerido fueron analizados utilizando la clasificación y tipología fijada por la Dirección General de Salud Pública y empleada previamente en la "Encuesta domiciliaria sobre consumo de drogas 1997" (Ministerio de Sanidad y Consumo), que utiliza un índice denominado "unidad de bebida estándar" (UBE). Según esta clasificación 1 UBE se corresponde con el consumo de 1 vaso de vino/1 cerveza/1 aperitivo y es equivalente, según ciertos autores, al consumo de 10 gramos de alcohol¹⁸⁶. El consumo de 1 bebida de destilados es equivalente a 2 UBE.

Empleando igualmente esta tipología los individuos fueron clasificados como *nunca bebedores/bebedores ligeros* cuando consumieron menos de 2 UBE (0-140 gr/semana), *moderados a altos* cuando consumieron de 3-8 UBE (141-560 gr/semana), *excesivos* cuando consumieron de 9-12 UBE (561-840 gr/semana) y de *alto riesgo* cuando consumieron más de 12 UBE (>841 gr/semana). En este caso no fue posible establecer una categoría de *no bebedores* al existir sólo dos no bebedores en la muestra analizada.

Aunque inicialmente las ocupaciones fueron recogidas como variables cualitativas nominales, éstas fueron recodificadas en cualitativas discretas teniendo en cuenta los resultados de investigaciones previas que investigaron la asociación entre la ocupación y el cáncer de cavidad oral y faringe. Del total de 32 grupos ocupacionales registrados fueron clasificados como de alto riesgo los siguientes:

- Pintores⁷¹
- Electricistas y trabajadores de la industria electrónica^{29,69,70}
- Fontaneros⁶⁹
- Marineros¹⁸⁷
- Trabajadores de la hostelería^{72,73}
- Mecánicos⁷⁶
- Conductores y maquinistas¹⁸⁸
- Trabajadores relacionados con la construcción, el metal, la industria textil, la minería, la cerámica, el vidrio, la fundición, el papel, el cuero, la madera y la mueblería^{69,73,75,189,190}.

En la tabla 18 se resumen las principales variables originales de estudio así como las variables recodificadas.

Tabla 18. Variables originales y variables recodificadas

Nombre de la variable	Tipo de variable inicial	Variables recodificadas
Caso o control	Cualitativa dicotómica: Caso/control	-
Edad	Cuantitativa continua	-
Nivel de estudios	Cualitativa ordinal: sin estudios, primarios, secundarios, universitarios	
Estado civil	Cualitativa nominal: casado, separado o viudo, soltero	-
Localización del tumor	Cualitativa nominal: (19 localizaciones)	
Tipo histológico	Cualitativa nominal: epidermoide, adenocarcinoma, no hodgking, no diferenciados, otros.	
Ocupación principal	Cualitativa nominal: (32 categorías)	Cualitativa ordinal: Bajo riesgo/ Alto riesgo
Estado de fumador	Cualitativa ordinal: nunca, alguna vez, fumador actual	
Tipo de tabaco	Cualitativa nominal: blanco, negro, indistinto	
Número de cigarrillos diarios	Cuantitativa continua	Cuantitativa discreta (3 categorías): 1-20, 21-40, > 40 cigarrillos
Duración del hábito (años)	Cuantitativa continua	Cuantitativa discreta (4 categorías): 1-20, 21-30, 31-40, > 40 años
Cantidad fumada en la vida (paquetes-año)	Cuantitativa continua	Cuantitativa discreta (2 categorías): 1-40, > 40 paquetes-año
Edad al comienzo del hábito (años)	Cuantitativa continua	Cuantitativa discreta (2 categorías): ≤ 15 años, > 15 años
Edad de cese del hábito (años)	Cuantitativa continua	
Años de abstinencia (años)	Cuantitativa continua: edad actual-edad del cese del hábito tabáquico	Cuantitativa discreta (2 categorías): 1-10, > 10 años
Consumo de vino semanal	Cuantitativa discreta: 1=2-3 veces/mes, 2=1v/semana, 3=2-3v/semana; 4=4-5 v/semana; 5=todos los días	
Consumo de cerveza semanal	Cuantitativa continua (número)	
Consumo de licores semanal	Cuantitativa continua (número)	
Consumo de alcohol semanal (gr/semana)	-	Cuantitativa discreta (4 categorías): 0-140, 141-560, 561-840, > 840 gr/semana
GSTM1	Cualitativa nominal: Ausente/Presente	
CYP1A1	Cualitativa nominal: Ile/Ile, Ile/Val, Val/Val	
mEH	Cualitativa nominal: His/His, His/Arg, Arg/Arg	

3.7. Métodos de laboratorio.

√ Obtención y extracción de ADN

Después de indentificar los casos y los controles, se extrajeron muestras de sangre de 6 ml de cada individuo en tubos de heparina. Estas muestras fueron guardadas en la nevera a 4°C y en las siguientes 24 horas se centrifugaban a 2800 rpm durante un tiempo mínimo de 10 minutos. La centrifugación consiguió la separación de tres fracciones independientes: plasma, "buffy coat" y suero. El plasma sobrenadante fue eliminado de la interfase y la fase color crema denominada "buffy coat" y el suero fueron pipeteados a dos tubos distintos y guardados a -84°C.

La extracción del ADN se llevó a cabo en el departamento de Antropología de la Facultad de Biología (Universidad de Santiago de Compostela). Para éste análisis se utilizó el "buffy coat", que es la capa intermedia que contiene leucocitos. Fueron analizadas 222 muestras pertenecientes a los 92 casos incluidos en el estudio y a los 130 primeros controles. Para la extracción del ADN se empleó el método del fenol-cloroformo y precipitación con etanol tal y cómo se describe a continuación. Previa a la extracción de ADN las células fueron lavadas con tampón TE (1X) y centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos varias veces hasta que se observó que estaban limpias. A continuación el "pellet" se trató con tampón de lisis 1, se volvió a centrifugar a 3000 rpm, y se trató con tampón de lisis 2 y proteinasa K en 1% TBS. Para la obtención y extracción del ADN se empleó el método del fenol-cloroformo-alcohol isoamílico:

A. Obtención de ADN:

El proceso consta de los siguientes pasos:

1. 1 ml buffy coat + TE (1X) hasta alcanzar un volumen final de 12 ml. Homogeneizar en vórtex.
2. Centrifugar a 3.000 rpm, 10 minutos a 4°C. Eliminar sobrenadante.
3. Repetir el proceso hasta observar que no existen restos de sangre.
4. Proceder a la lisis celular por adición de 8 ml de tampón de lisis 1. Homogeneizar en vórtex.
5. Incubar en hielo picado 10 minutos.
6. Centrifugar a 3.000 rpm, 10 minutos a 4°C. Eliminar sobrenadante.
7. Resuspender el precipitado en 1 ml de TBS aspirando varias veces con una pipeta.
8. Añadir 1 ml de tampón de lisis 2 y 500 µgrs de proteinasa K (50 µl de una solución 10 mgrs/ml).
9. Incubar a 55°C, 60 minutos.

B. Extracción con fenol-cloroformo

1. 2,5 ml de muestra + 2,5 ml de fenol-cloroformo isoamílico (25:24:1).
2. Agitar invirtiendo el tubo durante 5 minutos.
3. Centrifugar a 2.500 rpm, 7 minutos a T^a ambiente. Decantar la fase superior a otro tubo.
4. Repetir el proceso una segunda vez.
5. Añadir 2,5 de cloroformo isoamílico (24:1).
6. Agitar invirtiendo el tubo 5 minutos.
7. Centrifugar a 2.500 rpm, 7 minutos, T^a ambiente. Decantar fase superior a otro tubo.

C. Precipitación con etanol

1. Añadir acetato amónico 10M hasta una concentración de 2,5M.
2. Añadir 3 volúmenes de etanol 95%.
3. Invertir el tubo varias veces hasta observar la aparición de una madeja de ADN.
4. Centrifugar a 4.000 rpm, 30 minutos.
5. Dejar secar el ADN hasta que se evapore el etanol.
6. Resuspender en tampón TE (1X), normalmente en 300 µL.
7. Incubar toda la noche a 42-50° para que el ADN resuspenda totalmente.

SOLUCIONES NECESARIAS:

TAMPÓN TE:

10 mM TRIS/HCl PH 8,0

1 mM EDTA PH 8,0

TAMPÓN TBS:

20 mM TRIS/HCl PH 7,5

150 mM NaCl

TAMPÓN LISIS I:

10 mM TRIS/HCl PH 7,5

10 mM NaCl

3 mM MgCl₂

TAMPÓN LISIS 2:

400 mM TRIS/HCl PH 8,0

100 mM EDTA PH 8,0

1% SDS

√Determinación de los polimorfismos genéticos

Los ensayos de genotipado fueron llevados a cabo en el departamento de Antropología de la Facultad de Biología (Universidad de Santiago de Compostela) y en la Unidad de Medicina Molecular del Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela.

Todas las determinaciones fueron llevadas a cabo mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR tiene como objetivo reproducir múltiples copias de un fragmento de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos (dNTPs) en el medio, que son la materia base para fabricar el ADN (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (en inglés "primer"). La reacción consta de tres fases. Durante la primera fase o *desnaturalización* se produce la separación de las dos cadenas de ADN. En la segunda fase, llamada *templado*, los cebadores oligonucleotídicos se enlazan con el ADN escindido. En la tercera fase o de *polimerización*, la polimerasa copia rápidamente la molécula de ADN.

La mezcla de reactivos para cada PCR se preparó en un volumen total de 12,5 µl. Esta mezcla de reacción se preparó con los siguientes reactivos y los respectivos cebadores para cada polimorfismo:

- 20 mM Tris-HCl (PH 8.4),
- 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂,
- 10 µM de cada uno de los cebadores

- 1 U Taq ADN polimerasA (Promega),

- 2 mM de dNTPs

- 600-900 ng de ADN.

La reacción de la PCR fue llevada a cabo en un termociclador empleando condiciones distintas para los tres polimorfismos. En cada tanda de muestra que se introdujo en el termociclador se incluyó un control negativo. El control negativo era un tubo que en vez de ADN contenía el mismo volumen de agua y la misma cantidad del resto de reactivos. El objetivo de este control era garantizar la no contaminación de los productos, ya que en los controles negativos no podía salir ningún tipo de banda. En caso contrario, se deduciría que las muestras estaban contaminadas.

En el caso concreto de la GSTM1, a la mezcla anterior se le añadió 0,25 μ M del cebador de la β -globina (control interno). Este gen está siempre presente y por lo tanto si no aparece ninguna banda nos permite asegurar que realmente se trata del genotipo nulo y no de un problema de amplificación.

Los productos resultantes de la PCR fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñida con bromuro de etidio para poder separar las distintas bandas en función de su PM. La muestra fue preparada utilizando 10 μ l del producto de la PCR y 2 μ l de un marcador de peso molecular con colorante (PHix-174 Hae III). Esta muestra fue corrida a un voltaje constante de 80 voltios/hora y visualizada mediante luz ultravioleta. Para descartar cualquier contaminación eventual se incluyeron controles internos en cada determinación.

A continuación se describen las condiciones de la PCR para los tres polimorfismos investigados, así como la forma de visualización de los mismos.

- Polimorfismo nulo de la GSTM1

La determinación del polimorfismo nulo de la *GSTM1* se llevó a cabo utilizando una modificación del método descrito con anterioridad por *Bell et al*¹⁹¹.

Se emplearon los siguientes cebadores:

5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAGC

5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- 94° durante 3 minutos

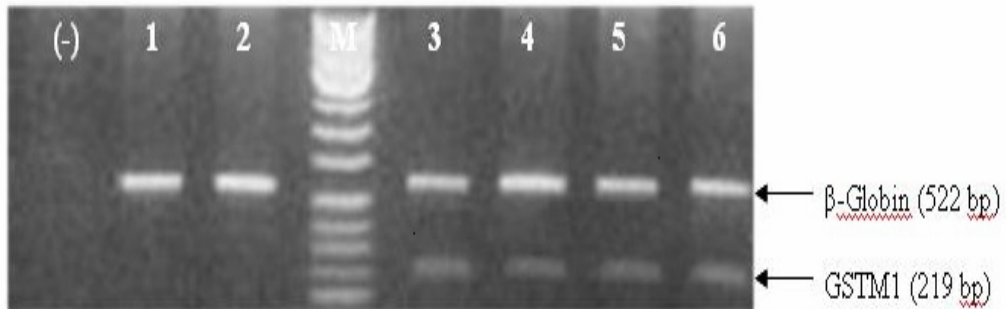
- 35 ciclos de 94°C por 30 segundos

- 60°C durante 30 segundos

- 72°C durante 45 segundos

- Extensión final de 72°C durante 7 minutos.

Una banda de 219 pb denota la presencia del gen *GSTM1*. El polimorfismo nulo de la *GSTM1* se identificó por la ausencia de esta banda cuando se llevó a cabo la electroforesis (ver ilustración 1).

Ilustración 1. Visualización de los polimorfismos de la GSTM1.

- Polimorfismo del exón 4 de la epóxido hidrolasa

Para analizar el polimorfismo del *exón 4 de la epóxido hidrolasa (EH^{139arg})* se empleó una modificación de un método previamente descrito por *Zhao et al*¹⁹².

La determinación consistió en 2 fases:

1) Una amplificación de un fragmento de 357 pares de bases que contiene la zona del polimorfismo.

Para esta amplificación se utilizaron los siguientes cebadores (Sigma-Genosys):

5'-GGGGTGCCAGAGCCTGACCGT-3'

5'-AACACCGGGCCCACCCTTGGC-3'

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- 95°C durante 2 minutos

- 35 ciclos de 95°C por 30 segundos

- 60°C durante 30 segundos

- 72°C durante 30 segundos

- Extensión final de 72°C durante 7 minutos

2) Digestión del producto de la PCR durante toda la noche.

Se preparó una mezcla de reactivos en un volumen total de 25 µl conteniendo 10 µl del producto de la PCR y 1 µl de enzima RsaI (10U/µL) (Invitrogen). Se colocó en un baño maría a 37°C y se dejó durante toda la noche.

El genotipo salvaje (AA) originó dos bandas de diferentes tamaños: 295-pares de bases (pb) y 62-bp.

El genotipo heterocigoto (AG) originó cuatro bandas: 295-pb, 174-pb y 121-bp y 62-pb.

El alelo raro homocigoto (GG) proporcionó 3 bandas: 174-pb, 121-pb y 62-pb.

- Polimorfismos del CYP1A1 (Ile/Val)

El polimorfismo *CYP1A1 Ile-Val* sólo pudo ser analizado en 158 de los 222 individuos incluidos (66 casos, 92 controles). El procedimiento empleado fue descrito previamente por el grupo de *Hayashi et al*¹⁰⁴.

Se llevaron a cabo dos reacciones de amplificación para cada uno de los sujetos analizados. Una con los cebadores 1A1.1/1A1A que reconocen el alelo Ile462 y otra con los primers 1A1.1/1A1G, que reconocen el alelo Val462 allele.

1A1G: 5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT-3'

1A1A:5'-AAGACCTCCCAGCGGGCAAT-3'

1A1.1:5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT-3'

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- 94°C durante 5 minutos

- 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto

- 70° durante 1 minuto

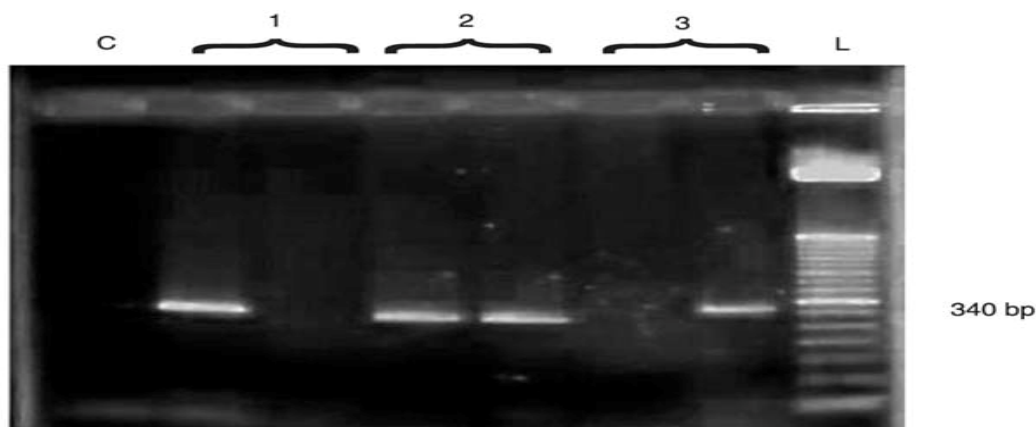
- Extensión final de 72°C durante 5 minutos

-Los pacientes homocigotos para la Ile (A/A) generaron un producto de 340 pb cuando se utilizó el cebador 1A1.1 y ninguno cuando se empleó el cebador 1A1G (banda 1 en la ilustración 2)

-Los pacientes homocigotos para la Val (G/G) generaron un producto cuando se llevó a cabo la amplificación con el cebador 1A1G pero no cuando se llevó a cabo la amplificación con el cebador 1A1.1 (banda 3 en la ilustración 2)

-Los pacientes heterocigotos (A/G) generaron un producto cuando se llevó a cabo la amplificación con el cebador 1A1G y otro cuando se llevó a cabo la amplificación con el cebador 1A1.1 (banda 2 en la ilustración 2).

Ilustración 2. Visualización de los polimorfismos del CYP1A1 (Ile/Val)



3.8. Análisis de datos

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versión 12.0.

√Análisis univariante

El análisis univariante estudia el comportamiento de las variables por separado. En este caso el análisis univariante se empleó para llevar a cabo un análisis descriptivo. Este análisis se utilizó para analizar la distribución de ciertas variables cualitativas, como la localización del tumor y para calcular las medias de ciertas variables continuas como la edad o la duración del hábito. Para otras variables continuas, como la cantidad consumida de alcohol y tabaco se calculó el valor de los percentiles 25, 50, 75.

√Análisis bivariante

Se utilizaron diagramas de cajas (*boxplot*) para comparar las edades de los casos y de los controles. También se compararon el consumo de cigarrillos y el consumo de alcohol mediante diagramas de caja.

√Análisis multivariante

Para evaluar la asociación entre los distintos factores de riesgo y el cáncer de cavidad oral y faringe se realizaron regresiones logísticas multivariantes no condicionadas, calculando la *odds ratio* (OR) con su intervalo de confianza del 95%¹⁹³. Por sus características, los modelos de regresión logística permiten dos finalidades:

1. Cuantificar la importancia de la relación existente entre cada una de las covariables y la variable dependiente, lo que lleva implícito también clarificar la existencia de interacción y confusión entre covariables respecto a la variable dependiente (es decir, conocer la *odds ratio* para cada covariable).
2. Clasificar individuos dentro de las categorías (presente/ausente) de la variable dependiente, según la probabilidad que tenga de pertenecer a una de ellas dada la presencia de determinadas covariables.

En los modelos de regresión logística binaria la variable dependiente es una variable dicotómica que se codifica como 0 o 1 (ausencia y presencia respectivamente). En nuestro caso la variable dependiente fue la presencia o ausencia de cáncer de cavidad oral y faringe (caso o control) y las variables independientes el tabaco, el alcohol y los polimorfismos analizados. Todos los modelos fueron ajustados por edad, nivel de estudios y ocupación.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4.1. Características de la población objeto de estudio

Se incluyeron un total de 322 sujetos masculinos: 92 casos y 230 controles. En la tabla 19 se resumen las principales características de estos sujetos.

Tabla 19. Principales características de los sujetos a estudio.

Características de los sujetos	Controles (n=230)	Casos (n=92)
Edad		
Rango	23-86	34-83
Media (IC95%)	60,5 (58,8-62,1)	55,0 (52,7-57,3)
Nivel de estudios		
Sin estudios reconocidos	70 (30,4%)	25 (27,5%)
Estudios primarios	135 (58,7%)	63 (69,2%)
Estudios secundarios	19 (8,3%)	2 (2,2%)
Estudios universitarios	6 (2,6%)	1 (1,1%)
Estado de fumador		
Nunca fumador	82 (35,7%)	2 (2,2%)
Ex fumador	81 (35,2%)	17 (18,5%)
Fumador actual	67 (29,1%)	73 (79,3%)
Cantidad fumada* (cig/día)		
Media (IC95%)	23,1 (20,8-25,4)	29,3 (26,2-32,5)
Duración del hábito tabáquico*		
Media (IC95%)	33,67 (31,18-36,18)	35,3 (32,7-37,9)
Edad de inicio del hábito tabáquico		
Rango	(8-51)	(8-55)
Media (IC95%)	16,3 (14,8-17,8)	11,4 (10,2-12,7)
Ingesta de alcohol		
Media (IC95%) (gr/semana)	242,8 (205,1-280,4)	679,2 (568,9-789,5)
No/Bebedores ligeros (\leq 2 UBE por día)	76 (33%)	5 (5,4%)
Bebedores moderados/altos (3-8 UBE por día)	102 (44,3%)	22 (23,9%)
Bebedores excesivos (9-12 UBE por día)	30 (13%)	22 (23,9%)
Bebedores de alto riesgo (>12 UBE por día)	22 (9,6%)	43 (46,7%)
Ocupaciones de alto riesgo		
No	100 (43,5%)	15 (16,3%)
Si	130 (56,5%)	77 (83,7%)

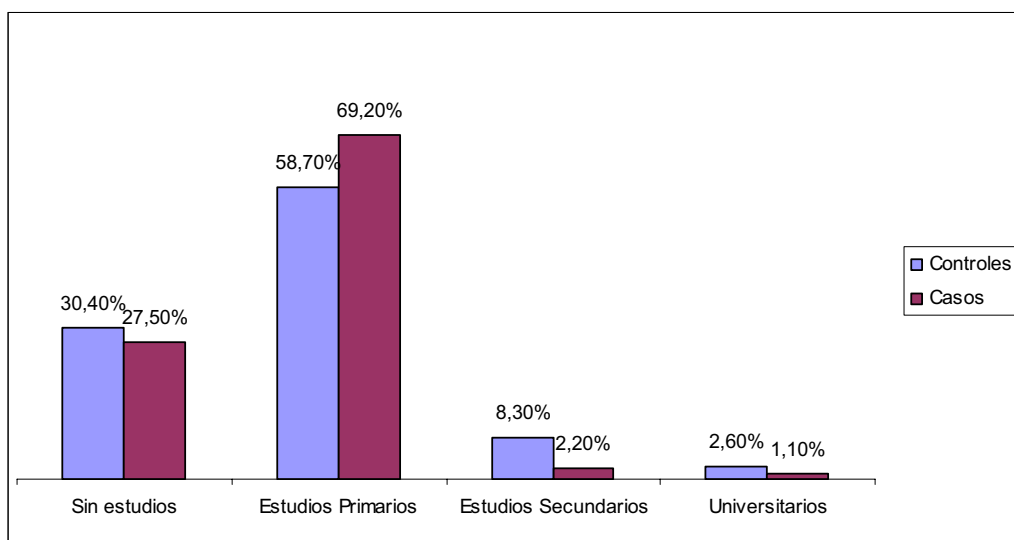
UBE=Unidad básica estándar (1 copa de vino/1 cerveza/1 aperitivo)

*Porcentajes calculados para los "alguna vez" fumadores.

La edad media de los controles (60,5 años; IC 95% 58,8-62,1) fue ligeramente superior a la de los casos (55 años; IC 95% 52,7-57,3) aunque la diferencia no fue significativa.

Los casos y los controles manifestaron niveles similares de educación, presentando la mayoría de los sujetos sólo estudios primarios o ningún estudio formalizado.

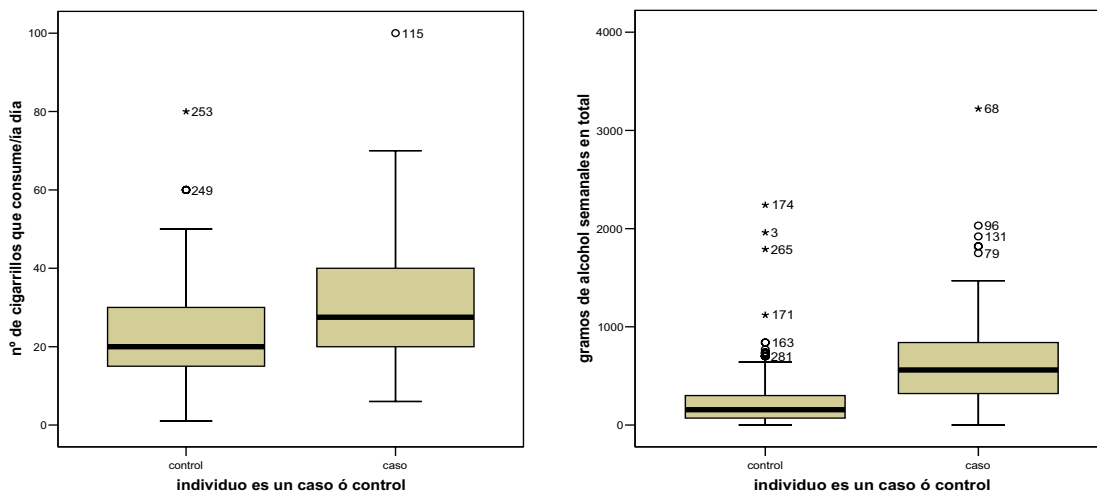
Figura 22. Distribución de los niveles de estudios entre los casos y los controles



En el grupo de los casos, el 79,3% eran fumadores actuales y el 46,7% fueron clasificados como bebedores de alto riesgo. Sólo un 5,4% era no bebedor o bebía menos del equivalente a 1 vaso de cerveza/vino. En el grupo control había un 29,1% de fumadores actuales y un 9,6% de bebedores de alto riesgo. El porcentaje de no bebedores/bebedores ligeros fue del 33%.

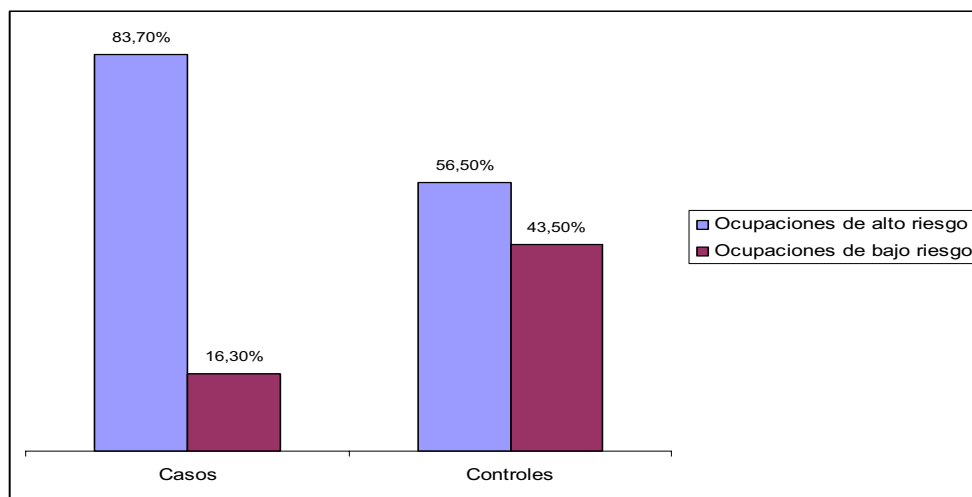
De forma general, el consumo de tabaco y de alcohol fue superior en el grupo de los casos que en el de los controles.

Figura 23. Diagrama box-plot del consumo de tabaco y alcohol entre los casos y los controles



La prevalencia de ocupaciones consideradas de alto riesgo fue muy superior en el grupo de los casos en comparación a los controles.

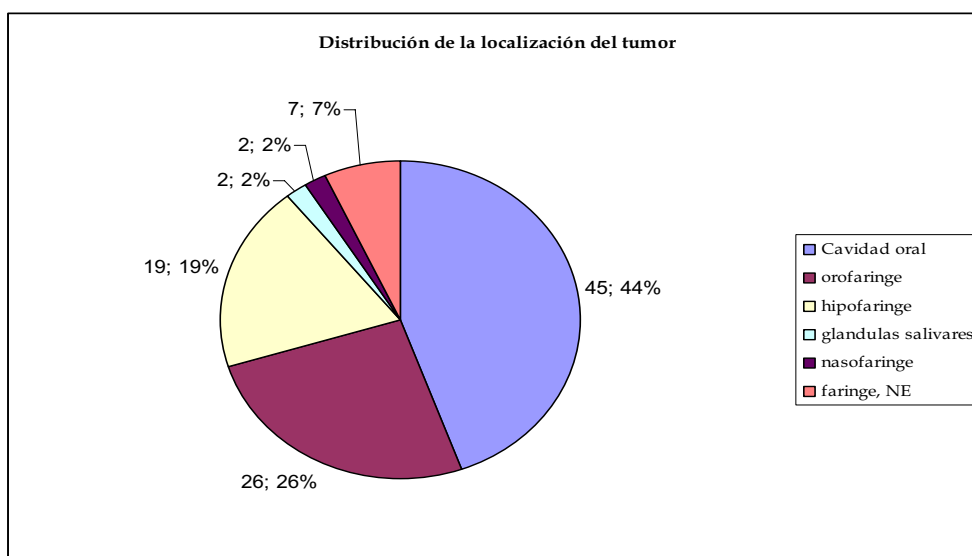
Figura 24. Distribución de las ocupaciones de alto riesgo entre los casos y os controles



4.2. Descripción de los casos

En la figura 25 se representa la distribución de los tumores según la localización.

Figura 25. Distribución de los tumores según localización (n; %)



Se puede observar que la mayoría se localizaron en la cavidad bucal y orofaringe, siendo los tumores más frecuentes los de lengua (25%), amígdalas (18,5%), suelo de la boca (7,6%) y paladar duro (6,5%). En la tabla 20 se describen las localizaciones exactas de dichos tumores.

Tabla 20. Localizaciones de los tumores de cavidad oral y faringe

Localización del tumor	n (%)
lengua	23 (25,0%)
hemilengua	4 (4,3%)
faringe	7 (7,6%)
hipofaringe	3 (3,3%)
pilar amigdalino anterior derecho	2 (2,2%)
seno piriforme derecho	6 (6,5%)
suelo de boca	7 (7,6%)
cavum	2 (2,2%)
pared lateral de la orofaringe	1 (1,1%)
amígdala	17 (18,5%)
valecula	3 (3,3%)
surco glosopiglótico	1 (1,1%)
úvula	2 (2,2%)
parótida	2 (2,2%)
paladar	6 (6,5%)
trígono retromolar	3 (3,3%)
retroacroides	1 (1,1%)
maxilar superior derecho	1 (1,1%)
submaxilar derecho	1 (1,1%)
Total	92 (100%)

Respecto al tipo histológico se encontró que de los 92 tumores, 89 eran de tipo espinocelular (96,7%), uno era un adenocarcinoma (1%) y dos (2,2%) eran de tipo no diferenciado.

4.3. Tabacoⁱⁱ

4.3.1. Características del consumo de tabaco

En la tabla 21 se resumen las principales características de los sujetos relacionadas con el consumo de tabaco.

Tabla 21. Principales características de los sujetos en cuanto al consumo de tabaco.

Características de los sujetos	Controles (n=230)	Casos (n=92)
Estado de fumador		
Nunca fumador	82 (35,7%)	2 (2,2%)
Ex fumador	81 (35,2%)	17 (18,5%)
Fumador actual	67 (29,1%)	73 (79,3%)
Cantidad fumada* (cig/día)		
Media (IC95%)	23,1 (20,8-25,4)	29,3 (26,2-32,5)
1-20	98 (66,2%)	44 (48,9%)
21-40	41 (27,7%)	38 (42,2%)
> 40	9 (6,1%)	8 (8,9%)
Duración del hábito tabáquico*		
1-20	28 (18,9%)	6 (6,7%)
21-30	34 (23%)	23 (25,6%)
31-40	38 (25,7%)	31 (34,4%)
> 40	48 (32,4%)	30 (33,3%)
Cantidad fumada durante toda la vida (paquetes-año)*		
1-40	88 (52,4%)	36 (40%)
>40	80 (47,6%)	54 (60%)
Edad de inicio del hábito tabáquico		
Rango	(8-51)	(8-55)
Media (CI95%)	16,3 (14,8-17,8)	11,4 (10,2-12,7)

*Porcentajes calculados para los "alguna vez" fumadores.

4.3.2. Asociación entre el tabaco y el cáncer de cavidad oral y faringe

Para investigar la asociación entre el tabaco y el cáncer de la cavidad oral y de faringe se analizaron las siguientes variables independientes en modelos sucesivos: a) estado

ⁱⁱLos resultados sobre la asociación entre el tabaco y el cáncer de cavidad oral y faringe han sido enviados a "Cancer Letters" y el artículo está en fase de revisión. El artículo enviado se puede consultar en el anexo IV.

de fumador, b) tipo de tabaco, c) cantidad fumada (cigarrillos/día), d) duración del hábito, e) cantidad fumada durante toda la vida (paquetes-año), f) años desde el cese del hábito, g) edad de inicio del hábito tabáquico y, h) interacción con el alcohol.

✓ *Estado de fumador*

Tomando como referencia la categoría de no fumadores y ajustando por la edad, consumo de alcohol en gr/semana, ocupaciones de riesgo, nivel de estudios y consumo acumulado de tabaco durante toda la vida, el análisis multivariante mostró una importante asociación entre el tabaco y el cáncer de cavidad oral y faringe (tabla 22). El riesgo de los que fumaron alguna vez en su vida fue casi 30 veces mayor que los que nunca fumaron. Los fumadores actuales presentaron un riesgo 2 veces mayor que los exfumadores.

✓ *Tipo de tabaco*

En cuanto al tipo de tabaco se observó que el riesgo de los fumadores de tabaco negro (OR=33,1 IC95% 6,03-168,8) fue aproximadamente el doble que los fumadores de tabaco rubio (OR=15,4 IC95% 2,8-84,9).

Tabla 22. Riesgo del cáncer de la cavidad oral según el estado de fumador y tipo de tabaco.

	Casos (n=92)	Controles (n=230)	OR cruda ¹ (IC 95%)	OR ajustada ² (95%CI)
Estado de fumador				
Nunca fumador	2	82	1.00 (referencia)	1.00 (referencia)
Alguna vez fumador	90	148	25,5 (6,1-107,7)	27,7 (6,1-126,3)
Fumador actual	73	67	41,4 (9,8-175,4)	34,5 (7,5-157,8)
Ex-fumadores	17	81	9,2 (2,1-41,6)	14,8 (2,9-73,5)
Tipo de tabaco				
Rubio	11	31	11,5 (2,4-55,7)	15,4 (2,8-84,9)
Negro	79	105	36,2 (8,4-155,8)	33,1 (7,2-152,8)
Indistinto	0	13	-	-

¹ Ajustado por edad; ² Ajustado por edad, consumo de alcohol en gr/semana, (4 categorías), ocupaciones de riesgo (2 categorías), nivel de estudios (4 categorías) and consumo acumulado de tabaco (3 categorías).

✓ Cantidad fumada (cig/día)

Para analizar el riesgo asociado al número de cigarrillos fumados al día, los sujetos fueron divididos en 4 categorías: no fumadores, fumadores de 1-20, 31-40 y > 40 cigarrillos/día (tabla 23). Cuando se ajustó el modelo por la edad, consumo de alcohol en gr/semana, (4 categorías), ocupaciones de riesgo (2 categorías), nivel de estudios (4 categorías) y duración del hábito se encontró que de forma global el riesgo para los alguna vez fumadores era aproximadamente el doble en los individuos que fumaban más de 20 cig/día en comparación a los que fumaban entre 1-20 cigarrillos/día. Estratificando por estado de fumador se observó que el riesgo para los fumadores actuales era muy alto y que esta relación no dependía en gran medida de la cantidad fumada al día ($OR_{1-20 \text{ cig/día}}=42,8$ IC95% 0,4-148,3; $OR_{>20 \text{ cig/día}}=46,9$ CI95% 3,4-871,5). Para los ex-fumadores las estimaciones del riesgo (OR) solo fueron estadísticamente significativas para los sujetos que fumaban más de 20 cigarrillos/día ($OR=30,8$ IC95% 2,5-384,6).

✓ Duración del hábito

El riesgo asociado a la duración del hábito se investigó clasificando a los sujetos en 5 categorías (0, 1-20, 21-30, 31-40 and > 40 años). El modelo se ajustó por edad, consumo de alcohol en gr/semana, ocupaciones de riesgo, número de cigarrillos diarios y nivel de estudios. De forma global se observó que el riesgo permaneció relativamente constante durante los primeros 30 años de duración y se duplicó a partir de ese tiempo (tabla 23). Estratificando por estado de fumador se encontró que el riesgo de los fumadores actuales era independiente de la duración del hábito. En los ex fumadores el riesgo fue no significativo con independencia de la duración del hábito.

✓ *Consumo acumulado*

El consumo acumulado de tabaco a lo largo de toda la vida se investigó en 3 categorías (0, 1-40 y > 40 paquetes-año). De forma global se encontró una importante relación dosis respuesta entre el consumo acumulado de tabaco y el riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe ($OR_{1-40 \text{ paquetes-año}}=15,6$ IC95% 2,8-87,06; $OR_{>40 \text{ paquetes-año}}= 46,5$ IC95% 8,2-264,2). Para los exfumadores el riesgo sólo fue significativo para la categoría de fumadores de más de 40 paquetes-año, alcanzando en este grupo valores similares de riesgo a los observados en los fumadores actuales.

✓ *Años de abstinencia*

Para explorar el riesgo de cavidad oral y faringe entre ex-fumadores, los sujetos fueron agrupados en dos categorías (1-10 años y > 10 años de abstinencia). El modelo fue ajustado por edad, consumo acumulado de tabaco a lo largo de la vida, consumo de alcohol en gr/semana, ocupaciones de alto riesgo y nivel de estudios. En comparación a los fumadores, los exfumadores presentaron importantes reducciones en el riesgo durante los primeros 10 años de cese del hábito tabáquico, aunque las reducciones sólo fueron significativas a partir de los 10 años (tabla 24).

✓ *Edad de inicio del hábito*

Agrupando a los sujetos en 2 categorías y ajustando el modelo por edad, consumo acumulado de tabaco a lo largo de la vida, consumo de alcohol en gr/semana, ocupaciones de alto riesgo y nivel de estudios, se observó que los sujetos que empezaron a fumar después de los 15 años tenían un riesgo significativamente inferior frente a los que empezaron a fumar antes de los 15 años.

Tabla 23. Riesgo de cavidad oral y faríngea en relación a la cantidad fumada, duración del hábito y consumo acumulado a lo largo de la vida (paquetes año)

	Casos (n=92)	Controles (n=230)	OR cruda ¹ (IC 95%)	OR ajustada ² (95%CI)
Cantidad fumada (cig/día)²				
<i>Nunca fumadores</i>	2	82	1,00 (referencia)	1,00 (referencia)
<i>Alguna vez fumadores</i>				
1-20	44	98	19,1 (4,4-82,1)	7,5 (1,02-54,7)
21-40	38	41	37,8 (8,6-166,4)	13,5 (1,7-104,9)
> 40	8	9	35,4 (6,4-195,1)	15,8 (1,56-160,8)
<i>Fumadores actuales</i>				
1-20	39	38	39,1 (8,9-171,1)	42,8 (3,9-755,2)
> 20	34	29	44,6 (10,0-198,0)	46,9 (3,4-871,5)
<i>Ex-fumadores</i>				
1-20	5	60	3,6 (0,67-19,5)	3,5 (0,3-36,7)
> 20	12	21	23,8 (4,9-115,4)	30,8 (2,5-384,6)
Duration del hábito tabáquico (años)³				
<i>Nunca fumadores</i>	2	82	1,00 (referencia)	1,00 (referencia)
<i>Alguna vez fumadores</i>				
1-20	6	28	7,6 (1,3-42,7)	7,8 (1,1-56,3)
21-30	23	36	20,8 (4,4-98,4)	8,3 (1,3-52,6)
31-40	31	37	46,5 (9,5-227,4)	18,4 (2,9-117,3)
> 40	30	47	88,9 (15,8-501,2)	20,7 (2,9-143,5)
<i>Fumadores actuales</i>				
1-30	25	22	32,5 (6,9-153,9)	24,5 (3,3-183,2)
> 30	48	45	46,6 (10,6-204,2)	24,2 (3,6-126,6)
<i>Ex-fumadores</i>				
1-30	4	40	3,8 (0,65-22,6)	0,8 (0,07-8,5)
> 30	13	41	26,1 (4,4-155,6)	2,7 (0,23-31,8)
Consumo acumulado de tabaco (paq-año)⁴				
<i>Nunca fumadores</i>	2	82	1,00 (referencia)	1,00 (referencia)
<i>Alguna vez fumadores</i>				
1-40	36	88	15,5 (3,5-68,2)	15,6 (2,8-87,06)
> 40	54	60	51,65 (11,5-232,5)	46,5 (8,2-264,2)
<i>Fumadores actuales</i>				
1-40	31	34	30,0 (6,7-13,9)	27,5 (4,6-165,4)
> 40	42	33	54,8 (12,3-242,7)	40,0 (6,8-234,4)
<i>Ex-fumadores</i>				
1-40	5	54	4,05 (0,7-22,2)	4,4 (0,71-27,3)
>40	12	27	26,9 (4,99-145,2)	42,7 (6,6-278,05)

¹ Ajustado por edad. ² Ajustado por edad, consumo de alcohol en gr/semana (4 categorías), duración del hábito (3 categorías), ocupaciones de alto riesgo (sí/no) y nivel de estudios. ³ Ajustado por edad, consumo de alcohol en gr/semana (4 categorías), cantidad fumada (cig/día) (3 categorías), ocupaciones de alto riesgo (yes/no) y nivel de estudios. ⁴ Ajustado por edad, consumo de alcohol en gr/semana (3 categorías), ocupaciones de alto riesgo (sí/no) y nivel de estudios.

Tabla 24. Asociación entre los años del cese del hábito tabáquico, edad de inicio y el cáncer de cavidad oral y faringe

	Casos (n=92)	Controles (n=230)	OR cruda ¹ (IC 95%)	OR ajustada ² (IC95%)
Años desde el cese del hábito tabáquico				
<i>Fumadores actuales</i>	73	67	1,00 (referencia)	1,00 (referencia)
1-10	10	31	0,3 (0,14-0,7)	0,6 (0,2-1,5)
> 10	7	50	0,1 (0,1-0,4)	0,3 (0,1-0,9)
<i>Nunca fumadores</i>	2	82	1,00 (referencia)	1,00 (referencia)
1-10	10	31	13,7 (2,8-66,8)	3,5 (0,4-28,7)
> 10	7	50	6,2 (1,2-31,6)	2,9 (0,4-20,7)
Edad de inicio del hábito tabáquico				
≤ 15 años	49	55	1,00	1,00
> 15 años	58	93	0,4 (0,2-0,8)	0,5 (0,2-0,9)

¹ Ajustado por edad; ² Ajustado por edad, consumo acumulado a lo largo de la vida (3 categorías), consumo de alcohol en gr/semana (4 categorías), ocupaciones de alto riesgo (si/no) y nivel de estudios (4 categorías).

4.4. Alcohol

4.4.1. Características del consumo de alcohol

En la tabla 25 se presentan las características específicas del consumo de alcohol. De forma general se puede observar que los casos son mayores consumidores de alcohol que los controles. Esto se cumple para todo tipo de bebidas.

Tabla 25. Características del consumo de alcohol

Características de los pacientes	Controles (n=230)	Casos (n=92)
Consumo de vino		
No bebe vino	41 (17,8%)	4 (4,3%)
Esporádicamente	6 (2,6%)	0 (0%)
Varias veces a la semana	20 (8,7%)	3 (3,3%)
Todos los días	163 (70,9%)	85 (92,4%)
Tipo de vino		
Ninguno	41 (17,8%)	5 (5,4%)
Blanco	22 (9,6%)	16 (17,4%)
Tinto	114 (49,6%)	39 (42,4%)
Rosado	18 (7,8%)	16 (17,4%)
Indistinto	35 (15,2%)	16 (17,4%)
Nº de vasos de vino a la semana		
No bebe o esporádicamente	47 (20,4%)	4 (4,3%)
1-14	47 (20,4%)	6 (6,5%)
15-42	87 (37,8%)	37 (40,2%)
43-56	31 (13,5%)	13 (14,1%)
> 56	18 (7,8%)	32 (34,8%)
Nº de vasos de vino/día para consumidores diarios		
1-2	28 (12,2%)	5 (5,4%)
3-6	86 (37,4%)	35 (38,1%)
7-10	39 (16,9%)	16 (17,4%)
> 10	10 (4,3%)	29 (31,5%)
Número de cervezas a la semana		
0	137 (59,6%)	47 (51,1%)
1-7	65 (28,3%)	9 (9,8%)
8-14	12 (5,2%)	13 (14,1%)
15-28	12 (5,2%)	14 (15,2%)
> 28	4 (1,7%)	9 (9,8%)
Número de bebidas destiladas a la semana		
0	169 (73,5%)	33 (35,9%)
1-7	41 (17,8%)	22 (23,9%)
8-21	15 (6,5%)	22 (23,9%)
> 21	5 (2,2%)	15 (16,3%)
Gramos de alcohol semanales en total		
0-140 g (\leq 2 UBE por día)	76 (33%)	5 (5,4%)
141-560 g (3-8 UBE día)	102 (44,3%)	22 (23,9%)
561-840 g (9-12 UBE)	30 (13%)	22 (23,9%)
> 840 g ($>$ 12 UBE)	22 (9,6%)	43 (46,7%)

4.4.2. Asociación entre el alcohol y el cáncer de cavidad oral y faringe

Para investigar la asociación entre el alcohol y el cáncer de cavidad oral y faringe se analizaron las siguientes variables independientes en modelos sucesivos: a) tipo de bebida b) Cantidad de bebida consumida a la semana (nº bebidas/semana), c) Consumo alcohólico (gr/semana) y d) clase de bebida.

✓ *Tipo de consumo*

Para evaluar el riesgo de los bebedores de un tipo de bebida en relación a los no bebedores de esa bebida se crearon 2 categorías para cada bebida alcohólica (bebedores y no bebedores). El análisis estadístico se llevó a cabo tomando a los no bebedores como categoría de referencia. Ajustando el modelo por edad, consumo de tabaco, nivel de estudios, y ocupación se observó un aumento significativo en el riesgo para los bebedores de vino y los bebedores de licores pero no para los bebedores de cerveza (tabla 26).

Tabla 26. Riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe en función del tipo de consumo

	Casos (n=92)	Controles (n=230)	OR ¹ crudo IC95%	OR ajustado ² IC 95%
No beben vino o beben esporádicamente	4	47	1,00	1,00
Beben vino	88	183	6,44 (2,18-19,01)	3,8 (1,05-14,07)
No beben cerveza	47	137	1,00	1,00
Beben cerveza	45	93	1,2 (0,7-1,99)	0,72 (0,38-1,33)
No beben bebidas destiladas	33	169	1,00	1,00
Beben bebidas destiladas	59	61	4,5 (2,7-7,7)	2,98 (1,6-5,5)

¹ Ajustado por edad. ² Ajustado por edad, consumo de tabaco (cigarrillos día (1-20, 21-40 y más de 40), nivel de estudios, consumo de otras bebidas alcohólicas y ocupación de riesgo (si/no).

✓ *Cantidad de bebida consumida a la semana*

Para evaluar el riesgo en función de la cantidad de bebida consumida a la semana (nº bebidas) se crearon distintas categorías de consumo para cada tipo de bebida alcohólica (tabla 27). Se creó un modelo con todas las variables de consumo y se ajustó por edad, consumo de tabaco, ocupaciones de riesgo y nivel de estudios. Los

no bebedores fueron la categoría de referencia para la cerveza y bebidas destiladas. Debido a que sólo existían 2 casos que no consumían vino la categoría de referencia en este caso fueron los no bebedores/bebedores ligeros.

Respecto al consumo de vino, se observó que el riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe aumentaba significativamente cuando el consumo de vino era superior a 15 vasos/semana. En el caso de las bebidas destiladas el riesgo era significativo ya a partir de 7 licores por semana. Para consumos inferiores, el riesgo se mantenía constante y no alcanzaba la significación estadística. La cerveza se mostró protectora a bajos niveles de consumo.

Tabla 27. Riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe en función de la cantidad de bebida consumida a la semana.

	Casos (n=92)	Controles (n=230)	OR cruda ¹ IC95%	OR ajustada ² IC 95%
Vino				
0-14 vasos/semana	10	94	1,00	1,00
15-42 vasos/semana	37	87	4,4 (2,07-9,7)	3,1 (1,2-7,7)
43-56 vasos/semana	13	31	5,07 (1,9-13,2)	3,0 (1,0-9,1)
> 56	32	18	19,4 (7,8-48,2)	10,2 (3,3-31,3)
Cerveza				
0	47	137	1,00	1,00
1-14 cervezas/semana	22	77	0,8 (0,4-1,5)	0,5 (0,2-0,9)
> 14 cervezas/semana	23	16	4,3 (2,1-8,8)	1,2 (0,5-2,9)
Bebidas destiladas				
0	33	169	1,00	1,00
1-7 licores semana	22	41	2,6 (1,4-4,9)	1,9 (0,8-4,2)
> 7	37	20	9,3 (4,9-18,3)	2,8 (1,2-6,7)

¹ Ajustado por edad. ² Ajustado por edad, consumo de tabaco (cigarrillos día (1-20, 21-40 y más de 40), nivel de estudios, consumo de otras bebidas alcohólicas (categorías) y ocupación de riesgo (sí/no).

✓ *Consumo alcohólico (gr/semana)*

En la tabla 28 se representa el riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe en función del consumo alcohólico. De forma general se puede observar un gradiente dosis respuesta importante, siendo el riesgo significativo sólo para bebedores excesivos y bebedores de alto riesgo (consumidores de más de 9 UBE).

Tabla 28. Riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe en función del consumo alcohólico

	Casos (n=92)	Controles (n=230)	OR ¹ cruda IC95%	OR ajustada ² IC 95%
No/bebedores ligeros (≤ 2 UBE por día)	76	5	1,00	1,00
Bebedores moderados/altos (3-8 UBE día)	102	22	3,4 (1,2-9,7)	2,4 (0,8-7,4)
Bebedores excesivos (9-12 UBE)	30	22	11,8 (4,02-34,7)	6,5 (2,0-20,9)
Bebedores de alto riesgo (> 12 UBE)	22	43	29,2 (10,1-84,1)	16,3 (5,2-51,4)

¹ Ajustado por edad. ² Ajustado por edad, consumo de tabaco (cigarrillos/día (1-20, 21-40 y más de 40), nivel de estudios y ocupación de riesgo (sí/no).

✓ *Clase de bebida*

En la tabla 29 se pueden observar los riesgos de padecer cáncer de la cavidad y faringe en función de la clase de bebida consumida. Ajustando el modelo por edad, consumo de tabaco, nivel de estudios, ocupación de riesgo y consumo total de alcohol se encontró que el riesgo era sólo significativo para el vino rosado pero no para el tinto y blanco. En el caso de bebidas destiladas los resultados apuntan hacia un mayor riesgo para las bebidas destiladas oscuras (whisky, brandy, ron oscuro, etc), pero la diferencia fue mínima frente a las blancas.

Tabla 29. Riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe en función de la clase de bebida.

	Casos (n=92)	Controles (n=230)	OR ¹ cruda IC95%	OR ajustada ² IC 95%
Tipo de vino				
No beben vino	4	41	1,00	1,00
Blanco	16	22	6,7 (1,9-23,0)	2,6 (0,6-10,3)
Tinto	39	114	3,8 (1,2-11,5)	1,9 (0,5-6,5)
Rosado	16	18	10,6 (3,1-37,4)	4,8 (1,1-2,02)
Indistinto	17	35	5,02 (1,5-16,7)	1,2 (0,9-1,0)
Tipo de bebidas destiladas				
No beben	169	33	1,00	1,00
Blancas (aguardiente, ginebra, ron blanco)	25	17	3,3 (1,6-6,8)	1,9 (0,8-4,4)
Oscuras (whisky, brandy, ron oscuro)	25	25	4,3 (2,1-8,5)	2,3 (1,0-5,1)
Ambas	11	17	6,7 (2,8-15,8)	3,0 (1,1-8,4)

¹ Ajustado por edad. ² Ajustado por edad, consumo de tabaco (cigarrillos día (1-20, 21-40 y más de 40), nivel de estudios y gramos de alcohol semanal total de alcohol (continuo), y ocupación de riesgo (sí/no).

✓ *Interacción entre el tabaco y el alcohol*

En la tabla 30 se muestran los riesgos de padecer cáncer de cavidad oral y faringe para distintas variables relacionadas con el tabaco en el grupo de los no bebedores/bebedores ligeros y en el grupo de los bebedores moderados/excesivos. Ajustando por edad, ocupaciones de riesgo y nivel de estudios, se observó que en comparación con los no fumadores, el riesgo para los fumadores que eran no bebedores o bebedores moderados era no significativo. El riesgo en este grupo aumentó con la frecuencia y con el consumo acumulado a lo largo de la vida pero no alcanzó la significación estadística. El riesgo aislado para los no bebedores no se pudo calcular debido a que el estudio incluyó sólo 5 casos que consumieron menos de 2 UBE al día.

Para el grupo de los bebedores moderados/excesivos la asociación entre el tabaco y el cáncer de la cavidad oral y de faringe fue altamente significativa en todas las categorías analizadas y el riesgo aumentó considerablemente con el aumento en el número de cigarrillos, duración del hábito y exposición acumulada al tabaco.

Tabla 30. Interacción entre el tabaco y el alcohol

	No/bebedores ligeros (≤ 2 UBE* por día)			Moderados/excesivos (> 3 UBE por día)		
	Casos	Controles	OR (95%CI) ¹	Casos	Controles	OR (95%CI) ¹
Estado de fumador						
Nunca fumadores	1	32	1,00 (referencia)	1	50	1,00 (referencia)
Alguna vez fumadores	4	44	3,7 (0,4-35,8)	86	104	44,9 (4,9-411,8)
Tipo de tabaco						
Rubio	1	10	3,5 (0,3-371)	10	21	18,5 (1,8-191,6)
Negro	3	29	6,4 (0,3-142,9)	76	75	59,1 (6,4-546,3)
Cantidad fumada (cig/día)						
1-20	2	30	2,4 (0,2-28,9)	42	68	32,4 (3,6-293,2)
> 20	2	14	8,2 (0,6-11,2)	44	36	62,7 (6,9-569,7)
Duración del hábito (años)						
1-30	2	20	4,3 (0,31-57,9)	27	42	20,3 (2,05-201,9)
> 30	2	24	3,2 (0,2-43,7)	59	62	77,2 (7,8-757,5)
Consumo acumulado (paq-año)						
1-40 paquetes-año	2	29	2,4 (0,2-29,3)	34	59	24,5 (2,6-228,8)
> 40	2	15	8,4 (0,6-121,2)	52	45	74,4 (8,02-390,6)

* UBE= Unidad básica estándar. ¹Ajustado por edad, ocupaciones de alto riesgo (sí/no) y nivel de estudios.

4.5. Polimorfismos de la GSTM1 (alelo nulo), CYP1A1 (Ile/Val) y mEH exón 4 (139 Arg→His) y su asociación con el cáncer de la cavidad oral y de faringeⁱⁱⁱ

4.5.1. Características de la población sometida a la determinación genotípica

La determinación genotípica se llevó a cabo en el total de los casos (n=92) y en una submuestra de controles (n=130). En la tabla 31 se resumen las características de esta submuestra analizada en nuestro estudio.

Tabla 31. Descripción de las características de los sujetos sometidos a determinación genotípica.

Características de los sujetos	Casos (n=92)	Controles (n=130)
Edad (media, IC95%)	55,0 (52,7-57,3)	59,4 (57,0-61,8)
Hábito tabáquico		
Nunca fumador	2 (2,2%)	49 (37,7%)
Ex fumador	17 (18,5%)	42 (32,3%)
Fumador actual	73 (79,3%)	39 (30%)
Consumo tabáquico		
Percentil 25	33,0	0
Percentil 50	46,5	0,9
Percentil 75	67,5	43,8
Ingesta de alcohol		
No bebedor	2 (2,2%)	20 (15,4%)
Bebedores leves (\leq 4 vasos de vino/cerveza o 2 licores a la semana)	6 (6,5%)	50 (38,5%)
Bebedores importantes ($>$ 4 UBE)	84 (91,3%)	60 (46,1%)
Consumo de alcohol en gr/semana		
Percentil 25	290	70
Percentil 50	560	145
Percentil 75	840	300

La edad media de los controles (59,4 años; IC 95% 57-61,8) fue ligeramente superior a la de los casos (55 años; IC 95% 52,7-57,3). El consumo de tabaco y alcohol también fue más frecuente entre los casos que entre los controles. En el grupo de los casos el

ⁱⁱⁱ Los resultados sobre la asociación entre los polimorfismos de la GSTM1, CYP1A1 y mEH han sido publicados en el Journal of Oncology “Varela Lema L, Ruano Raviña A, Juiz Crespo MA, Kelsey KT, Loidi L, Barros Dios JM. CYP1A1, mEH and GSTM1 polymorphisms and risk of oral and pharyngeal cancer: a Spanish case-control study. J Oncology 2008; ID 74130; doi: 10.1155/2008/741310”¹⁹⁴. Este artículo se presenta en el anexo V.

79,3% eran fumadores actuales y el 91,3% (n=84) fueron considerados bebedores importantes (más de 4 copas de vino/cerveza o 2 bebidas destiladas al día). En el grupo de los controles eran fumadores actuales el 30% de los sujetos y un 46,1% (n=60) fueron clasificados como importantes bebedores.

✓ *Descripción de los polimorfismos genéticos*

La frecuencia del genotipo nulo de la GSTM1 fue del 51,1% entre los casos de cáncer de cavidad oral y faringe y del 47,7% entre los controles. El polimorfismo heterocigoto de la mEH (Arg/His) estaba presente en el 27,2% de los casos y en 31,5% de los controles. Sólo 4 sujetos en el grupo de los casos (4,3%) y 1 sujeto en el grupo de los controles (0,8%) presentaron el polimorfismo homocigoto mutado (Arg/Arg). No se observaron diferencias en cuanto a la frecuencia de las mutaciones del CYP1A1. Sólo 2 casos (3%) y 2 controles (2,2%) presentaron formas alélicas mutadas (tabla 32)

Tabla 32. Descripción de las frecuencias de los polimorfismos.

VARIABLES CONSIDERADAS PARA EL ESTUDIO	CASOS (n=92)	CONTROLES (n=130)
GSTM1		
Presente (GSTM1 +)	45 (48,9%)	68 (52,3%)
Ausente (GSTM1 -)	47 (51,1%)	62 (47,7%)
mEH (139 Arg → His)		
Alelo salvaje (His/His)	63 (68,5%)	88 (67,7%)
Arg/His	25 (27,2%)	41 (31,5%)
Arg/Arg	4 (4,3%)	1 (0,8%)
CYP1A1		
Alelo salvaje (Ile/Ile)	64 (97%)	90 (97,8%)
Alelos mutados (Ile/Val, Val/Val)	2 (3%)	2 (2,2%)

4.5.2. Asociación entre los polimorfismos genéticos de la GSTM1 (alelo nulo), CYP1A1 (Ile/Val) y mEH (exón 4) y el riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe.

En la tabla 33 se muestran las estimaciones del riesgo (OR) para los tumores de cavidad oral y faringe asociado a los polimorfismos de la GSTM1, CYP1A1 y mEH exón 4 (EH^{139arg}). Tomando como referencia los sujetos con alelos salvajes y ajustando por edad, consumo de tabaco y alcohol no se observaron riesgos significativos para ninguna de las variantes alélicas evaluadas.

Cuando los tumores de la cavidad oral y los tumores de faringe fueron evaluados de forma independiente tampoco se observaron riesgos significativos para ninguno de los polimorfismos. No se pudo calcular el riesgo a nivel del CYP1A1 dado que ninguno de los sujetos con tumores de la cavidad oral presentó mutaciones.

Tabla 33. Asociación entre los polimorfismos genéticos de la GSTM1 (alelo nulo), CYP1A1 (Ile/Val) y mEH exón 4 y el riesgo de cavidad oral y faringe

Genes	Casos	Controles	OR cruda (IC 95%) ¹	OR ajustada (IC 95%) ²
TODOS LOS TUMORES				
CYP1A1				
No mutado	64 (97%)	90 (97,8%)	1,00	1,00
Mutado	2 (3%)	2 (2,2%)	0,72 (0,10-5,28)	1,68 (0,18-15,70)
mEH (139His→Arg)				
His/His	63 (68,5%)	88 (67,7%)	1,00	1,00
His/Arg	25 (27,2%)	41 (31,5%)	0,95 (0,52-1,75)	0,81 (0,38-1,71)
Arg/Arg	4 (4,3%)	1 (0,8%)	4,30 (0,46-40,1)	4,45 (0,39-50,45)
GSTM1				
Presente	45 (48,9%)	68 (52,3%)	1,00	1,00
Ausente	47 (51,1%)	62 (47,7%)	1,16 (0,73-1,99)	1,25 (0,65-2,40)
CÁNCER ORAL				
CYP1A1				
No mutado	53	64 (97%)	1,00	1,00
Mutado	0	2 (3%)	-----	-----
mEH (139His→Arg)				
His/His	39 (73,6%)	88 (67,7%)	1,00	1,00
His/Arg	12 (22,6%)	41 (31,5%)	0,74 (0,34-1,58)	0,54 (0,21-1,41)
Arg/Arg	2 (3,8%)	1 (0,8%)	3,44 (0,29-40,16)	4,32 (0,32-58,63)
GSTM1				
Presente	26 (49,1%)	68 (52,3%)	1,00	1,00
Ausente	27 (50,9%)	62 (47,7%)	1,14 (0,60-2,19)	1,20 (0,56-2,18)

Genes	Casos	Controles	OR cruda (IC 95%) ¹	OR ajustada (IC 95%) ²
CÁNCER DE FARINGE				
CYP1A1				
No mutado	37 (94,9%)	64 (97%)	1,00	1,00
Mutado	2 (5,1%)	2 (3%)	1,74 (0,23-12,92)	4,06 (0,43-38,24)
mEH (139His→Arg)				
His/His	24 (61,5%)	88 (67,7%)	1,00	1,00
His/Arg	13 (33,3%)	41 (31,5%)	1,27 (0,58-2,80)	1,07 (0,42-2,71)
Arg/arg	2 (5,2%)	1 (0,8%)	5,58 (0,47-66,10)	5,74 (0,34-97,71)
GSTM1				
Presente	19 (48,7%)	68 (52,3%)	1,00	1,00
Ausente	20 (51,3%)	62 (47,7%)	1,20 (0,58-2,48)	1,44 (0,61-3,37)

¹Ajustado por edad. ²Ajustado por edad, consumo de tabaco y consumo de alcohol.

✓ Interacción con el tabaco

Para valorar la interacción entre el tabaco y los polimorfismos genéticos se llevó a cabo un análisis estratificado de acuerdo al consumo acumulado de tabaco a lo largo de la vida (paquetes-año). Los sujetos fumadores fueron clasificados en *fumadores ligeros/moderados* (≤ 35 paquetes-año) y *grandes fumadores* (> 35 paquetes-año). Los no fumadores fueron analizados conjuntamente con los fumadores ligeros/moderados, debido a que sólo existían dos sujetos no fumadores en el grupo de los casos y esto impedía poder analizar este grupo por separado. El análisis se ajustó por edad y consumo de alcohol.

En la tabla 34 se muestra el riesgo de los diferentes polimorfismos en los dos estratos de fumadores. Este análisis no se pudo llevar a cabo para el CYP1A1 dado el limitado número de sujetos con alelos mutados.

El riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe asociado al polimorfismo heterocigoto de la mEH a nivel del exón 4 (EH^{139arg}) fue ligeramente inferior en los *grandes fumadores* (OR 0,68; IC 95% 0,25-1,86) que en los *fumadores ligeros/moderados* (OR 1,08; IC 95% 0,37-3,13) pero no se alcanzó la significación estadística en ninguna de las dos categorías de consumo. El riesgo asociado al genotipo nulo de la GSTM1 mostró un patrón inverso. El riesgo fue mayor en los *grandes fumadores* (OR 1,40 IC95% 0,57-3,43) que en los *fumadores ligeros/moderados* (OR 0,88 IC95% 0,34-2,34).

Resultados

Tabla 34. Riesgo asociado a los diferentes polimorfismos estratificados por categorías de consumo de tabaco.

Polimorfismos genéticos	Casos	Controles	OR cruda ¹	OR ajustada ²
No/fumadores ligeros/moderados (≤ 35 paquetes-año)				
CYP1A1				
No mutato	28	41	1,00	1,00
Mutado	1	2	0,76 (0,06-8,90)	1,12 (0,09-13,94)
mEH (139His→Arg)				
His/His	20	58	1,00	1,00
His/Arg	8	24	1,06 (0,40-2,78)	1,08 (0,37-3,13)
Arg/arg	1	1	1,91 (0,11-33,10)	2,82 (0,15-52,41)
GSTM1				
Presente	17	43	1,00	1,00
Ausente	12	40	0,74 (0,31-1,76)	0,88 (0,34-2,34)
Grandes fumadores (> 35 paquetes-año)				
CYP1A1				
No mutado	23	62	1,00	1,00
Mutado	0	1	-----	-----
mEH (139His→Arg)				
His/His	43	30	1,00	1,00
His/Arg	17	17	0,94 (0,39-2,26)	0,68 (0,25-1,86)
Arg/arg	3	0	-----	-----
GSTM1				
Presente	28	25	1,00	1,00
Ausente	35	22	1,50 (0,67-1,33)	1,40 (0,57-3,43)

¹Ajustado por edad. ²Ajustado por edad y consumo de alcohol.

✓ Interacción con el alcohol

Para examinar la interacción entre estos genotipos y el consumo de alcohol se llevó a cabo un segundo análisis estratificado. Se establecieron dos categorías de consumo de alcohol. Los sujetos que consumían 280 gr alcohol/semana o menos (≤ 4 copas de vino/cerveza o 2 bebidas destiladas al día) fueron considerados *bebedores leves* y los que consumían más de esta cantidad *bebedores importantes*, incluyendo en esta categoría los grandes consumidores así como los excesivos y de alto riesgo. Al igual que en el análisis anterior, el bajo número de sujetos no bebedores en el grupo de los casos ($n=2$), hizo imposible el análisis de este grupo por separado y fueron analizados conjuntamente con los *bebedores leves*. Las estimaciones de riesgo para los diferentes polimorfismos en los dos estratos de consumo de alcohol se muestran en la tabla 35.

Después de ajustar por edad y tabaco se observó una ligera asociación negativa para el genotipo His/Arg (exón 4 mEH) en ambas categorías de consumo pero no se alcanzó la significación estadística en ningún caso. Respecto a la GSTM1 se observó que el riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe asociado a la ausencia de este polimorfismo era ligeramente superior en los *bebedores leves* (OR 1,97; IC 95% 0,73-5,35) que en los *bebedores importantes* (OR 0,69; IC 95% 0,28-1,72) (tabla 35).

Tabla 35. Riesgos para los diferentes polimorfismos estratificados por consumo alcohólico.

Polimorfismos genéticos	Casos	Controles	OR cruda ¹	OR ajustada ²
Bebedores leves (≤ 280 gr alcohol/semana)				
CYP1A1				
No mutado	23	43	1,00	1,00
Mutado	0	2	-----	-----
mEH (139His→Arg)				
His/His	18	64	1,00	1,00
His/Arg	5	31	0,57 (0,19-1,72)	0,71 (0,22-2,24)
Arg/arg	0	1	-----	-----
GSTM1				
Presente	10	52	1,00	1,00
Ausente	13	44	1,55 (0,62-3,88)	1,97 (0,73-5,35)
Bebedores relevantes (>280 gr alcohol/semana)				
CYP1A1				
No mutado	67	21	1,00	1,00
Mutado	2	0	-----	-----
mEH (139His→Arg)				
His/His	45	24	1,00	1,00
His/Arg	20	10	1,28 (0,50-3,31)	0,83 (0,30-2,30)
Arg/arg	4	0	-----	-----
GSTM1				
Presente	35	16	1,00	1,00
Ausente	34	18	0,79 (0,34-1,86)	0,69 (0,28-1,72)

¹Ajustado por edad. ²Ajustado por edad y consumo de tabaco.

✓ Interacción entre los polimorfismos

En la tabla 36 se muestra la interacción entre los polimorfismos de la mEH y de la CYP1A1. Tal y como se puede observar no se encontraron efectos significativos para ninguna combinación aunque sí se pudo observar que el riesgo estimado fue superior para los sujetos con el alelo salvaje del mEH exón 4 y el genotipo nulo de la GSTM1 (OR 1,45; IC 95% 0,66-3,17) que para otras combinaciones. No se observó

ningún efecto aparente cuando ambos genes presentaban mutaciones (OR 1,07; IC 95% 0,39-2,92).

Tabla 36. Interacción entre los polimorfismos mEH y GSTM1 y el cáncer de orofaringe

Combinación de polimorfismos	Casos	Controles	OR cruda ¹	OR ajustada ²
mEH (Arg/Arg)/GSTM1 presente	31	48	1,00	1,00
mEH (Arg/Arg)/GSTM1 ausente	32	40	1,22 (0,63-2,36)	1,45 (0,66-3,17)
mEH mutado/GSTM1 presente	14	20	1,15 (0,50-2,65)	1,19 (0,43-3,27)
mEH mutado/GSTM1 ausente	15	22	1,18 (0,52-2,66)	1,07 (0,39-2,92).

¹Ajustado por edad. ²Ajustado por edad, consumo de tabaco y alcohol.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Discusión de la hipótesis a estudio

El presente estudio fue planteado debido a la gran incidencia del cáncer de la cavidad oral y de faringe en España en comparación con otros países europeos, situándose Galicia entre las CCAA con mayores tasas de mortalidad. Aunque se reconoce la importancia del tabaco y el alcohol en el desarrollo de estos tumores, los resultados preliminares sugieren que los riesgos asociados a estas sustancias pueden variar significativamente según la zona geográfica, observándose riesgos muy elevados en países como España, Italia y en Latinoamérica. Esto sugiere que existen otros factores adicionales que modulan la aparición de la enfermedad.

Se ha planteado la hipótesis de que los genes codificadores de las enzimas de metabolización pueden ser parcialmente responsables del riesgo excesivo encontrado en nuestra Comunidad Autónoma y de que estos podrían actuar modulando el efecto del alcohol y del tabaco. La razón de estudiar la GSTM1, el CYP1A1 y la epóxido hidrolasa está fundamentada en que son los principales encargados de la metabolización de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, principales sustancias cancerígenas encontradas en el tabaco. También actúan en la transformación de alcohol a acetaldehído. Respecto a la GSTM1 y CYP1A1 muchas investigaciones previas han evaluado la asociación con estos tumores pero los resultados no son concordantes en las distintas poblaciones. Este es el primer estudio llevado a cabo en Galicia que estudia estos genes y su relación con el COF. También es uno de los pocos estudios en investigar la epóxido hidrolasa y evaluar las interacciones entre los tres genes.

5.2. Discusión del método

La presente investigación está basada en un diseño de casos y controles. Aunque actualmente se reconoce que la razón de tasas de incidencia es la mejor medida del riesgo, la Razón de Odds (OR) se reconoce como un buen estimador del riesgo relativo si los casos y los controles son representativos de la población objeto de estudio¹⁹⁵. Sin embargo, los estudios de casos y controles al tratarse de estudios de carácter retrospectivo son más susceptibles de presentar sesgos de selección o información. En el estudio actual, para evitar el sesgo de selección de los casos, se ha intentado identificar todos los casos incidentes de cavidad oral y faringe revisando los resultados anatomopatológicos semanalmente en colaboración con los clínicos. El incluir casos incidentes presenta una serie de ventajas en comparación con los casos prevalentes: a) se disminuye el sesgo de memoria porque el individuo puede recordar mejor la experiencia pasada al ser más reciente, b) la supervivencia no está condicionada por los factores de riesgo estudiados y c) es menos probable que el estatus de enfermedad pueda modificar la exposición a los factores de riesgo¹⁹⁶.

En nuestro estudio los controles son de base hospitalaria. Los controles de base hospitalaria, al no ser seleccionados de forma aleatoria, plantean el problema de que puede que no sean representativos de la población de estudio. Se ha establecido que para que un estudio de casos y controles hospitalario sea válido se tiene que asumir que los controles son representativos de la población de estudio y para esto tienen que cumplirse estos dos supuestos: a) que la probabilidad de captación de los casos y los controles sea la misma y 2) que la exposición sea independiente de la probabilidad de admisión para evitar el sesgo de Berkson¹⁹⁷. En nuestro caso concreto, aunque la población primaria es la del Área Sanitaria de Santiago y la población evaluada es la que acude al Complejo Hospitalario de Santiago, asumimos que la probabilidad de que la muestra no sea representativa es baja ya que menos del 5% de la población

gallega tiene seguros privados. Para minimizar el sesgo de selección relacionado con la exposición se excluyeron pacientes con condiciones orales o faríngeas potencialmente premalignas (displasias, ect) y se excluyeron controles admitidos por patologías relacionadas con el tabaco.

Nuestro estudio no fue emparejado por edad, sexo o estatus socio-económico. En cuanto al sexo, esto no fue necesario ya que el estudio se realizó exclusivamente en hombres. La razón por la cual se decidió excluir a las mujeres del estudio se debe a que en España la tasa de incidencia en mujeres es muy baja (3,89 casos nuevos/100.000 habitantes) y sería necesaria una población muy grande para evaluar el riesgo en este grupo. Respecto a emparejar por otras variables de confusión, son muchos los autores que opinan que seleccionar los controles que tengan los mismos valores de los factores de confusión que los casos no es una estrategia efectiva para eliminar el sesgo de confusión¹⁹⁸. En nuestro estudio, para controlar en parte el sesgo que podría ser ocasionado por la ligera diferencia de edad entre los casos y los controles, así como el sesgo ocasionado por otros potenciales factores de confusión, todos los análisis fueron ajustados por la edad, el nivel de estudios, la ocupación, el tabaco y el alcohol cuando fue posible.

En relación a los polimorfismos genéticos, algunos autores han sugerido que los estudios con controles hospitalarios podrían dar lugar a infraestimaciones del riesgo dada la posibilidad de que los polimorfismos pudiesen estar relacionados con las enfermedades de los controles. En *meta y pooled análisis* previos, incluido el llevado a cabo en este estudio no se observaron diferencias significativas en el riesgo para los estudios de base hospitalaria respecto a los de base poblacional^{199,200}.

La elección de controles de base poblacional en el presente caso se consideró prácticamente inviable en términos económicos y organizativos. La necesidad

de obtener muestras biológicas fue una de las principales razones para descartar este tipo de controles. La utilización de controles poblacionales también hubiese planteado problemas de disponibilidad y podría haber aumentado la probabilidad de la existencia de un sesgo de información. Los controles poblacionales tienden a cooperar menos que los hospitalarios. La realización de la entrevista en el mismo ámbito hospitalario para todos los casos y la mayoría de los controles y por la misma persona minimiza en gran medida el sesgo de información. La entrevista personal fue realizada por la misma persona y esto evita el sesgo del entrevistador. Es de destacar que un pequeño porcentaje de los controles fueron entrevistados en casa y esto podría suponer una pequeña limitación.

La tasa de participación también es otro de los problemas de los estudios de casos y controles, sobre todo si ésta es distinta en el grupo de los casos que en el de los controles. La participación en nuestro estudio fue muy alta (99% de los casos y 97,3% de los controles) y esto también es una potencial garantía de que el sesgo de selección fue mínimo.

En relación a los controles no se puede descartar que, al tratarse de pacientes con enfermedades menos graves que los casos, la notificación de hábitos nocivos como el consumo de alcohol y de tabaco sea inferior y esto podría llevar a una sobreestimación del riesgo. Respecto a los casos también puede ocurrir que éstos cambien sus hábitos como consecuencia de la sintomatología de la enfermedad. Por esta razón, se consideraron como exfumadores a los que habían abandonado el hábito hacía más de 6 meses. Para evitar cualquier interferencia del tratamiento en los casos fueron entrevistados antes de llevar a cabo ninguna intervención.

Una de las principales limitaciones del estudio es el pequeño tamaño de muestra para analizar polimorfismos que son poco frecuentes en la población,

como es el caso del CYP1A1 Ile/Val. El tamaño de muestra también fue insuficiente para identificar interacciones con otros genes y las interacciones con otros factores de riesgo como el alcohol y el tabaco por lo que se sugieren estudios adicionales para investigar este aspecto.

5.3. Discusión de resultados

5.3.1. Tabaco

Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto que el tabaco es un importante factor de riesgo para el cáncer de cavidad oral y faringe en el Área Sanitaria de Santiago de Compostela. La magnitud del riesgo hallado en este estudio de casos y controles es muy alta en comparación con otros estudios de casos y controles que investigan la asociación entre el tabaco y el cáncer de cavidad oral y faringe^{16-18,21-23,28,57,61,201}.

En Galicia se han encontrado igualmente riesgos excesivos para otros cánceres relacionados con el tabaco, como el cáncer de esófago²⁰² y el cáncer de pulmón²⁰³. Aunque en Galicia no se dispone de datos de incidencia para el cáncer de cavidad oral y faringe, los datos de mortalidad sugieren que éstos se encuentran entre los más elevados de España y por lo tanto de Europa. Estos hechos hacen pensar que esta región puede tener diferencias importantes en cuanto al patrón de consumo de tabaco o en cuanto a otros factores de riesgo medio-ambientales o relacionados con el estilo de vida que podrían actuar como modificadores del efecto^{17,204}.

El gran consumo de tabaco negro en esta región podría ser en gran parte responsable de este alto riesgo. En nuestro estudio, el 88% de los casos y el 79% de los controles eran consumidores de tabaco negro. Muchos estudios son consistentes con el hecho de que el riesgo de desarrollar tumores relacionados con el tabaco es mayor para los fumadores de tabaco negro que para los fumadores de tabaco rubio²⁰⁵⁻²⁰⁹. Acorde con esta teoría, se observa que los

estudios llevados a cabo en países en los que el consumo de tabaco negro es muy común (Sur de Europa y América Latina)^{19,21,22,25,26,60,67,206} presentan riesgos mayores para el cáncer de cavidad oral y faringe que aquellos realizados en países en donde el tabaco mayoritario es el rubio (Norteamérica y Oeste de Europa)^{29,81}.

En la presente investigación los fumadores de tabaco negro presentaron el doble de riesgo que los fumadores de tabaco rubio. Mientras que los fumadores de tabaco negro mostraron una importante relación dosis respuesta para todas las variables de consumo, los fumadores de tabaco rubio sólo presentaron riesgos significativos para altos consumos acumulados a lo largo de la vida. Aunque estos datos no son mostrados en las tablas al considerar que los datos pueden estar sesgados por existir sólo 11 casos fumadores de tabaco rubio, son concordantes con los resultados publicados por otros estudios. *Castellsagué et al*¹⁶ en el mayor estudio de casos y controles llevado a cabo en España observaron que los fumadores de tabaco negro presentaron riesgos muy altos a niveles bajos de consumo (fumadores actuales de 1-20 cigarrillos/día: OR=17,9 IC95% 6,35-50,43) mientras que los fumadores de tabaco rubio mostraron riesgos no significativos a dosis bajas (fumadores actuales de 21-30 cigarrillos/día; OR=1,83 IC95% 0,47-7,18). En EEUU, en donde predomina el tabaco rubio, un estudio de gran tamaño que incluyó a 1.065 casos de la cavidad oral y 1.182 controles²⁹ mostró igualmente que la asociación entre el tabaco y el cáncer de la cavidad oral sólo era significativa para aquellos sujetos que consumían más de 20 cig/día o aquellos que fumaron durante más de 40 años (OR blancos = 3,3; OR negros = 2,9). *Bundgaard et al*²⁷ mostraron patrones similares en Dinamarca.

El mayor riesgo del tabaco negro en comparación con el blanco podría ser en parte explicado por las concentraciones más altas de sustancias carcinogénicas como la N-nitrosamina y 2-naftilamina presentes en el humo del tabaco

negro²¹⁰. Algunos estudios también han encontrado que los niveles de aductos de 4-aminobifenilo y de otras aminas aromáticas son superiores en los fumadores de tabaco negro²¹¹. Teniendo en cuenta que en la presente investigación casi el 100% de las marcas de tabaco negro son de origen español no se puede descartar que otras variables como la composición del papel, el tipo de aditivos, el tipo de filtro o los patrones de inhalación puedan también contribuir al alto riesgo observado²¹².

Cuando se investigó el riesgo en los fumadores actuales se encontró que era muy alto, con independencia de la cantidad fumada o del tiempo de duración del hábito. Este resultado no es compartido por muchos de los estudios previos, en los cuales encontraron una clara relación dosis respuesta para ambas variables ^{18,23-25}. Aunque desconocemos en gran medida la razón de estos hallazgos, mantenemos la hipótesis de que estos resultados pueden atribuirse parcialmente al muy elevado consumo de alcohol en nuestra región, especialmente en nuestra Área Sanitaria, en comparación a otras regiones²¹³. De hecho, en el presente estudio, alrededor del 70% de los casos de cáncer eran bebedores excesivos o de alto riesgo.

Aunque se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual el alcohol ejerce su acción carcinogénica, se reconoce que el consumo crónico de alcohol puede interferir con la absorción o biodisponibilidad de los nutrientes, aumentar la penetración de carcinógenos a nivel de la mucosa oral, disminuir la función inmune, causar genotoxicidad, aumentar la activación de agentes carcinogénicos, interferir con la reparación de DNA e inhibir la detoxificación de sustancias carcinogénicas⁴⁵.

Dado que los fumadores están expuestos a un gran número de carcinógenos y pro-carcinógenos que requieren de activación y detoxificación por los enzimas de metabolización (citocromo P450, glutatión S-transferasa, N-

acetiltransferasa,etc)⁸⁴ es lógico pensar que una alteración de los procesos de peroxidación y detoxificación como resultado del consumo excesivo de alcohol, agravado por la coexistencia de deficiencias nutricionales, podría aumentar enormemente el riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe, aún a dosis bajas de consumo.

Respecto a los exfumadores, en el presente estudio sólo se encontraron riesgos significativos después de una gran exposición acumulada al tabaco y el riesgo disminuyó inmediatamente después de dejar el hábito, aunque las reducciones no fueron significativas hasta los 10 años del cese tabáquico. En estudios previos no hay consistencia en cuanto al tiempo que debe pasar hasta que el riesgo en los exfumadores vuelva a alcanzar los niveles de los nunca fumadores, oscilando los valores entre inmediatamente después^{26,29} hasta después de 20 años de abandonar el hábito tabáquico^{16,28}. Estas diferencias sugieren una vez más que la asociación entre el tabaco y el cáncer de cavidad oral y faringe es muy compleja y que pueden existir otros factores adicionales que intervienen en la acumulación y reparación de alteraciones genéticas que son responsables de desencadenar el desarrollo del cáncer.

Un resultado de potencial interés es el mayor riesgo encontrado en los sujetos que comenzaron a fumar antes de los 15 años en comparación con los sujetos que empezaron a edades más tardías. Otros estudios apoyan esta observación^{22,25,36} que puede ser explicada por el hecho de que el tabaco puede provocar cambios fisiológicos entre los fumadores adolescentes, llevando consigo un aumento en la persistencia de los aductos de DNA²⁰³.

Es importante citar que el poder del presente estudio fue bajo al incluirse solo dos casos no fumadores y esto limita en gran medida la extrapolación de las estimaciones de riesgo.

5.3.2. Alcohol

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto, al igual que lo hicieron otros estudios previos, que el consumo excesivo de alcohol es un importante factor de riesgo para el cáncer de cavidad oral y faringe. Se observó una clara relación dosis-respuesta siendo el riesgo significativo sólo para los consumidores excesivos o de alto riesgo.

El análisis de los diferentes tipos de bebidas alcohólicas encontró que el riesgo fue significativo para los licores fuertes y el vino pero no para la cerveza. Analizando el riesgo en función del nivel de consumo parece observarse que a igual nivel de consumo, el riesgo es mayor para las bebidas destiladas que para el vino y la cerveza. *Castellsagué et al*¹⁶ en el mayor estudio de casos y controles llevado a cabo en nuestro país mostraron resultados similares. *De Stefani et al*²⁴ observaron la misma tendencia en el estudio llevado a cabo recientemente en Uruguay, pero otros resultados son discrepantes. En un gran número de estudios se observa que, a igual nivel de consumo, el riesgo es mayor para la cerveza y los licores fuertes que para el vino^{16,25,33,47,49,214}. Aunque se desconoce la principal razón de estas diferencias parece estar aceptado que el tipo de bebida que presenta el mayor riesgo es la que se consume con más frecuencia en la población objeto de estudio⁴⁵ sugiriendo que el consumo preferente de una bebida alcohólica podría ir ligado a ciertas características de la población o a ciertos estilos de vida y hábitos que claramente influyen en el riesgo de desarrollar cáncer de cavidad oral y faringe¹⁸⁰. En el caso de nuestra población se cumple que la bebida de mayor consumo es el vino. Sólo el 20,4% de los controles y el 4,3% de los casos manifestaron no consumir vino o sólo consumirlo de forma esporádica. En el caso de la cerveza se encontró que el 59,6% de los controles y el 51,1% de los casos eran no consumidores, respectivamente.

Cuando se determinó el riesgo en función del consumo alcohólico se evidenció que los riesgos eran significativos únicamente para los bebedores excesivos o de alto riesgo (> 9 UBE). Esta relación es lógica y coincide con la conclusión de una de las últimas revisiones llevadas a cabo para investigar la relación entre el alcohol y el cáncer⁴⁵. Aunque se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual el alcohol ejerce su acción carcinogénica se reconoce, tal y como ya se ha expuesto con anterioridad, que el consumo crónico de alcohol puede ser responsable de muchas alteraciones desencadenantes del proceso cancerígeno⁴⁵.

Ajustando por el consumo total de alcohol se encontró que el riesgo era significativo sólo para el vino rosado y los licores fuertes. *Rothman et al*²¹⁵ habían propuesto en 1989 que el efecto de los licores oscuros sobre el cáncer de hipofaringe era muy superior al de los licores claros ($OR_{\text{licores oscuros}}=4,4$ IC95% 2,9-6,8; $OR_{\text{licores claros}}=1,3$ IC95% 0,8-2,1) pero esta asociación no fue avalada con estudios posteriores. El ajuste por alcohol total permite realmente evaluar el efecto cancerígeno de los componentes no alcohólicos de alcohol. En el caso de los licores oscuros, parte de este riesgo podría ser atribuible a las mayores concentraciones de compuestos como alcohol, ésteres y aldehídos²¹⁶. En el caso de los vinos, se desconoce en gran medida la razón por la cual el vino rosado presenta mayor riesgo que el tinto. Sería necesario investigar más a fondo la composición de los vinos rosados consumidos en nuestra comunidad para esclarecer realmente la razón de estos hallazgos.

En la presente investigación no se pudo investigar el efecto independiente del alcohol dado que sólo existían 2 sujetos no fumadores en el grupo de los casos. En el *meta-análisis* de *Hashibe et al*²⁰⁰ se establecía que entre los no fumadores, el consumo de alcohol se asociaba con el cáncer de cabeza y cuello únicamente a consumos elevados (OR para consumos ≥ 3 consumiciones/día=2,04 IC95% 1,29-3,21) pero en nuestro estudio no se pudo confirmar dicha asociación.

Cuando se investigó la interacción entre el tabaco y el alcohol se observó un importante efecto sinérgico. Mientras que en el grupo de los bebedores relevantes se encontró una importante relación dosis-respuesta para todas las variables de tabaco analizadas, el riesgo no fue significativo para ninguna de las categorías evaluadas en el grupo de los nunca/bebedores leves. Aunque tales hallazgos podrían ser consistentes con otra literatura disponible^{61,200} el pequeño número de sujetos en la categoría de no/bebedores ligeros (n=4) disminuye en gran medida la precisión de las estimaciones para este subgrupo. En un *pooled análisis* reciente²⁰⁰ llevado a cabo para valorar el grado en el que el consumo de cigarrillos estaba asociado a un aumento en el riesgo de padecer cáncer de cabeza y cuello en nunca fumadores, se encontraron riesgos significativos en Europa (OR=3,45 IC95% 1,9-5,89) y Sudamérica (OR=3,58 IC95% 1,24-10,3) pero no en Norteamérica (OR=1,2 IC95% 0,86-1,67). Se dieron como posibles razones de la variabilidad los diferentes patrones de consumo y contenido de los cigarrillos, pero también se citaron como posibles causas de variabilidad la baja precisión de los estudios llevados a cabo en EEUU, ya que al igual que en nuestro caso, el número de fumadores no bebedores es muy bajo.

5.3.3. Polimorfismos genéticos

Aunque existen varios estudios previos que investigaron la asociación entre los polimorfismos CYP1A1 Ile/Val, mEH exón 4, GSTM1 (alelo nulo) y el cáncer de cavidad oral y faringe son pocos los que investigaron la modificación del riesgo asociada al consumo de alcohol y tabaco y, que conozcamos, éste es el primero en analizar las interacciones entre estos polimorfismos.

Los resultados de nuestro estudio apoyan la teoría de que no existe una asociación significativa para ninguno de los polimorfismos evaluados aunque los datos sugieren que los polimorfismos de la mEH (exón 4) y de la GSTM1 podrían modificar el riesgo relacionado con el consumo de tabaco y alcohol.

Se observó que el polimorfismo en el exón 4 de la mEH (139 Arg→His) estaba mutado en un porcentaje similar de casos y de controles y la frecuencia de polimorfismos mutados hallada en nuestra población (32,3% en controles versus 31,5% en casos) es consistente con los resultados de muchos estudios previos que investigaron la asociación entre estos polimorfismos y los tumores de cabeza y cuello^{153,154,217,218}. En estos estudios, los alelos mutados estaban presentes entre un 29,7% y un 39,8% de los controles y de un 28,9% a un 39% de los sujetos con cáncer. En el estudio actual las estimaciones de riesgo no fueron significativas para ninguna de las categorías de alcohol y tabaco investigadas, pero los resultados parecen ser concordantes con los de *Wenghoefer et al*¹⁵⁴, poniendo de manifiesto que el alelo heterocigoto (His/Arg) de la mEH podría actuar como modulador del riesgo de cáncer de cabeza y cuello en los individuos fumadores (OR=0,57 IC 95% 0,34-0,95). En nuestro estudio observamos que en grandes fumadores el riesgo fue menor en los sujetos con el alelo heterocigoto (OR=0,68 IC95% 0,25-1,86), pero no se alcanzó la significación estadística, probablemente debido al pequeño tamaño muestral.

Enzimáticamente, la mEH metaboliza un gran número de óxidos de alquenos, arenos y epóxidos del grupo de los hidrocarburos aromáticos y aminas heterocíclicas a trans-dihidrodiol¹³⁸. Aunque esta reacción se considera frecuentemente una reacción de detoxificación, dado que la mayoría de los metabolitos resultantes son menos reactivos y pueden ser fácilmente excretados, en ciertas circunstancias los metabolitos trans-dihidrodiol pueden ser activados con posterioridad por los citocromos P450 y originar intermediarios altamente carcinogénicos con capacidad para unirse de forma covalente al DNA. Este es el caso del 7,8-diol-9,10-epóxido, que es mucho más carcinogénico que los restantes benzo[a]pireno diol epóxidos formados¹³⁹. Mientras que los resultados de algunos estudios, incluyendo el actual, son compatibles con el hecho de que una actividad alta o intermedia puede ejercer un efecto protector en los sujetos expuestos a los productos del humo de

tabaco²¹⁹⁻²²¹, otros llevados a cabo sobre diversos tumores del tracto aerodigestivo, no encontraron la misma asociación o, al contrario, hallaron un riesgo significativamente mayor para los fumadores con alelos mutados a nivel del exón 4 de la mEH^{192,217}. Se desconocen en gran medida las razones de estas discrepancias. Se podría argumentar que no se puede establecer la actividad basándonos únicamente en las mutaciones del exón 4 y que sería necesario tener también en cuenta las mutaciones a nivel del exón 3 de la mEH. Diversos autores han hecho predicciones de la actividad teniendo en cuenta las mutaciones de ambos alelos, pero hemos encontrado que las clasificaciones en cuanto a actividad (baja, intermedia y alta) no son concordantes^{153,154,218,222,223}. Un estudio llevado a cabo por el grupo de *Wenghoefer et al*¹⁵⁴ mostró una asociación significativa con el cáncer de cabeza y cuello cuando analizó los genotipos de forma aislada pero no para la combinación de los genotipos, generando importantes dudas sobre la categorización de los enzimas. Dada la doble función de la epóxido hidrolasa en la bioactivación y detoxificación de sustancias carcinogénicas, es muy probable que existan otros polimorfismos que pueden influir en la formación de metabolitos carcinogénicos y que existan diversas interacciones gen-gen. En esta investigación no se encontró ninguna interacción entre los polimorfismos de la GSTM1 y los polimorfismos en el exón 4 de la mEH.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la frecuencia del alelo nulo de la GSTM1 presenta grandes variaciones geográficas²⁰⁰. Mientras que en Europa y EEUU las frecuencias documentadas en las poblaciones de controles varían entre el 49% y un 55.6%^{156-161,224,225}, en los países de Asia y Sudamérica este alelo está presente en menos del 48,7% de los sujetos del grupo control^{155,172-175,226}. En el actual estudio, el 47,7% de los sujetos en el grupo control presentaron el polimorfismo nulo de la GSTM1. Este valor es ligeramente inferior a los valores establecidos para otras poblaciones caucásicas y podría ser, en parte, debido al hecho de que sólo se incluyeron hombres en el estudio. Diversos estudios han

demostrado que las frecuencias de un gran número de polimorfismos son dependientes del sexo^{169,183,218,227}.

En el presente estudio de casos y controles, al igual que en otros estudios previos llevados a cabo en poblaciones caucásicas^{156-161,224} no se encontró una asociación significativa entre el genotipo nulo de la GSTM1 y el cáncer de cavidad oral y faringe. Los resultados de los *meta* y *pooled-análisis* llevados a cabo como parte del presente trabajo concuerdan con esta falta de asociación en poblaciones caucásicas, pero sí mostraron riesgos significativos para poblaciones asiáticas y poblaciones africanas o afroamericanas. Estas diferencias en el riesgo probablemente son debidas a los diferentes estilos de vida, factores de riesgo medio-ambientales o a las variaciones en la actividad de otros polimorfismos que frecuentemente también muestran diferencias importantes en los diferentes grupos étnicos^{169,183,218,227}. La distinta forma de consumir el tabaco podría contribuir en gran medida a las diferencias observadas. Mientras que en Europa el tabaco se suele fumar en forma de cigarrillos, en los países asiáticos y africanos se suele mascar en forma de *betel* o *bidis*²²⁸. Diversos informes han demostrado que mientras que la detoxificación de los hidrocarburos aromáticos, exclusivos del tabaco fumado, se lleva a cabo mediante la GSTM1 y el CYP1A1, la detoxificación de las N-Nitrosaminas derivadas de los ingredientes del betel se lleva a cabo fundamentalmente por la UDP glucuronosiltransferasa, el CYP2E1 y el CYP2A6^{159,229}.

No se evidenció una interacción significativa entre el genotipo nulo de la GSTM1 y el tabaco, aunque sí se observó que el riesgo era ligeramente superior en los grandes fumadores en comparación con los no fumadores o fumadores leves/moderados. Para verificar que estas diferencias no eran debidas al hecho de que los no fumadores fueron analizados conjuntamente con los fumadores leves/moderados, se llevó a cabo otro análisis dejando fuera a estos sujetos y se observó que las variaciones en las ORs fueron mínimas. Estos datos no se han

mostrado debido a esa no existencia de diferencias. Se ha postulado en varias ocasiones que la falta de actividad enzimática de la GSTM1 aumenta la susceptibilidad del cáncer en grandes fumadores al disminuir la capacidad de estas enzimas para detoxificar intermediarios reactivos derivados de las sustancias carcinogénicas presentes en el humo del tabaco, como por ejemplo el benzo[a]pireno-7,8-diol epóxido¹¹⁵, pero los resultados de los estudios llevados a cabo con anterioridad tampoco son consistentes en cuanto a esta teoría^{160,170,173,185}. Los resultados del presente *pooled-análisis* ponen de manifiesto que el riesgo es mucho mayor en fumadores actuales que en exfumadores y no significativo en no fumadores. En el presente estudio de casos y controles no fue posible valorar correctamente la relación entre la exposición al tabaco y los polimorfismos genéticos, debido a que entre los casos sólo existían dos individuos no fumadores y seis sujetos que llevaban fumando menos de 20 años, obligándonos a crear una categoría de no fumadores a fumadores ligeros/moderados. Se necesitan otros estudios de gran tamaño para investigar esta asociación, teniendo en cuenta las importantes variaciones geográficas que pueden existir, sobretodo respecto al consumo de tabaco.

Nuestro estudio sugiere que el efecto de la ausencia del gen de la GSTM1 es más notable en el grupo de los no *bebedores/bebedores ligeros* pero esta asociación no alcanzó la significación estadística. Esta relación se mantuvo aún retirando a los no bebedores del análisis y podría ser explicada por el hecho de que la GSTM1, en combinación con la alcohol dehidrogenasa, está implicada en la oxidación del etanol a acetaldehído¹⁵⁷. Aunque se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual el alcohol ejerce el efecto carcinogénico, se ha sugerido que el acetaldehído podría ser responsable de algunos cambios irreversibles en el DNA que podrían desencadenar el proceso cancerígeno²³⁰. Los grandes bebedores con el alelo nulo serían incapaces de convertir el etanol a acetaldehído y esto les conferiría un efecto protector para el cáncer de cavidad oral y faringe. Otra posible explicación sería que el etanol aumenta la

permeabilidad de los agentes carcinogénicos presentes en el tabaco, tales como la nitrosonornicotina, a través de la membrana oral cuando se encuentra a concentraciones bajas. A concentraciones superiores al 50% no se evidencia tal aumento en la permeabilidad, probablemente debido al efecto de fijación que tiene el alcohol sobre la mucosa²³¹. Es necesario resaltar que en la población objeto de estudio el consumo de alcohol fue muy elevado, resultado que concuerda con otros estudios llevados a cabo en esta Comunidad Autónoma²³² pero que impide en gran medida el análisis de esta interacción.

A pesar de que se mantiene la hipótesis de que la presencia de mutaciones a nivel del CYP1A1 podría ocasionar un aumento de la actividad inductora de la enzima, aumentando a su vez la activación de ciertas sustancias carcinogénicas, los resultados de diversos estudios llevados a cabo en varios tumores relacionados con el tabaco, igualmente muestran gran heterogeneidad^{199,200,227,233,234}. Se ha sugerido como posible explicación el hecho de que el daño en el DNA es consecuencia de la interacción entre los polimorfismos de la CYP1A1 y otros polimorfismos que pueden afectar a los niveles de transcripción, como es el caso de los genes promotores de tumores, el receptor Ah o los genes metabólicos como la GSTM1^{106,133}. En este estudio sólo cuatro sujetos presentaron mutaciones a nivel de la Ile/Val. Aunque estas frecuencias son concordantes con algunas halladas en otros estudios de poblaciones caucásicas¹⁶¹, limitaron el poder llegar a conclusiones definitivas respecto a este polimorfismo. Los intervalos de confianza fueron muy amplios y la distribución de este polimorfismo fue muy similar entre los casos y controles. En el meta-análisis llevado a cabo en el presente trabajo no se pudo obtener una OR debido a la gran heterogeneidad de los estudios pero el *pooled* análisis mostró una falta de asociación entre éste polimorfismo y el cáncer de cavidad oral y faringe. El riesgo fue mayor en los sujetos con los polimorfismos CYP1A1 mutados/GSTM1 nulo. Esto es lógico dado que se asume que estos sujetos tendrán mayores niveles de aductos de benzo[a]pireno diolepóxido^{133,144,235}.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El tabaco se muestra como un factor de riesgo muy importante para el cáncer de cavidad oral y faringe en el Área Sanitaria de Santiago de Compostela.

- El tabaco negro presenta un riesgo mayor que el tabaco rubio.
- El riesgo del tabaco aumenta de forma proporcional a la cantidad acumulada a lo largo de la vida.
- El riesgo del cáncer de la cavidad y faringe desciende inmediatamente después de dejar el hábito.
- El riesgo es mayor para los que empiezan a fumar antes de los 15 años que para los que empiezan con posterioridad.

2. El alcohol aumenta el riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe.

- El aumento en el riesgo es proporcional a la cantidad consumida de alcohol.
- Los licores oscuros y el vino rosado parecen entrañar un mayor riesgo que el resto de bebidas alcohólicas.

3. Existe una fuerte interacción entre el consumo de alcohol y tabaco en la aparición de la enfermedad.

4. La ausencia del gen de la GSTM1 no se relaciona con el riesgo de desarrollar cáncer de cavidad oral y faringe en nuestra población.

5. En grandes fumadores el alelo nulo de la GSTM1 parece aumentar el riesgo de padecer cáncer de cavidad oral y faringe.

6. Los polimorfismos CYP1A1*2C (Ile/Val o Ile⁴⁶²Val) no parecen influir en el riesgo de desarrollar cáncer de cavidad oral y faringe.

7. Existen indicios de que el alelo heterocigoto (His/Arg) de la mEH podría actuar como modulador del riesgo de cáncer de cavidad oral y faringe en grandes fumadores.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. International Statistical Classification of Diseases and Related Problems. 10th Revision. Version 2007. World Health Organization [monografía en internet]. [consultada el 3 septiembre 2008]. Disponible en: <http://www.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>
2. Ferlay J, Bray F, Pisani P and Parkin DM. GLOBOCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide [base de datos en Internet]. IARC Cancerbase no. 5, version 2.0. Lyon: IARCPress; 2004, [consultada el 4 septiembre 2008]. Disponible en: <http://www.iarc.fr/>
3. EUCAN: Cancer Incidence, mortality and prevalence in the European Union 1998 [base de datos en Internet] IARC Cancerbase no. 4, version 5.0. Lyon: IARC Press; 1999. [consultada el 4 septiembre 2008]. Disponible en: <http://www-dep.iarc.fr/eucan/eucan.htm>
4. La situación del cáncer en España [monografía en Internet]. Area de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo; 2005. [consultada 4 septiembre 2008]. Disponible en: http://www.isciii.es/htdocs/centros/epidemiologia/epi_cancer.jsp
5. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M and Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals Oncol.* 2007; 18: 581-92.
6. Cáncer en cifras. Mortalidad por Cáncer y otras causas en España [gráficos y tablas en Internet]. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. [consultada 7 agosto 2008]. Disponible en: <http://193.146.50.130/morta/grafs.php>
7. Mortalidad. España y Comunidades Autónomas [monografía en Internet]. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. [consultada el 6 agosto 2008]. Disponible en: <http://www.isciii.es/htdocs/centros/epidemiologia/mortalidad.jsp>
8. Berrino F, Capocaccia R, Coleman MP, Estève J, Gatta G, Hakulinen T, *et al.* Survival of cancer patients in Europe: EURO CARE-3 Study. *Annals Oncol.* 2003; 14 (Suppl. 5): v61-118

9. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005 [monografía en Internet]. National Cancer Institute, Bethesda, MD. [consultada el 7 agosto 2008]. Disponible en: <http://seer.cancer.gov/csr/1975-2005>
10. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2007 [monografía en internet]. Atlanta: American Cancer Society; 2007. [consultada 2 octubre 2008] Disponible en: <http://www.google.es/search?hl=es&q=Cancer+Facts+%26+Figures+2007&btnG=Buscar+con+Google&meta=>
11. WHO report on the global tobacco epidemic [monografía en Internet]. [consultada el 9 septiembre 2008]. Disponible en: http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_prevalence_data_2008.pdf
12. Encuesta Domiciliaria sobre alcohol y drogas en España 2007/2008 [monografía en Internet]. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre drogas. Secretaría General de Sanidad. Ministerio de Sanidad y Consumo. [consultada el 1 octubre 2008]. Disponible en: <http://estaticos.elmundo.es/documentos/2008/11/04/encuesta.pdf>
13. Encuesta nacional de salud [monografía en Internet]. Ministerio de Sanidad y Consumo.; 2006. [consultada el 1 octubre 2008]. Disponible en: <http://www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=/t15/p419&file=inebase&L=0>
14. El consumo de drogas en Galicia VIII [monografía en Internet]. Servizo Galego de Saúde, Galicia. Consellería de Sanidade. Xunta de Galicia; 2007. [consultada el 19 noviembre 2008]. Disponible en: <http://www.sergas.es/>
15. Winder EL. Etiological aspects of squamous cell cancers of the head and neck. JAMA. 1971; 215: 452-62.
16. Castellsague X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, *et al.* The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. Int J Cancer. 2004; 108: 741-49.
17. Sánchez MJ, Martínez C, Nieto A, Castellsague X, Quintana MJ, Bosch FX, *et al.* Oral and pharyngeal cancer in Spain: influence of dietary patterns. Eur J Cancer. 2003; 12 (1): 49-56.
18. Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, González-Navarro A, Cero-Lapiedra R, González-Hernández MJ and Domínguez-Rojas V. Risk of oral

cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Spain. *Oral Oncol.* 2000; 36: 170-4.

19. Bosetti C, Gallus S, Peto R, Talamini R, Tavani A, Franceschi S, *et al.* Tobacco smoking, smoking cessation, and cumulative risk of upper aerodigestive tract cancers. *Am J Epidemiol.* 2008; 167: 468-73.

20. Rodriguez T, Altieri A, Chatenoud L, Gallus S, Bosetti C, Negri E, *et al.* Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol.* 2004; 40: 207-13.

21. Talamini R, Vaccarella S, Barbone F, Tavani A, La Vecchia C, Herrero R, *et al.* Oral hygiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer. *Br J Cancer.* 2000; 82: 1238-42.

22. Franceschi S, Talamini R and Barra S. Smoking and drinking in relation to cancers of oral cavity, pharynx, larynx and esophagus in Northern Italy. *Cancer Res.* 1990; 50 (6502-07):

23. Franceschi S, Favero A, Conti E, Talamini R, Volpe R, Negri E, *et al.* Food groups, oil and butter and cancer of the oral cavity and pharynx. *Br J Cancer.* 1999; 80 (3/4): 614-20.

24. De Stefani E, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, Acosta G, Ferro G, *et al.* The effect of smoking and drinking in oral and pharyngeal cancers: a case-control study in Uruguay. *Cancer Letters.* 2007; 246: 282-9.

25. Garrote LF, Herrero S, Ortiz Reyes RM, Vaccarella S, Lence Anta J, Ferbeye L, *et al.* Risk factors for cancer of oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *Br J Cancer.* 2001; 85 (1): 46-54.

26. Franco EL, Kowalski LP and Oliveira BV. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case control study. *Int J Cancer.* 1989; 43: 992-1000.

27. Bundgaard T, Wildt J, Frydenberg M, Elbrond O and Nielsen JE. Case control study of squamous cell cancer of the oral cavity in Denmark. *Cancer Causes Control.* 1995; 6: 57-67.

28. Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biorlund A, *et al.* Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 1998; 82: 1367-75.

29. Day GL, Blot WJ, Austin DF, Bernstein L, Greenberg RS, Preston-Martin S, *et al.* Racial differences in risk in oral and pharyngeal cancer: alcohol, tobacco and other determinants. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85: 465-73.
30. Marshall JR, Graham JR and Haughley BP. Smoking, alcohol, dentition and diet in the epidemiology of cancer. *Oral Oncol Eur J Cancer.* 1992; 28B: 9-15.
31. Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Newel WJ and Warnakulasuriya S. An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case control study. *Oral Oncol.* 2004; 40: 304-13.
32. Muwonge R, Ramadas K, Sankila R, Thara S, Thomas G, Vinoda J, *et al.* Role of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking in the risk of oral cancer in Trivandrum, India: a nested case-control design using incident cancer cases. *Oral Oncol.* 2008; 44: 446-54.
33. Vlajinac HD, Marinkovic JM, Sipetic SB, Andrejic DM, Adanja BJ and Stosic-Divjak SL. Case-control study of oropharyngeal cancer. *Cancer Detect Prev.* 2006; 30: 152-7.
34. Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V, Mathew V, Shanta V, Varghese C, *et al.* Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in indian men. *Int J Cancer.* 2003; 105: 681-6.
35. Bosetti C, Negri E, Franceschi S, Levi F, Tomei F and La Vecchia C. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in women: a study from Italy and Switzerland. *BJC.* 2000; 82: 204-7.
36. Talezaki T, Hirose K, Inoue M, Hamajima N, Kuroishi K, Nakamura S, *et al.* Tobacco, alcohol and dietary factors associated with the risk of oral cancer among japanese. *Jpn J Cancer Res.* 1996; 87 (555-62):
37. Rao DN, Ganesh B, Rao RS and Desai PB. Risk assessment of tobacco, alcohol and diet in oral cancer. A case control study. *Int J Cancer.* 1994; 58: 469-73.
38. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. 2004; 83.

39. Report on carcinogens, eleventh edition [monografía en Internet]. US Department of Health & Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program. [consultada el 22 agosto 2008]. Disponible en: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/toc11.html>
40. Andersen PE and Baumberg B. Alcohol in Europe. A public health perspective [monografía en Internet]. A report for the European Commission. London Institute of Alcohol Sciences: 2006. [consultada el 9 de Diciembre 2008]. Disponible en: http://ec.europa.eu/health-eu/news_alcoholineurope_en.htm.
41. Encuesta Domiciliaria sobre alcohol y drogas en España, 2005-2006 [monografía en Internet]. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre drogas. Secretaría General de Sanidad. Ministerio de Sanidad y Consumo, [fuente electrónica]. [consultada el 9 Diciembre 2008]. Disponible en: http://ocw.usc.es/export/sites/default/gl/servizos/ceta/opencourseware/Lic_Medicina/Drogodependencias/material/Textos/Encuesta_Domiciliaria_sobre_Alcohol_y_Drogas_2005-2006.pdf
42. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C and Corrao G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer*. 2001a; 85: 1700-5.
43. Zeka A, Gore R and Kriebel D. Effects of alcohol and tobacco on aerodigestive cancer risks: A meta-regression analysis. *Cancer Causes Control*. 2003; 14: 897-906.
44. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, *et al*. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst*. 2007; 99: 777-89.
45. Lewis S, Campbell S, Jr., Proudfoot E, Weston A, Cotter T and Bishop JF. Alcohol as a cause of cancer. Sydney, Cancer Institute NSW. May 2008.:
46. dal Maso L, La Vecchia C, Polesel J, Talamini R, Levi F, Conti E, *et al*. Alcohol drinking outside meals and cancers of the upper aero-digestive tract. *Int J Cancer*. 2002; 102: 435-7.
47. Altieri A, Bosetti C, Gallus S, Franceschi S, Dal Maso L, Talamini R, *et al*. Wine, beer and spirits and risks of oral and pharyngeal cancer: a case-control study from Italy and Switzerland. *Oral Oncol*. 2004; 40: 904-9.

48. Schwartz SM, Doody DR, Fitzgibbons ED, Sherianne R, Porter PL and Chen C. Oral squamous cell cancer risk in relation to alcohol consumption and alcohol dehydrogenase-3 genotypes. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2001; 10: 1137-44.
49. Schlecht NF, Pintos J, Kowalski LP and Franco EL. Effect of type of alcoholic beverage on the risks of upper aerodigestive tract cancers in Brazil. *Cancer Causes Control.* 2001; 12: 579-87.
50. Boffetta P and Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* 2006; 7: 149-56.
51. Stewart BW and Kleihues P. International Agency for Research on Cancer. *World Cancer Report.* Lyon: IARC press. 2003:
52. De Stefani E, Oreggia F, Ronco A, Fierro L and Rivero S. Salted meat consumption as a risk factor for cancer of the oral cavity and pharynx: a case control study from Uruguay. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 1994; 3 (381-85):
53. Marchioni DML, Fisberg RM, de Góis Filho JF, Kowalski LP, de Carvalho MB, Abrahao M, *et al.* Dietary patterns and risk of oral cancer: a case-control study in Sao Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pública.* 2007; 41: 19-26.
54. Takezaki T, Hirose K, Inoue M, Hamajima N, Kuroishi T, Nakamura S, *et al.* Tobacco, alcohol and dietary factors associated with the risk of oral cancer among Japanese. *Jpn J Cancer Res.* 1996; 87: 555-62.
55. Levi F, Pasche C, La Vecchia C, Lucchini F, Franceschi S and Monnier P. Food groups and risk of oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer.* 1998; 77: 705-9.
56. Tavani A, Gallus S, La Vecchia C, Talamini R, Barnone F, Herrero R, *et al.* Diet and risk of oral and pharyngeal cancer. An Italian case-control study. *Eur J Cancer Prev.* 2001; 10: 191-5.
57. Lissowska J, Pilarska A, Pilarski P, Samolczyk-Wanyura D, Piekarczyk J, Bardin-Mikolajczak A, *et al.* Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev.* 2003; 12: 25-33.
58. Pavia M, Pileggi C, Nobile CGA and Angelillo IF. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83: 1126-34.

59. McLaughlin JK, Gridley G and Block G. Dietary factors in oral and pharyngeal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1988; 80: 1237-43.
60. Bosetti C, Gallus S, Trichopoulou A, Talamini R, Franceschi S, Negri E, *et al.* Influence of the Mediterranean diet on the risk of cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2003; 12: 1091-4.
61. Macfarlane GF, Zheng T, Marshall JR, Boffetta P, Niu S, Brasure J, *et al.* Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Oral Oncol, Eur J Cancer.* 1995; 31B: 181-7.
62. Tatiana N and Jose L. Fat food habitual intake and risk of oral cancer. *Oral Oncol.* 2004; 40: 925-31.
63. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G and Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol.* 1997; 33: 302-12.
64. Zheng T, Boyle P, Willet WC, Huanfang H, Dan J, Evstifeeva TV, *et al.* A case control study of oral cancer in Beijing, people's republic of China. Association with nutrient intakes, foods and food groups. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1993; 29B: 45-55.
65. Negri E, Franceschi S, Bosetti C, Levi F, Conti E, Parpinel M, *et al.* Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer.* 2000; 86: 122-7.
66. De Stefani E, Ronco A, Mendilaharsu M and Deneo-Pellegrini H. Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract-II. *Nutrients. Oral Oncol.* 1999; 35 (1): 22-6.
67. Negri E, La Vecchia C, Franceschi S and Tavani A. Attributable risk for oral cancer in Northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 1993; 2: 189-93.
68. Winn DM, Diehl SR, Brown LM, Harty LC, Bravo-Otero E, Fraumeni JF, *et al.* Mouthwash in the etiology of oral cancer in Puerto Rico. *Cancer Causes Control.* 2001; 12 (5): 419-29.
69. Merletti F, Boffetta P, Ferro p, Pisani P and Terracini B. Occupation and cancer of the oral cavity or oropharynx in Turin, Italy. *Scand J Work Environ Health.* 1991; 17: 248-54.

70. Pukkala E, Soderholm A-L and Lindqvist C. Cancers of the lip and oropharynx in different social and occupational groups in Finland. *Eur J Cancer*. 1994; 3: 209-15.
71. Skov T, Weiner J, Pukkala E, Malker H, Andersen A and Lynge E. Risk for cancer of the pharynx and oral cavity among male painters in the Nordic countries. *Arch Environ Health*. 1993; 48 (3): 176-80.
72. Pearce NE and Howard JK. Occupation, social class and male cancer mortality in New Zealand, 1974-1978. *Int J Epidemiology*. 1986; 15: 456-62.
73. Olsen JH and Jensen OM. Occupation and risk of cancer in Denmark: an analysis of 93810 cancer cases, 1970-1979. *Scand J Work Environ Health*. 1987; 13 (Suppl 1): 7-91.
74. Schildt E-B, Eriksson M, Lennart H and Magnuson A. Occupational exposures as risk factors for oral cancer evaluated in a Swedish case-control study. *Oncology Reports*. 1999; 6: 317-20.
75. Huebner WW, Schoenberg JB, Kelsey JL, Wilcox HB, McLaughlin JK, Raymond S, *et al*. Oral and pharyngeal cancer and occupation: a case control study. *Epidemiology*. 1992; 3: 300-9.
76. Andreotti M, Rodrigues AN, Cardoso LM, Figueiredo RA, Eluf-Neto J and Wunsch-Filho V. Occupational status and cancer of the oral cavity and oropharynx. *Cad Saude Publica*. 2006; 22 (3): 543-52.
77. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P and Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinoma worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2005; 14 (2): 467-75.
78. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, *et al*. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on cancer multicentre study. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95 (23): 1772-83.
79. Maden C, Beckmann AM, Thomas DB, McKnight B, Sherman KJ and Ashley RL. Human papillomavirus, herpes simplex viruses, and risk of oral cancer in men. *Am J Epidemiol*. 1992; 135: 1093-102.
80. Mork J, Glatte E, Hallmans G, Jellum E and Koskela P. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Eng J Med*. 2001; 344: 1125-31.

81. Rosenquist K. Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population based case-control study in southern Sweden. *Swe Dent J Suppl.* 2005; 179: 1-66.
82. Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, *et al.* Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol.* 2005; 125 (12): 1337-44.
83. Lea IA, Jackson MA, Bailey LS, Peddada SD and Dunnick JK. Genetic pathway and mutation profiles of human cancers: site- and exposure-specific patterns. *Carcinogenesis.* 2007; 28: 1851-8.
84. Ho T, Wei Q and Sturgis EM. Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 2007; DOI: 10.1002/hed.20570:
85. Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, Palacios-Sánchez B, Sánchez-Gutierrez JJ, GonzálezMoles MA and Bascones-Martínez A. Update on molecular pathology in oral cancer and precancer. *Anticancer Res.* 2008; 28: 1197-205.
86. Olshan AF, Weissler MC, Pei H and Conway K. p53 mutations in head and neck cancer: new data and evaluation of mutational spectra. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 1997; 6: 499-504.
87. Goessel G, Quante M, Hahn WC, Harada H, Heeg S, Suliman Y, *et al.* Creating oral squamous cancer cells: a cellular model of oral-esophageal carcinogenesis. *PNAS.* 2005; 102: 15599-604.
88. Nelson DS and Strobel HW. Evolution of cytochrome P450 proteins. *Mol Biol Evol.* 1987; 4: 572-93.
89. Nebert DW and Russell DW. Clinical importance of the cytochrome P450. *Lancet.* 2002; 12 (360): 1155-62.
90. Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, Daly AK, Garte SJ and Nebert DW. Human cytochrome P-450 (CYP) genes: a web page for the nomenclature of alleles. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2001; 10 (12): 1307-8.

91. Oscarson M and Ingelman-Sundberg. CYPalleles: a web page for nomenclature of human cytochrome P450 alleles. *Drug Metab Pharmacokin.* 2002; 17 (6): 491-5.
92. Hasler JA. Cytochromes P450 and cancer. *Molecular Aspects of Medicine.* 1999; 20: 1-137.
93. Shimada T, Martin MV, Pruess-Schwarz D, Marnett LJ and Guengerich FP. Roles of individual cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of benzo[a]pyrene,-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.* 1989; 49: 3218-28.
94. Quan, Reiners JJJ, Bell AO, Hong N and States JC. Cytotoxicity and genotoxicity of (+-) benzo-a-pyrene-trans-7,8-dihydrodiol in CYP1A1-expressing human fibroblasts quantitatively correlate with CYP1A1 expression level. *Carcinogenesis.* 1994; 15: 1827-32.
95. Shimada T, Yamakazi H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP. Interindividual variation in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 270: 414-23.
96. González FJ and Gelboin HV. Role of cytochrome P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Reviews.* 1994; 26: 165-83.
97. Hecht SS. Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997; 216: 181-91.
98. Crespi CL, Penman BW, Gelboin HV and Gonzalez FJ. A tobacco derived nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone is activated by multiple human cytochromes P450s including the polymorphic human cytochrome P4502D6. *Carcinogenesis.* 1991; 12: 1197-201.
99. Koop DR. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P4502E. *FASEB J.* 1992; 6: 724-30.
100. Guengerich FD, Kim DH and Iwasaki M. Role of cytochrome P450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxic.* 1991; 4: 168-79.

101. Rannug A, Alexandrie A-K and Sundberg-Ingelman M. Genetic polymorphisms of cytochromes P4501A1, 2D6 and 2E1. Regulation and toxicological significance. *JOEM*. 1995; 37: 25-36.
102. Hilderbrand CE, Gonzalez FJ, McBride OW and Nebert DW. Assignment of the human 2,3,7,8-tetracholorodibenzo-p-dioxin inducible cytochrome P1-450 gene on chromosome 15. *Nucleic Acids Research*. 1985; 13: 2009-16.
103. Kawakiri K. CYP1A1. En: Vineis P, Malats N, Lang M, d'Errico A, Caporaso N, Cuzick J, *et al.*, editores. *Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer*, IARC Scientific Publications n°. 148. IARC. ed. Lyon, France; 1999.
104. Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K and Kawajiri K. Genetic linkage of lung cancer associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of human cytochrome P4501A1 gene. *J Biochem*. 1991; 110: 407-11.
105. Cascorbi I, Brockmoller J and Roots I. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res*. 1996; 56: 4965-9.
106. Crofts F, Taioli E, Trachman J, Cosma GN, Currie D, Toniolo P, *et al.* Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. *Carcinogenesis*. 1994; 1994: 2961-63.
107. Kiyohara C, Hirohata T and Inutsuka S. The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms in the CYP1A1 gene. *Jpn J Cancer Res*. 1996; 87: 18-24.
108. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J and Hayashi S. The CYP1A1 genes and cancer susceptibility. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1993; 14: 77-87.
109. Zhang Z-Y, Fasco MJ, Huang L, Guengerich FP and Kaminsky S. Characterization of purified human recombinant cytochrome P4501A1 Ile⁴⁶² and Val⁴⁶² : Assessment of a role for the rare allele in carcinogenesis. *Cancer Res*. 1996; 56: 3926-33.
110. Persson I, Johansson I and Ingelman-Sundberg M. In vitro kinetics of two CYP1A1 variant enzymes suggested to be associated with interindividual differences in cancer susceptibility. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 231: 227-30.

111. Rothman N, Shields P, Poirier MC, Harrington D, Ford P and Strickland PT. The Impact of Glutathione s-Transferase M1 and Cytochrome P450 1A1 Genotypes on White-Blood-Cell Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adduct Levels in Humans. *Mol Carcinog.* 1995; 14: 63-8.
112. Mooney LA, Bell DA, Santella RM, Bennekun AM, Ottman R, Paik M, *et al.* Contribution of genetic and nutritional factors to DNA damage in heavy smokers. *Carcinogenesis.* 1997; 18: 503-9.
113. Ichiba M, Hagmar L, Rannug A, Hogstedt B, Alexandrie A-K and Cartensen U. Aromatic DNA adducts, micronuclei and genetic polymorphism for CYP1A1 and GST1 in chimney sweeps. *Carcinogenesis.* 1994; 15: 1347-52.
114. Shields PG, Bowman ED, Harrington AM, Doan VT and Weston A. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human lung and cancer susceptibility genes. *Cancer Res.* 1993; 53: 3486-92.
115. Hayes JD and Pulford DJ. The Glutathione S-transferase Supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprevention and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995; 30: 445-600.
116. Geisler SA and Olshan AF. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-huge review. *Am J Epidemiol.* 2001; 154: 95-105.
117. Strange RC and Fryer AA. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. IARC Scientific Publication. 1999; 148: 231-44.
118. Coles B and Ketterer B. The role of glutathione transferase in chemical carcinogenesis. *CRC Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1990; 25: 47-70.
119. Lin D and Meyer DJ. Effect of human rat glutathione S transferase on the covalent binding of the N-acetoxi derivatives of heterocyclic amines carcinogens in vitro: a possible mechanism of organ specificity in their carcinogenesis. *Cancer Res.* 1994; 54: 4920-6.
120. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E and Bolt HM. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1) cDNA cloning and characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J.* 1994; 300: 271-6.

121. Prochaska HJ and Talalay P. Regulatory mechanisms of monofunctional anticarcinogenic enzyme induction in murine liver. *Cancer Res.* 1988; 48: 4776-82.
122. Rushmore TH and Pickett CB. Glutathione S-transferases, structure, regulation and therapeutic implications. *J Biol Chem.* 1993; 268: 11475-78.
123. Rebbeck T. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 1997; 6: 733-43.
124. Widesten M, Pearson WR, Engstrom A and Mannervik B. Heterologous expression of the allelic variant mu-class glutathione S-transferase. *Biochem J.* 1991; 276: 519-24.
125. Hemmiki K, Dickey CH, Karlsson S, Bell DA, Hsu Y, Tsai WY, *et al.* Aromatic DNA adducts in foundry workers in relation to exposure, lifestyle and CYP1A1 and glutathione transferase M1 genotype. *Carcinogenesis.* 1996; 17: 1021-27.
126. Beetham JK, Grant D, Arand M, Garbarino J, Kiyosue T, Pinot F, *et al.* Gene evolution of epoxide hydrolases and recommended nomenclature. *DNA and cell Biology.* 1995; 14: 61-71.
127. Costa DJ, Walsch D, Sanasuttipun W and Lewtas J. Effect of GSTM1 and NAT2 genotypes on white cell DNA adduct levels at both high and low PAH exposures. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 1997; 38: 618.
128. Rojas M, Cascirbi I, Alexandrov K, Kriek E, Auburtin G, Mayer L, *et al.* Modulation of benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Carcinogenesis.* 2000; 21: 35-41.
129. Sram RJ. Effect of glutathione S-transferase M1 polymorphisms on biomarkers of exposure and effects. *Environ Health Perspect.* 1998; 106: 231-9.
130. Hou SM, Lambert B and Hemmiki K. Relationship between hprt mutant frequency, aromatic DNA adducts and genotypes of GSTM1 and NAT2 in bus maintenance workers. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1913-7.
131. Grinberg-Funes RA, Singh VN, Perera FP, Bell DA, Young TL, Dickey CH, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in smokers and their

relationship to micronutrient levels and glutathione S-transferase M1 genotype. *Carcinogenesis*. 1994; 15: 2449-54.

132. Ryberg D, Skaug V, Hewer A and Phillips DH. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis*. 1997; 18: 1285-9.

133. Rojas M, Alexandrov K, Cascorbi I and Brockmoller J. High benzo[a]pyrene diol-epoxide DNA adduct levels in lung and blood cells from individuals with combined CYP1A1 Msp/MspI-GSTM1*0/*0 genotypes. *Pharmacogenetics*. 1998; 8: 109-18.

134. Rothman N, Hayes RB, Zenser ZV and DeMarini DM. The glutathione S-transferase M1 (GSTM1) null genotype and benzidine associated bladder cancer, urine mutagenesis, and exfoliated urothelial DNA adducts. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 1996; 5: 979-83.

135. Cheng TJ, Christiani DC, Wiencke JK, Wain JC, Xu X, Wiencke JK, *et al*. Glutathione S-transferase mu genotype, diet and smoking as determinants of sister chromatid exchange frequency in peripheral lymphocytes in lung cancer cases and controls. *Mutat Res*. 1995; 348: 75-82.

136. Van Poppel V, Verhagen H, Van Veer P and VanBladeren PJ. Markers for cytogenetic damage in smokers: association with plasma antioxidants and glutathione S-transferase mu. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 1993; 2: 441-7.

137. Omiecinski CJ, Hassett C and Hosagrahara V. Epoxide hydrolase-polymorphism and role in toxicology. *Toxicology Letters*. 2000; 112-113: 365-70.

138. Fretland AJ and Omiecinski CJ. Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. *Chem Biol Interact*. 2000; 129: 41-59.

139. Shou M, Gonzalez FJ and Gelboin HV. Stereoselective epoxidation and hydration at the K-region of polycyclic aromatic hydrocarbons by cDNA-expressed cytochromes P4501A1, 1A2, and epoxide hydrolase. *Biochemistry*. 1996; 35: 15807-13.

140. Hassett C, Robinson KB, Beck NB and Omiecinski CJ. The human microsomal epoxide hydrolase gene (EPHX1): complete nucleotide sequence and structural characterization. *Genomics*. 1994; 23: 433-42.

141. Hassett C, Aicher L, Sidhu JS and Omiecinski CJ. Human microsomal hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro amino acid variants. *Hum Mol Genet.* 1994; 3: 421-28.
142. Benhamou S, Reinikainen M, Bouchardy C, Dayer P and Hirvonen A. Association between lung cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Cancer Res.* 1998; 58: 5291-3.
143. Smith CA and Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet.* 1997; 350: 630-3.
144. Pastorelli R, Guanci M and Cerri A. Impact of inherited polymorphisms in glutathione S-transferase M1, microsomal epoxide hydrolase, cytochrome P450 enzymes on DNA and blood protein adducts of benzo(a)pyrene-diolepoxide. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 1998; 7: 703-9.
145. London SJ, Smart J and Daly AK. Lung cancer risk in relation to genetic polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase among African-Americans and Caucasians in Los Angeles county. *Lung Cancer.* 2000; 28: 147-55.
146. Hassett C, Lin J, Carty CL and Laurenzana EM. Human hepatic microsomal epoxide hydrolase: comparative analysis of polymorphic expression. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 337: 275-83.
147. Kitteringham NR, Davis C, Howard N, Pirmohamed M and Park BK. Interindividual and interspecies variation in hepatic microsomal epoxide hydrolase activity: studies with cis-stilbene oxide, carbamezine 10, 11-epoxide and naphthalene. *J Pharm Exp.* 1996; 278: 1018-27.
148. Tang H, Wei Q and Sturgis EM. Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 2007; 29: 682-99.
149. Brennan P, Lewis S and Hashibe M. Pooled analysis of alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2004; 159: 1-16.
150. Varela-Lema L, Taioli E, Ruano Raviña A, Barros-Dios JM, Anantharaman D, Benhamou S, *et al.* Meta-analysis and pooled analysis of GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms in oral and pharyngeal cancers: a HuGE-GSEC review. *Genet Med.* 2008; 10: 369-84.

151. Taioli E. International collaborative study on genetic susceptibility to environmental carcinogens. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 1999; 8: 727-8.
152. Gaspari L, Marinelli D and Taioli E. International collaborative study on genetic susceptibility to environmental carcinogens (GSEC): an update. *Int J Hyg Environ Health.* 2001; 204: 39-42.
153. Jourenkova-Mironova N, Mitrunen K, Bouchardy C, Dayer P, Benhamou S and Hirvonen A. High-activity microsomal epoxide hydrolase genotypes and the risk of oral, pharynx, and larynx cancers. *Cancer Res.* 2000; 60: 534-6.
154. Wenghoefer M, Pesch B, Harth V, Broede P, Fronhoffs S, Landt O, *et al.* Association between head and neck cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Arch Toxicol.* 2003; 77: 37-41.
155. Buch SC, Notani PN and Bhisey RA. Polymorphism at GSTM1, GSTM3 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer in an Indian population. *Carcinogenesis.* 2002; 23: 803-7.
156. Deakin M, Elder J, Hendrickse C, Peckman D, Baldwin D, Pantin C, *et al.* Glutathione S-transferase GSTT1 genotype and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis.* 1996; 17: 881-4.
157. Coutelle C, Ward PJ, Fleury B, Quattrocchi P, Chambrin H, Iron A, *et al.* Laryngeal and oropharyngeal cancer, and alcohol dehydrogenase 3 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms. *Hum Genet.* 1997; 99: 319-25.
158. Park JY, Muscat JE, Ren Q, Schantz SP, Harwick RD, Stern JC, *et al.* CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997; 6: 791-7.
159. Matthias C, Bockmuhl U, Jahnke V, Jones PW, Hayes JD, Alldersea J, *et al.* Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers. *Pharmacogenetics.* 1998; 8: 91-100.
160. Jourenkova-Mironova N, Voho A, Bouchardy C, Wikman H, Dayer P, Benhamou S, *et al.* Glutathione S-transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 genotypes and the risk of smoking-related oral and pharyngeal cancers. *Int J Cancer.* 1999; 81: 44-8.

161. Hahn M, Hagedorn G, Kuhlisch E, Schackert HK and Eckelt U. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity cancer. *Oral Oncol.* 2002; 38: 486-90.
162. Gronau S, Koenig-Greger D, Jerg M and Riechelmann H. Gene polymorphisms in detoxification enzymes as susceptibility factor for head and neck cancer? *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003; 128: 674-80.
163. Katoh T, Kaneko S, Ohya R, Higashi K and Ikemura K. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism in patients with oral squamous cell carcinoma in relation to cigarette smoking. *The Asian J Oral and Maxillofac Surg.* 1995; 7: 13-7.
164. Hung HC, Chuang J, Chien YC, Chern HD, Chiang CP, Kuo YS, *et al.* Genetic polymorphisms of CYP2E1, GSTM1, and GSTT1; environmental factors and risk of oral cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997; 6: 901-5.
165. Kihara M, Kubota A, Furukawa M and Kimura H. GSTM1 gene polymorphism as a possible marker for susceptibility to head and neck cancers among Japanese smokers. *Cancer Lett.* 1997; 112: 257-62.
166. Tanimoto K, Hayashi S, Yoshiga K and Ichikawa T. Polymorphisms of the CYP1A1 and GSTM1 gene involved in oral squamous cell carcinoma in association with a cigarette dose. *Oral Oncol.* 1999; 35: 191-6.
167. Katoh T, Kaneko S, Kohshi K, Munaka M, Kitagawa K, Kunugita N, *et al.* Genetic polymorphisms of tobacco- and alcohol-related metabolizing enzymes and oral cavity cancer. *Int J Cancer.* 1999; 83: 606-9.
168. Sato M, Sato T, Izumo T and Amagasa T. Genetically high susceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined genotyping of CYP1A1 and GSTM1 genes. *Oral Oncol.* 2000; 36: 267-71.
169. Nomura T, Noma H, Shibahara T, Yokoyama A, Muramatusu T and Ohmori T. Aldehyde dehydrogenase 2 and glutathione S-transferase M 1 polymorphisms in relation to the risk for oral cancer in Japanese drinkers. *Oral Oncol.* 2000; 36: 42-6.
170. Kietthubthew S, Sriplung H and Au WW. Genetic and environmental interactions on oral cancer in Southern Thailand. *Environ Mol Mutagen.* 2001; 37: 111-6.

171. Cha IH, Park JY, Chung WY, Choi MA, Kim HJ and Park KK. Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 genes and susceptibility to oral cancer. *Yonsei Med J.* 2007; 48: 233-9.
172. Sreelekha TT, Ramadas K, Pandey M, Thomas G, Nalinakumari KR and Pillai MR. Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol.* 200; 37: 593-8.
173. Xie H, Hou L, Shields PG, Winn DM, Gridley G, Bravo-Otero E, *et al.* Metabolic polymorphisms, smoking, and oral cancer in Puerto Rico. *Oncol Res.* 2004; 14: 315-20.
174. Sikdar N, Paul RR and Roy B. Glutathione S-transferase M3 (A/A) genotype as a risk factor for oral cancer and leukoplakia among Indian tobacco smokers. *Int J Cancer.* 2004; 109: 95-101.
175. Drummond SN, De Marco L, Noronha JC and Gomez RS. GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2004; 40: 52-5.
176. Gattás GJ, de Carvalho MB, Siraque MS, Curioni OA, KOHLER p, Eluf-Neto J, *et al.* Genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. *Head Neck.* 2006; 28: 819-26.
177. Sharma A, Mishra A, Das BC, Sardana S and Sharma JK. Genetic polymorphisms at GSTM1 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer. *Neoplasma.* 2006; 53: 309-15.
178. Anantharaman D, Chaubal PM, Kannan S, Bhisey RA and Mahimka MB. Susceptibility to oral cancer by genetic polymorphisms at CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 loci among Indians: tobacco exposure as a risk modulator. *Carcinogenesis.* 2007; 28: 1455-62.
179. Hatagima A, Costa EC, Marques CFS, Koifman RJ, Boffetta S and Koifman S. Glutathione S-transferase polymorphisms and oral cancer: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol.* 2008; 44: 200-7.
180. Barefoot JC, Gronbaek M, Feaganes JR, McPherson RS, Williams RB and Siegler IC. Alcoholic beverage preference, diet, and health habits in the UNC Alumni Heart Study. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76: 466-72.

181. Morita S, Yano M, Tsujinaka T, Akiyama Y, Taniguchi M, Kaneko K, *et al.* Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1999 Mar 1; 80 (5): 685-8.
182. Kao SY, Wu CH, Lin SC, Yap SK, Chang CS, Wong YK, *et al.* Genetic polymorphism of cytochrome P4501A1 and susceptibility to oral squamous cell carcinoma and oral precancer lesions associated with smoking/betel use. *J Oral Pathol Med*. 2002; 31: 505-11.
183. Marques CFS, Koifman S, Koifman RJ, Boffetta P, Brennan P and Hatagima A. Influence of CYP1A1, CYP2E1, GSTM3 and NAT2 genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: results from a case-control study in Rio de Janeiro. *Oral Oncol*. 2006; 42: 632-7.
184. Leichsenring A, Losi-Guembarovski R, Maciel ME, Losi-Guembarovski A, Oliveira BV, Ramos G, *et al.* CYP1A1 and GSP1 polymorphisms in an oral cancer case-control study. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39: 1569-74.
185. Sato M, Sato T, Izumo T and Amagasa T. Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. *Carcinogenesis*. 1999; 20: 1927-31.
186. Gual A, Rodriguez M, Lligoña A and Llopis JJ. Does the concept of a standard drink apply to viticultural societies? *Alcohol & Alcoholism*. 1999; 34: 153-60.
187. Kaerlev L, Hausen J, Hausen HL and Nielsen PS. Cancer incidence among seafarers: a population based cohort study. *Occup Environ Med*. 2005; 62: 761-5.
188. Oreggia F, De Stefani E, Correa P, Rivero S, Fernández G, Leiva J, *et al.* Occupational exposure in cancer of the mouth, pharynx and larynx. *An Otorrinolaringol Ibero Am*. 1989; 16: 365-76.
189. Thuret AP, Geoffroy-Perez B, Luce D, Goldberg M and Imbernon E. A 26 year cohort mortality study of french construction workers aged 20 to 64 years. *J Occupational & Environmental Medicine*. 2007; 49: 546-56.
190. Gustavsson P, Jakobsson R, Johansson H, Lewin F, Norell S and Rutkvist LE. Occupational exposures and squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx, larynx and oesophagus. A case-control study in Sweden. *Occup Environ Med*. 1998; 55: 393-400.

191. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL and Lucier GW. Genetic risk and carcinogenic exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85: 1159-64.
192. Zhao H, Spitz MR, Gwyn KM and Wu X. Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk in non-hispanic whites. *Molecular Carcinogenesis.* 2002; 33: 99-104.
193. Breslow NE and Day NE. *Statistical Methods in Cancer Research. Vol. I. The analysis of case-control studies.* IARC Scientific Publications, 32. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 1980.
194. Varela-Lema L, Ruano Raviña A, Juiz Crespo MA, Kelsey KT, Loidi L and Barros-Dios JM [artículo en internet]. CYP1A1, mEH and GSTM1 polymorphisms and risk of oral and pharyngeal cancer: a spanish case-control study. *J Oncol.* 2008; ID 74130: doi: 10.1155/2008/741310. Disponible en: <http://www.hindawi.com/GetArticle.aspx?doi=10.1155/2008/741310>
195. Schlesselman JJ and Stolley PD. *Sources of bias in case-control studies.* New York, Oxford University Press, Inc. 1982: 125-43.
196. E. L-P, Salazar-Martínez E and Hernández-Avila M. Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. *Salud Pública de México.* 2001; 43: 135-48.
197. Wacholder S, McLaughlin JK, Silverman DT and Mandel JS. Selection of controls in case-control studies. *Am J Epidemiol.* 1992; 135: 1019-28.
198. Greenland S. The effect of misclassification in the presence of covariables. *Am J Epidemiol.* 1980; 112: 564-669.
199. Hung RJ, Boffetta P, Brockmoller J, Butkiewicz D, Cascorbi I, Clapper ML, *et al.* CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in caucasian non-smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis.* 2003; 24: 875-82.
200. Hashibe M, Brennan P, Strange RC, Bhisay R, Cascorbi I, Lazarus P, *et al.* Meta- and pooled analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Dec; 12: 1509-17.

201. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels A, Maisonneuve P, *et al.* Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2008; 122: 155-64.
202. Aragonés N, Ramis R, Pollán M, Pérez-Gómez B, Gómez-Barroso D, Isabel Boldo E, *et al* [artículo en internet]. Oesophageal cancer mortality in Spain: a spatial analysis. *BMC*. 2007; 7 (3). doi: 10.1186/1471-2407-7-3. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2407-7-3.pdf>
203. Ruano Raviña A, Figueiras A, Montes-Martínez A and Barros-Dios JM. Dose-response relationships between tobacco and lung cancer: new findings. *Eur J Cancer Prev*. 2003; 12: 257-63.
204. Ragin CCR, Modugno F and Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res*. 2007; 86: 104-14.
205. Sancho-Garnier H and Theobald S. Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco and cancer risk II: Pharynx and larynx cancer. *Eur J Cancer*. 1993; 29A (2): 273-6.
206. De Stefani E, Boffetta P, Oreggia F, Mendilaharsu M and deneo-Pellegrini H. Smoking patterns and cancer of the oral cavity and pharynx: a case-control study in Uruguay. *Oral Oncol*. 1998; 34 (5): 340-6.
207. Benhamou S and Sancho-Garnier H. Black and blond tobacco smoking: a review. *Cancer Detect Prev*. 1993; 17 (1).
208. Armadans-Gil L, Vaqué-Rafart J, Rosselló J, Olona M and Alsedà M. Cigarette smoking and male lung cancer risk with special regard to type of tobacco. *Int J Epidemiology*. 1999; 28: 614-9.
209. Samanic C, Kogevinas M, Dosemeci M, Malats N, Real FX, Garcia-Closas M, *et al.* Smoking and bladder cancer in Spain: Effects of tobacco type, timing, environmental tobacco smoke and gender. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2006; 15 (7): 1348-54.
210. Vineis P and Pirastu R. Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes Control*. 1997; 8: 346-55.
211. Bryant MS, Vineis P, Skipper PL and Tannenbaum SR. Hemoglobin adducts of aromatic amines: associations with smoking status and type of tobacco. *Proc Natl Acad Sci*. 1988; 85: 9788-91.

212. López-Abente G, González CA, Errezola M, Escolar A, Izarzugaza I, Nebot M, *et al.* Tobacco smoke inhalation pattern, tobacco type and bladder cancer in Spain. *Am J Epidemiol.* 1991; 134 (8): 830-9.
213. Ruano Raviña A, Figueiras A and Barrios-Dios JM. Type of wine and risk of lung cancer: a case control study. *Thorax.* 2004; 59: 981-85.
214. Purdute MP, Hashibe M, Berthiller J, La Vecchia C, Maso LD, Herrero R, *et al.* Type of alcohol beverage and risk of head and neck cancer-a pooled analysis within the enhance consortium. *Am J Epidemiol.* 2008; en prensa:
215. Rothman KL, Cann CI and Friedman MP. Carcinogenicity of dark liquor. *Am J Public Health.* 1989; 79: 1516-20.
216. Zapsalis C and Beck RA. Food chemistry and Nutritional Biochemistry. New York: John Wiley and Sons. 1985:
217. To-Figueras J, Gené M, Gómez-Catalán J, Piqué E, Borrego N, Caballero M, *et al.* Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphisms in relation to laryngeal cancer risk. *Cancer Lett.* 2002; 187: 95-101.
218. Park JY, Stimson PS and Lazarus P. Epoxide hydrolase genotype and orolaryngeal cancer risk: interaction with GSTM1 genotype. *Oral Oncol.* 2003; 39: 483-90.
219. Heckbert SR, Weiss NS, Hornung SK, Eaton DL and Motulsky AG. Glutathione S-transferase and epoxide hydrolase activity in human leukocytes in relation to risk of lung cancer and other smoking related cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1992; 84 (6): 414-22.
220. To-Figueras J, Gené M, Gómez-Catalán J, Piqué E, Borrego N and Corbella J. Lung cancer susceptibility in relation to combined polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase P1. *Cancer Lett.* 2001; 173: 155-62.
221. Amador AG, Righi PD, Radpour S, Everett ET, Weisberger E, Langer M, *et al.* Polymorphisms of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93 (4): 440-5.

222. Kiyohara C, Yoshimasu K, Takayama K and Nakanishi Y. EPHX1 polymorphisms and the risk of lung cancer. *Epidemiology*. 2006; 17 (1): 89-99.
223. Lee WJ, Brennan P, Boffetta P, London SJ, Benhamou S, Rannug A, *et al.* Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk: a quantitative review. *Biomarkers*. 2002; 7 (3): 230-41.
224. Gronau S, Koenig-Greger D, Jerg M and Riechelmann H. GSTM1 enzyme concentration and enzyme activity in correlation to the genotype of detoxification enzymes in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Dis*. 2003; 9 (2): 62-7.
225. Nazar-Stewart V, Vaughan TL, Burt RD, Chen C, Berwick M and Swanson GM. Glutathione S-transferase M1 and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999; 8 (6): 547-51.
226. Figaro Gattás GJ, Brasilino de Carvalho M, Siraque MS, Curioni OA, Kohler P, Eluf-Neto J, *et al.* Genetic polymorphisms CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. *Head Neck*. 2006; 28 (3): 217-24.
227. Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H and Alexandrov K. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination as a risk modifier of tobacco related cancers. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2000; 9: 3-28.
228. Gupta C and Ray CS. Epidemiology of betel quid usage. *Ann Acad Med Singapore*. 2004; 33 (Suppl): 31S-6S.
229. Sellers EM. Pharmacogenetic and ethnoracial differences in smoking. *JAMA*. 1998; 280: 179-80.
230. Ristow H and Obe G. Acetaldehyde induce cross links in DNA and causes sister-cromatid exchanges in human cells. *Mutation Research*. 1978; 58: 115-9.
231. Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA and Williams DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis*. 2001; 7: 349-54.
232. Ruano-Ravina A, Figueiras A and Barros-Dios JM. Type of wine and risk of lung cancer. A case-control study in Spain. *Thorax*. 2004; 59: 981-5.

233. Taioli E, Gaspari L, Benhamou S, Boffetta P, Brockmoller J and Butkiewicz D. Polymorphisms in CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and lung cancer below the age of 45 years. *Int J Epidemiology*. 2003; 32: 60-3.
234. Vineis P, Veglia F, Anttila S, Benhamou S, Clapper ML, Dolzan V, *et al.* CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and lung cancer: a pooled analysis of gene-gene interactions. *Biomarkers*. 2004; 9 (3): 298-305.
235. Lodovici M, Luceri C, Guglielmi F, Bacci C, Akpan V, Fonnesu ML, *et al.* Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1 and mEH. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2004; 13 (8): 1342-8.
236. Gaudet MM, Olshan AF, Poole C, Weissler MC, Watson M and Bell DA. Diet, GSTM1 and GSTT1 and head and neck cancer. *Carcinogenesis*. 2004 May; 25 (5): 735-40.
237. Konig-Greger D, Riechelmann H, Wittich U and Gronau S. Genotype and phenotype of glutathione-S-transferase in patients with head and neck carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004; 130 (6): 718-25.
238. Evans AJ, Henner WD, Eilers KM, Montalto MA, Wersinger EM, Andersen PE, *et al.* Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck*. 2004; 26 (1): 63-70.
239. Ko Y, Abel J, Harth V, Brode P, Antony C, Donat S, *et al.* Association of CYP1B1 codon 432 mutant allele in head and neck squamous cell cancer is reflected by somatic mutations of p53 in tumor tissue. *Cancer Res*. 2001; 61 (11): 4398-404.
240. Cabelguenne A, Lorient M-A, Stucker I, Blons H, Koum-Besson E, Brasnu D, *et al.* Glutathione-associated enzymes in head and neck squamous cell carcinoma and response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. *Int J Cancer*. 2001; 93: 725-30.
241. Olshan AF, Weissler MC, Watson MA and Bell DA. GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000; 9 (2): 185-91.
242. McWilliams JE, Evans AJ, Beer TM, Andersen PE, Cohen JL, Everts EC, *et al.* Genetic polymorphisms in head and neck cancer risk. *Head Neck*. 2000; 22 (6): 609-17.

243. Park LY, Muscat JE, Kaur T, Schantz SP, Stern JC, Richie JP, Jr., *et al.* Comparison of GSTM polymorphisms and risk for oral cancer between African-Americans and Caucasians. *Pharmacogenetics*. 2000; 10 (2): 123-31.
244. Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Char D, Spitz MR and Wei Q. Glutathione-S-transferase polymorphisms and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer*. 1999; 84 (3): 220-4.
245. Gonzalez MV, Alvarez V, Pello MF, Menendez MJ, Suarez C and Coto E. Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase-M1, and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to head and neck cancer. *J Clin Pathol*. 1998; 51 (4): 294-8.
246. Matthias C, Bockmuhl U, Jahnke V, Harries LW, Wolf CR, Jones PW, *et al.* The glutathione S-transferase GSTP1 polymorphism: effects on susceptibility to oral/pharyngeal and laryngeal carcinomas. *Pharmacogenetics*. 1998; 8 (1): 1-6.
247. Worrall SF, Corrigan M, High A, Starr D, Matthias C, Wolf CR, *et al.* Susceptibility and outcome in oral cancer: preliminary data showing an association with polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6. *Pharmacogenetics*. 1998; 8 (5): 433-9.
248. Edmund L, Yang CS, Bin Z, Francis S-C, Balakrishnan A and Chang CS. Genetic polymorphism of conjugating enzymes and cancer risk: GSTM1, GSTT1, NAT1 and NAT2. *The Journal of Toxicological Sciences*. 1997; 23: 140-42.
249. Oude Ophuis MB, van Lieshout EM, Roelofs HM, Peters WH and Manni JJ. Glutathione S-transferase M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphisms in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. *Cancer*. 1998; 82 (5): 936-43.
250. Mulder TPJ, Manni JJ, Roelofs HM, Peters WH and Wiersma A. Glutathione S-transferases and glutathione in human head and neck cancer. *Carcinogenesis*. 1995; 16 (3): 619-24.
251. Trizna Z, Clayman GL, Spitz MR, Briggs KL and Goepfert H. Glutathione s-transferase genotypes as risk factors for head and neck cancer. *Am J Surg*. 1995; 170 (5): 499-501.

8. ANEXOS

ANEXO I. DESCRIPCIÓN DE LOS ESTUDIOS INCLUIDOS Y EXCLUIDOS EN EL META-ANÁLISIS

Tabla 1. Resumen de los estudios incluidos que investigaron la asociación entre el polimorfismo GSTM1nulo y el cáncer de cavidad oral y faringe.

Autor, año y país	Raza	Nº casos Nº controles	Sexo	Fuente de los controles	Localización del tumor	Polimorfismos GSTM1				OR GSTMI nulo (IC 95%) (global y estratificado por raza, hábito tabáquico y localización del tumor)
						número de casos presente	Número de controles presente	Nulo	presente	
Cha et al (2007) Korea	Población Coreana	72 casos 221 controles:	Casos: 46M; 26 F Controlles: 113M, 108F	Escuela Dental	Oral (Carcinoma espinocelular)	37	123	86		OR global= 0.74 (0.43-1.26) OR fumadores= 0.3 (0.1-0.8) OR no fumadores= 1.58 (0.7-3.57)
						(51.4%)	(58.9%)	(41.1%)		
						Fumadores				
		11	20	22	12	No fumadores				
		21	11	64	53					
Hatagima et al (2007) Rio Janeiro, Brazil	Blanca: 58,9% (261) No-blanca (negros+mulatos) =41.1% (182)	231 casos () 212 controles	Casos: 193M, 38F Controlles: 169M, 43F	Hospital	Cáncer de la cavidad oral y orofaringe	95	136	93	119	ORglobal=0.89 (0.61-1.3) ORblancos=0.95 (0.59-1.54) ORno-blancos=0.87 (0.47-1.6)
						(41.1%)	(58.9%)	(43.9%)	(56.1%)	
						Blancos				
						60	69	63	69	
		35	67	30	50	No-blancos				
		(34,3%)	(65,7%)	(37,5%)	(62,5%)					
Anantharam et al (2007) India	India	458 casos 729 controles	Casos: 323M, 135F Controlles: 636M, 93F	No familiares; banco de sangre o clínica dental	Oral (Carcinoma espinocelular)	198	253	269	458	ORglobal=1.3 (1.05-1.7) OR fumadores=2.93 (1.06-8.09)
						(43.9%)	(56.1%)	(37%)	(63%)	
						Fumadores (cigarrillos o bidis)				
		14	9	18	34					
Sharma et al (2006) India	India	40 casos: 87 controles:	Casos: 34M, 6F Controlles: 55M, 32F	Voluntarios o sujetos sanos que visitaron el hospital	Cavidad oral (Carcinoma espinocelular)	21	19	29	58	ORglobal= 2.21 (1.03-4.75) OR no fumadores= 5.58 (1.9-16.3) OR gran fumadores= 0.97 (0.24-3.9)
						(52.5%)	(47.5%)	(33.3%)	(66.7%)	
						No fumadores				
						16	6	21	44	
		5	9	8	14	Gran fumadores (>40 paquetes-año)				

Anexos

Continuación tabla 1.

Autor, año y país	Raza	Nº casos Nº controles	Sexo	Fuente de los controles	Localización del tumor	Polimorfismos de la GSTMI			OR GSTMI nulo (IC 95%) (global y estratificado por raza, hábito tabáquico y localización del tumor)	
						Número de casos		Número de controles		
						Nulo	Presentee	Nulo		Presentee
Gattás GJF et al (2006) Brasil	Blanca :61,5% No blanca: 38,5%	103 casos 102 controles	Casos: 90 M, 13F Controlles: 93M, 9F	Hospital	Cavidad oral/ Faringe	Cavidad oral			OR cavidad oral = 2,77 (1,28-5,98) OR faringe = 2,2 (1,08-4,63)	
						24 (63,1%)	39 (38,2%)	63 (61,8%)		
Sikdar N et al (2004) ¹⁷⁴ India	India	256 casos 259 controles	Casos: 168 M, 88 F Controlles: 183M, 76F	Hospital	Cavidad oral (cárcinoma espinocelular)	Faringe			ORglobal = 0,99 (0,69-1,44)	
						25 (58,1%)	18 (41,9%)	39 (38,2%)		63 (61,8%)
Xie H et al (2004) ¹⁷³ Puerto Rico	Blanca: 68,4% Negra: 8,7% Mestiza: 15,3% Otras: 7,6%	132 casos 143 controles	Casos: 119M, 13F Controlles: 110M, 33F	Poblacional	Oral (Carcinoma espinocelular)	Nunca fumadores			OR global= 0,7 (0,43-1,15) OR nunca fumadores = 0,78 (0,28-2,27) OR fumadores= 0,7 (0,39-1,26) OR fumadores < 8,5 pack.years= 2,5 (0,41-15,1) OR fumadores 8,5-336 pack.years= 1,6 (0,54-4,74) OR fumadores > 36 pack.years= 0,2 (0,08-0,54)	
						49 (37%)	83 (63%)	65 (45%)		78 (55%)
						Alguna vez fumadores				34 (54%)
						8 (40%)	12 (60%)	29 (46%)		
						Fumadores < 8,5 paquetes/día.año				44 (55%)
						41 (37%)	71 (63%)	36 (45%)		
Fumadores 8,5-36 paquetes/día.año			20 (71%)							
3 (50%)	3 (50%)	8 (29%)								
Fumadores > 36 paquetes/día.año			15 (60%)							
15 (52%)	14 (48%)	10 (40%)								
Fumadores > 36 paquetes/día.año			9 (33%)							
23 (30%)	54 (70%)	18 (67%)								
Drummond SN et al (2004) ¹⁷⁵ Brasil	No se especifica	70 casos (fumadores) 82 controles (fumadores)	Casos: 61M, 9 F Controlles: No se especifica	Pacientes de clínica dental	Cavidad oral carcinoma espinocelular	Faringe			OR global=2,01 (1,04-3,88)	
						46 (65,7%)	24 (34,3%)	40 (48,7%)		42 (51,3%)

Continuación tabla 1.

Autor, año y país	Raza	Nº casos Nº controles	Sexo	Fuente de los controles	Localización del tumor	Polimorfismos de la GSTM1				OR GSTM1 nulo (IC 95%) (global y estratificado por raza, hábito tabáquico y localización del tumor)
						number casos Nulo	presente	number controles Nulo	presente	
Gronau Set al (2003) ²²⁴ Alemania	Caucásica	73 casos 136 controles	Casos: 56M, 17 F Controlles: 102 M, 34F	Hospital (cirugía vascular)	Cavidad oral (espinocelular)	41 (56%)	32 (44%)	66 (51%)	63 (49%)	OR global= 1,36 (0,8-2,4)
Hahn M et al (2002) ¹⁶¹ Alemania	Caucasian	94 casos 92 controles	Casos: 66M, 34F Controlles: 47M, 45F	Donantes de sangre aleatorios	Boca (espinocelular)	56 (59,6%)	38 (40,4%)	49 (53,3%)	43 (46,7%)	ORglobal= 1,29 (1,29-2,3)
Buch SC et al (2002) ¹⁵⁵ India	Indian	297 casos 450 controles Matched para region of origen	Not specified	Centros comunitarios y donantes de sangre	Bucal (espinocelular)	146 (49,2%)	151 (50,8%)	111 (24%)	339 (76%)	OR global= 2,95 (2,16-4,03) OR fumadores= 4,96 (1,88-13,09) OR fumadores de bidi= 3,1 (1,3-7,2) OR fumadores de tabaco= 3,8 (2,2-6,5)
Kietthubthwe S et al (2001) ¹⁷⁰ Tailandia	97% Budista 3% Musulmana	53 casos	Casos: 35 M, 18F Controlles: 35M, 18F	Voluntarios de localizaciones cercanas	Cavidad oral (espinocelular)	30 (56,6%)	23 (43,4%)	16 (30,2%)	37 (69,8%)	ORglobal= 3,0 (1,4-6,7) OR fumadores habituales= 4,1 (1,5-11,3) OR no/fumadores leves= 1,7 (0,5-6,4) OR consumidores habituales de alcohol= 4,3 (1,4-13,2) OR no/consumo leve de alcohol= 2,1 (0,8-7,7) OR fumadores habituales de betel= 4,0 (1,3-12,9) OR no/mascadores leves de betel= 2,5 (0,8-7,7)

Anexos

Continuación tabla 1.

Autor, año y país	Raza	N° casos N° controles	Sexo	Fuente de los controles	Localización del tumor	Polimorfismos de la GSTM1 polymorphisms			OR GSTM1 nulo (IC 95%) (global y estratificado por raza, hábito tabáquico y localización del tumor)
						presente	Nulo	presente	
Sreelekha et al (2001) ¹⁷² India	India	98 casos 60 controles	Casos: 80M, 18F Controlles: 45M, 15F	No se especifica	Cáncer oral	48 (49%)	20 (33,33%)	40 (66,66%)	OR global= 1,92 (0,98-3,74)
						50 (51%)	20	40	
Sato M et al (1999) (2000) ^{168, 185} Japón	Japonesa	Matched 142 casos 142 controles	Casos: 78M, 64F Controlles: 78M, 64F	Hospital	Oral (espinocelular)	92 (64,8%)	64 (45,1%)	78 (54,9%)	OR global=2,24 (1,39-3,61) OR consumo acumulado bajo= 3,1 (1,6-5,9) OR consumo acumulado medio= 2,0 (0,8-5,4) OR consumo acumulado alto= 1,5 (0,3-7,7)
						Consumo acumulado bajo ($\leq 2.10^5$)			
						54	47	54	
						Consumo acumulado medio ($\sim 2.4. 10^5$)			
						20	14	20	
Alto consumo acumulado ($\geq 4. 10^5$)									
18	16	3	4						
Nomura et al (2000) ¹⁶⁹ Japón	Japonesa	114 casos 33 controles	No se especifica	Colegio odontología de Tokio	Oral (espinocelular)	77 (40,3%)	15 (45,5%)	18 (54,5%)	OR global=2,5 (1,1-5,4)
						37 (32,5%)	15	18	
Jourenkova-Mironova et al (1999) ¹⁶⁰ Francia	Caucásica	121 casos (fumadores) 172 controles (fumadores)	Casos: 93% M, 7%F Controlles: 95% M, 5%F	Hospitalarios	Cavidad oral and faringe (espinocelular)	58 (47,9%)	90 (52,3%)	82 (47,7%)	OR global=0,84 (0,5-1,3) OR fumadores ≤ 30 years=0,6 (0,3-1,4) OR fumadores ≥ 31 years=0,98 (0,5-1,8)
						Fumadores ≤ 30 años			
						19	44	33	
						Fumadores ≥ 31 años			
37	37	44	43						
	Cáncer oral					30 (44,8%)	90 (52,3%)	82 (47,7%)	OR global=0,74 (0,4-1,3)
						37 (55,2%)	90	82	
	Cáncer faringe					26 (52%)	90 (52,3%)	82 (47,7%)	OR global=0,99 (0,5-1,9)
						24 (48%)	90	82	

Continuación tabla 1.

Autor, año y país	Raza	Nº casos Nº controles	Sexo	Fuente de los controles	Localización del tumor	Polimorfismos de la GSTM1			OR GSTM1 nulo (IC 95%) (global y estratificado por raza, hábito tabáquico y localización del tumor)	
						Número de controles presente	Número de controles nulo	Número de controles presente		
Tanimoto et al (1999) ¹⁶⁶ Japón	Japonesa	100 casos 100 controles	Casos: 60M, 40F Controlles: 60M, 40F	Hospital	Oral (espinocelular)	43 (43%)	57 (57%)	42 (42%)	58 (58%)	OR global=1,04 (0,59-1,82)
Katoh T et al (1999) ¹⁶⁷ Japón	Japonesa	92 casos 146 controles	Casos: 56 M, 36 F Controlles: 91M, 56F	Hospital	Cavidad oral (n=90)	54 (58,7%)	38 (41,3%)	68 (46,3%)	79 (53,7%)	OR global= 1,65 (0,98-2,80)
Matthias C et al (1998) ¹⁵⁹ Alemania	Caucásica	126 casos 219 controles	Casos: 93M, 33F Controlles: 174M, 44F	hospital	Oral/ Faringe (espinocelular)	71 (58,2%)	51 (41,8%)	95 (53,4%)	83 (46,6%)	OR global= 1,2 (0,8-2,0)
Park JY et al (1997) ¹⁵⁸ Nueva York	Caucásica	112 casos 135 controles	Casos: 54% M, 45,7%F Controlles: 50,6% M 52,2%F	Amigos o familiares sanos (85) Hospital (50)	Cavidad oral cáncer	55 (50,5%)	54 (49,5%)	58 (53,2%)	51 (46,8%)	OR global= 0,9 (0,5-1,5)
Kihara M et al (1997) ¹⁶⁵ Japón	Japonesa	76 casos 474 controles		Institución médica	Cavidad oral and faringe	47 (63%)	28 (37%)	230 (48,7%)	242 (51,2%)	OR global= 1,77 (1,06-2,9)
Hung H-C et al (1997) ¹⁶⁴ Taiwan	71% fukienense, 7% hakka, 22% china	41 casos 123 controles	Masculino	Departamento de odontología	Cáncer oral	24 (58,5%)	17 (41,5%)	71 (57,7%)	52 (42,2%)	OR global= 1,03 (0,5-2,1)

Anexos

Continuación tabla 1.

Autor, año y país	Raza	Nº casos Nº controles	Sexo	Fuente de los controles	Localización del tumor	Polimorfismos de la GSTM1			OR GSTM1 nulo (IC 95%) (global y estratificado por raza, hábito tabáquico y localización del tumor)	
						Número de controles Nulo	presente	Número de controles Nulo		presente
Coutelle et al (1997) ¹⁵⁷ Francia	Caucasian	21 casos alcoólicos 37 controles alcoólicos	No se especifica	Clínica de alcoólicos	Tumores oro-faringe	13 (62%)	8 (38%)	18 (49%)	19 (51%)	OR global (alcoólicos)= 1,71 (0,58-5,01)
Deakin et al (1996) ¹⁵⁶ Inglaterra	Caucasian	40 casos 577 controles	Casos: 28M, 12F Controles: 277M, 300F	hospital	Boca (espinocelular=	22 (55%)	18 (45%)	316 (54,8%)	261 (45,2%)	OR global =1,00 (0,53-1,9)

Tabla 2. Resumen de los estudios incluidos que investigaron la asociación entre el polimorfismo CYP1A1 exón 7 (Ile/Val) y el cáncer de cavidad oral y faringe

Autor, año y país	Raza	N° casos N° controles	Sexo	Fuente de los controles	Localización del tumor	Número de casos			Número de controles			OR CYP1A1 IC 95% (global y estratificado por raza, hábito tabáquico y localización del tumor)
						Ile/Ile	Ile/Va	Val/Val	Ile/Ile	Ile/Va	Val/Val	
Leichsenring et al (2006) South of Brasil	?	72 casos 60 controles	Casos: 61M, 11F Controlles: 49M, 11F	Hospital	Oral (espinocelular)	52 (72.2%)	18 (25%)	2 (2.8%)	44 (73.3%)	16 (26.7%)	0	OR Ile/Val=0.95 (0.4-2.08) OR Ile/Val+Val/Val= 1.06 (0.49-2.28)
Marques et al (2006) Brasil	Blanca: 58,7% Negra :17,4% Mulata: 23,9%	-231 casos -212 controles	Casos : 193 M, 38F Controlles : 168M, 44F	Hospital	Oral (espinocelular)	179 (77%)	46 (20%)	6 (3%)	170 (80%)	40 (19%)	2 (1%)	OR Ile/Val= 1,09 (0,68-1,75) OR Val/Val= 2,85 (0,57-14,3) OR Ile/Val + Val/Val= 1,18 (0,74-1,85)
Xie H et al (2004) ¹⁷³ Puerto Rico	Blanca: 68,4% Negra: 8,7% Mestiza: 15,3% Other: 7,6%	-132 casos -143 controles	Casos: 119M, 13F Controlles: 110M, 33F	Poblacional	Oral (espinocelular)	89 (77,5%)	39 (29,5%)	4 (3%)	92 (64%)	43 (30%)	8 (6%)	OR Ile/Val= 0,94 (0,56-1,58) OR Val/Val= 0,52 (0,15-1,78) OR Ile/Val + Val/Val global= 0,87 IC95%(0,53-1,43) OR Ile/Val o Val/Val para no fumadores= 1,08 IC95%(0,39-3,03) OR Ile/Val + Val/Val para fumadores= 0,89 IC95%(0,48-1,64) OR Ile/Val + Val/Val para < 8,5 paquetes.año= 2,31 (0,36-14,7) OR Ile/Val + Val/Val para 8,5-3,6 paquetes.año= 2,44 (0,7-8,4) OR Ile/Val + Val/Val para > 3,6 paquetes.año= 0,7 (0,27-1,8)
						12	8		39	24		
									Nunca fumadores			
						77	35		53	27		
									Alguna vez fumadores			
									Fumadores < 8,5 paquetes/día.año			
						2	4		15	13		
									Fumadores 8,5-36 paquetes/día.año			
						18	11		20	5		
									Fumadores > 36 paquetes/día.año			
						57	20		18	9		

Anexos

Continuación tabla 2.

Autor, año y país	Raza	Nº casos Nº controles	Sexo	Fuente de los controles	Localización del tumor	CYP1A1 exón 7 A/G Ile/Val				OR CYP1A1 IC 95% (global y estratificado por raza, hábito tabáquico y localización del tumor)	
						Número de casos		Número de controles			
						Ile/Ile	Ile/Va I	Val/Val	Ile/Ile	Ile/Va I	Val/Val
Hahn M et al (2002) ¹⁶¹ Alemania	Caucásica	94 casos 92 controles	Casos: 66M, 34F Controlles: 47M, 45F	Donantes de sangre	Boca (espinocelular)	90 95,7%	4 4,3%	0 0%	86 93,5%	6 6%	0 0%
Kao S-Y et al (2002) ¹⁸² Taiwan	Asiática	106 casos 146 controles	Casos: 92 M, 14F Controlles: 98M, 48F	Hospital	Oral (espinocelular)	14 13,2%	84 79,2%	8 7,6%	66 45,2%	78 53,4%	2 1,4%
Sreelekha TT et al (2001) ¹⁷² India	Indian	98 casos 60 controles	Casos: 80M, 18F Controlles: 45M, 15 F	No se especifica	Oral cáncer	48 49%	50 51%	50 51%	50 83%	10 17%	
Sato M et al (2000) ¹⁶⁸ Japón	Japonesa	142 casos 142 controles	Casos: 78M, 64F Controlles: 78M, 64F	Hospital	Oral (espinocelular)	(68) 47,9%	(55) 38,7%	(19) 13,4%	(90) 63,4%	(46) 32,4%	(6) 4,2%
						Bajo consumo acumulado de cigarrillos (≤ 2.10 ⁵)					
						63	11	98	3		
						Consumo acumulado medio (-2-4. 10 ⁵)					
						29	5	32	2		
						Alto consumo (≥4. 10 ⁵)					
						31	3	6	1		
Katoh T et al (1999) ¹⁶⁷ Japón	Japonesa	92 casos 146 controles	Casos: 56 M, 36 F Controlles: 91M, 56F	Hospital	Cavidad oral (n=90)	50 54,5%	36 39,1%	6 6,5%	89 60,5%	50 34,1%	8 5,4%

Continuación tabla 2.

Autor, año y país	Raza	Nº casos Nº controles	Sexo	Fuente de los controles	Localización del tumor	CYP1A1 exón 7 A/G Ile/Val				OR CYPIA IC 95% (global y estratificado por raza, hábito tabáquico y localización del tumor)		
						Número de casos		Número de controles				
						Ile/Ile	Ile/Va I	Val/Val	Ile/Ile	Ile/Va I	Val/Val	
Matthias C et al (1998) ¹⁵⁹ Alemania	Caucásica	126 casos 219 controles	Casos: 93M, 33F Controlles: 174M, 44F	Hospital	Oral/ Faringe (espinocelular)	110 88,7%	14 11,3%	0 0%	165 85,5%	19 9,3%	2 1%	OR Ile/Val=0,81 (0,4-1,6)
Park JY et al (1997) ¹⁵⁸ Nueva York	Caucásica	112 casos 135 controles	Casos: 54% M, 45,7%F Controlles: 50,6% M 52,2%F	Amigos o familiares (85) Hospital (50)	Cavidad oral cáncer	90 83,3%	18 16,7%		100 92,6%	8 7,4%		OR Ile/Val + Val/Val versus Ile/Ile=2,5 (1,0-6,0)

Tabla 3. Resumen de los estudios incluidos que investigaron la asociación entre el CYP1A1 MspI polimorfismo y el cáncer oral y de faringe

Autor, año y país	Raza	Nº casos Nº controles	Sexo	Fuente de los controles	Localización del tumor	% CYP1A1 MspI				OR CYP1A1 IC 95% (global y estratificado por raza, hábito tabáquico y localización del tumor)		
						Casos		Controles				
						m1/m	m1/m2	m1/m1	m2/m2			
Cha et al (2007) Corea	Coreana	72 casos: 221 controles	Casos: 46M, 26F Controles: 113M, 108F	Colegio de Odontología	Oral (células pequeñas)	1	30	41.7%	2	17	ORm1/m2=0.76 (0.39-1.47)	
						20	27.8%	49	30.1%	97	ORm2/m2=3.17 (1.4-7.2)	
						9	10	30.5%	9	21	OR m2/m2 versus m1/m1 + m1/m2=3.78 (1.86-7.68)	
						8	Fumadores		4	4.8	ORm1/m2 para fumadores=0.48 (0.14-1.65)	
Anantharaman et al (2007) India	India	458 casos: 729 controles: 729	Casos: 323M, 135F Controles: 636M, 93F	Sujetos no emparentados de bancos de sangre o clínica dental	Oral (espinocelular)	No fumadores				ORm2/m2 para fumadores=2.81 (0.63-12.6)		
						9	12	11	40		76	ORm1/m2 para fumadores=0.7 (0.27-1.8)
						13	13	11	40		76	ORm2/m2 para fumadores=3.76 (1.27-11.08)
Kao S-Y et al (2002) ¹⁸² Taiwan	Asian	106 casos 146 controles	Casos: 92 M, 14F Controles: 98M, 48F	Hospital	Oral	205	195	46	331	51	ORm1/m2=0.91 (0.7-1.16)	
						46%	44%	10%	45.5%	47.5%	ORm2/m2=1.45 (0.94-2.24)	
						40	52	14	53	14	OR m2/m2 versus m1/m1 + m1/m2=1.52 (1.00-2.31)	
						37.7%	49%	13.2%	36.3%	54.1%	ORm1/m2= 0.87 (0.51-1.5)	
										9.6%	ORm2/m2= 1.32 (0.6-3.1)	

Continuación tabla 3.

Autor, año y país	Raza	N° casos	Sexo	Fuente de los controles	Localización del tumor	% CYP1A1 MspI						OR CYP1A1 IC 95% (global y estratificado por raza, hábito tabáquico y localización del tumor)			
						Casos			Controles						
						m1/m1	m1/m2	m2/m2	m1/m	m1/m	m2/m2				
Sato M et al (1999) ¹⁸⁵ Japón	Japonesa	142 casos 142 controles	Casos: 78M, 64F Controles: 78M, 64F	Hospital	Oral (espinocelular)	56	55	31	62	65	15	ORm1/m2= 0,94 (0,56-1,56) ORM2/m2= 2,29 (1,12-4,68) OR m2/m2 versus m1/m1 + m1/m2 para consumo bajo de cigarrillos= 4,3 (1,9-10,1) OR m2/m2 versus m1/m1 + m1/m2 para consumo medio de cigarrillos= 1,9 (0,5-7,4) OR m2/m2 versus m1/m1 + m1/m2 para consumo alto de cigarrillos= 0,2 (0,02-21,4)			
						39,5%	36,7%	21,8%	43,6%	45,8%	10,6%				
						Bajo consumo de cigarrillos (≤2.10 ⁵)							92	9	
						Consumo medio de cigarrillos (~2-4. 10 ⁵)							30	4	
Matthias C et al (1998) ¹⁵⁹ Alemania	Caucásica	126 casos 219 controles	Casos: 93M, 33F Controles: 174M, 44F	Hospital	Oral/ Faringe (espinocelular)	(104)	(17)	(1)	(184)	(19)	(2)	ORM1/m2 vs m1/m1= 1,58 (0,79-3,18)			
						85,2%	13,9%	0,8%	89,8%	9,3%	1%				
						Alto consumo de cigarrillos (≥4. 10 ⁵)							5	2	
						Consumo medio de cigarrillos (≈2-4. 10 ⁵)							30	4	
Tanimoto et al (1999) ¹⁶⁶ Japón	Japonesa	100 casos 100 controles	Casos: 60M, 40F Controles: 60M, 40F	Hospital	Oral (espinocelular)	(32)	(53)	(15)	62	(30)	(8)	ORM1/m2= 3,42 (1,84-6,35) ORM2/m2= 3,63 (1,39-9,47) ORM1/m2 para consumo bajo de cigarrillos= 3,83 (1,51-9,74) ORM2/m2 para consumo bajo de cigarrillos= 7 (1,8-27,4) ORM1/m2 para consumo bajo de cigarrillos= 3 (1,0-8,93) ORM2/m2 para consumo medio de cigarrillos= 2,86 (0,59-13,81) ORM1/m2 para consumo alto de cigarrillos= 5,42 (1,13-25,8)			
						32%	53%	15%	62%	30%	8%				
						Low cigarette consumption (< 300 pack/day.year)							28	19	4
						Middle cigarette consumption (300, <1000)							24	8	3
High cigarette consumption (> 1000)						10	26	10	28	19	4				
High cigarette consumption (> 1000)						14	14	5	24	8	3				
High cigarette consumption (> 1000)						8	13	0	10	3	1				

Tabla 4. Resumen de los estudios incluidos que investigaron la asociación entre los polimorfismos del exón 4 de la mEH y el cáncer de cavidad oral y faringe.

Author, year, country	Number casos Number controles	Cáncer site	% mEH exón 3 (His→Tyr)						% mEH exón 4 (His→Arg)						ORcrudo IC 95% (global y estratificado por raza, hábito tabáquico y localización del tumor)
			Casos			Controles			Casos			Controles			
			T/T	H/T	H/H	T/T	H/T	H/H	H/A	A/A	H/H	H/A	A/A		
Wenghoefer et al (2002) Alemania ¹⁵⁴	280 casos 289 controles	Cabeza y cuello	142 50,7%	112 40%	26 9,3%	136 47,1%	128 44,3%	25 8,6%	177 63,2%	91 32,5%	12 4,3%	174 60,2%	106 36,7%	9 3,1%	OR exón 3 Tyr/His versus Tyr/Tyr=0,83 (0,59-1,18) OR exón 3 His/His versus Tyr/Tyr=0,99 (0,55-1,8) OR exón 4 His/Arg versus His/His=0,84 (0,59-1,2) OR exón 4 Arg/Arg versus His/His=1,31 (0,54-3,19) OR actividad media= 1,26 (0,87-1,83) OR actividad alta= 1,04 (0,66-1,65)
			Fumadores												
			88 50,9%	67 38,7%	18 10,4%	79 46,7%	75 44,4%	15 8,9%	112 64,7%	55 31,8%	6 3,5%	96 56,8%	68 40,2%	5 3%	OR exón 3 Tyr/His versus Tyr/Tyr=0,8 (0,59-1,2) OR exón 3 His/His versus Tyr/Tyr=1,08 (0,51-2,26) OR exón 4 His/Arg versus His/His=0,84 (0,59-1,2) OR exón 4 Arg/Arg versus His/His=1,31 (0,54-3,19) OR actividad media= 1,23 (0,76-1,98) OR actividad alta= 0,91 (0,51-1,65)

Anexos

Jourenkova-Mironova (2000) ¹⁵³	121 casos 172 controles	Cavidad oral/ faringe	66 54,5	32 26,5	23 19	64 37,2%	77 44,8%	31 18%	80 66,1%	38 31,4%	3 2,5%	121 70,3%	49 28,5%	2 1,2%	OR exón 3 Tyr/His versus Tyr/Tyr=0,4 (0,2-0,7) OR exón 3 His/His versus Tyr/Tyr=0,8 (0,4-1,8) OR exón 4 His/Arg o Arg/Arg versus His/His=1,1 (0,6-2,0) OR actividad media ¹ = 1,8 (1,0-3,3) OR actividad alta ¹ = 2,1 (1,0- 4,5)
---	-------------------------------	-----------------------------	------------	------------	----------	-------------	-------------	-----------	-------------	-------------	-----------	--------------	-------------	-----------	--

¹Actividad baja (genotipos 113HH y 139 HH o 113HH y 139 HA o 113 TH y 139 HH), actividad media (113 TT 139 HH o 113 TH 139 HA); actividad alta (113 TT 139 HA o 113 TT 139 AA o 113 TA 139 AA)

Tabla 5. Lista de artículos excluidos del meta-análisis

Artículo excluido	Motivo de exclusión
Gaudet MM et al (2004) ²³⁶	Pacientes incluidos en el estudio de Olsham et al (2000)
Konig-Greger D et al (2004) ²³⁷	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe
Evans AJ (2004) ²³⁸	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe.
Park JY et al (2003) ²¹⁸	Incluye laringe. No proporciona datos para calcular la OR del cáncer de orofaringe.
Gronau S et al (2003) ¹⁶²	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe.
Amador AG et al (2002) ²²¹	Sólo proporciona porcentajes
Ko Y et al (2001) ²³⁹	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe.
Cabelguenne A et al (2001) ²⁴⁰	Presenta la OR ajustada pero no presenta datos para calcular la OR cruda.
Olshan AF et al (2000) ²⁴¹	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe.
McWilliams JE et al (2000) ²⁴²	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe.
Losan AF et al (2000)	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe.
Park et al (2000) ²⁴³	Incluye tumores de laringe
Cheng L et al (1999) ²⁴⁴	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe.
González MV et al (1998) ²⁴⁵	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe.
Matthias et al (1998) ²⁴⁶	No presenta datos de la GSTM1 (GSTP1)
Worrall SF et al (1998) ²⁴⁷	No presenta datos de la GSTM1
Edmund L (1998) ²⁴⁸	Tumores de nasofaringe
Oude Ophuis et al (1997) ²⁴⁹	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe.
Mulder et al (1995) ²⁵⁰	Sólo datos de actividad (GSTM1)

Artículo excluido	Motivo de exclusión
Trizna Z et al (1995) ²⁵¹	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe.
Boccia et al (2007)	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe.
Peters ES et al (2006)	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe.
Biselli et al (2006)	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe.
Goloni-Bertollo (2006)	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe.
Capoluongo et al (2007)	Cáncer de cabeza y cuello. No existen datos para poder calcular la OR del cáncer oral/faringe.

ANEXO II. FORMULARIO DE RECOGIDA DE DATOS

ESTUDIO COF

1. Hospital _____
2. Servicio _____

Fecha: //

Caso n°

Control n°

DATOS DE FILIACION:

1ª Apel.: _____ 2ª Apel.: _____ Nom. _____

Teléfono: /

3. Sexo: _____
4. Edad: _____
5. Fecha de nacimiento: _____ //
6. Estado civil: 1) S 2) Cas 3) V 4) Sep/Div 5) Relig _____
7. N° de hijos: _____
8. N° miembros familia: _____

RESIDENCIA:

9. Parroquia: _____
10. Lugar: _____
11. Municipio: _____
12. Provincia: _____
13. Años de permanencia: _____
14. Anteriormente vivió en: _____ Años:
_____ Años:

ACTIVIDAD LABORAL:

15. Ocupación principal: _____
16. Lugar de trabajo: _____
17. Sector: _____
18. Tiempo en el mismo: _____ /
19. Actividad física: 1) Ligera 2) Moderada 3) Fuerte _____
20. Ocupación secundaria: _____
21. Lugar de trabajo: _____
22. Sector: _____
23. Tiempo en el mismo: _____
24. Actividad física: 1) Ligera 2) Moderada 3) Fuerte _____

Exposiciones Especiales:

Prod. Químicos:

25. ¿Cuál? _____
26. Duración de la exposición en años _____

27. ¿Cuál? _____
 28. Duración de la exposición en años _____
Disolventes:
 29. ¿Cuál? _____
 30. Duración de la exposición en años _____

Abonos:

31. ¿Cuál? _____
 32. Duración de la exposición en años _____
 33. Exposición al sol: 1) Leve ; 2) Moderada ; 3) Intensa
 34. Duración aproximada de la exposición en años _____

Otros trabajos desempeñados en los últimos años:

35. _____
 36. Duración: _____ /
 37. _____
 38. Duración: _____ /

NIVEL EDUCATIVO:

39. Estudios: 1) Sin est. 2) Prim 3) Secund 4) Univ
 40. Años de escolarización: _____
 41. Titulación: _____

NIVEL ECONOMICO:

42. Número de personas laboralmente activas: _____
 43. Ingresos económicos de la unidad familiar: _____

Mensuales

Anuales

01-Menos de 10.000	14-Menos de 140.000
02-De 10.001 a 15.000	15-De 140.001 a 210.000
03-De 15001 a 20.000	16-De 210.001 a 280.000
04-De 20.001 a 30.000	17-De 280.001 a 420.000
05-De 30.001 a 40.000	18-De 420.001 a 560.000
06-De 40.001 a 50.000	19-De 560.001 a 700.000
07-De 50.001 a 60.000	20-De 700.001 a 840.000
08-De 60.001 a 80.000	21-De 840.001 a 1.120.000
09-De 80.001 a 100.000	22-De 1.120.001--1.400.000
10-De 100.001 a 120.000	23-De 1.400.001--1.680.000
11-De 120.001 a 150.000	24-De 1.680.001--2.100.000
12-De 150.001 a 200.000	25-De 2.100.001--2.800.000
13-Más de 200.000	26-Más de 2.800.000

CARACTERISTICAS DE LA VIVIENDA:

44. Vivienda: 1) En propiedad 2) En alquiler
 45. N° habitaciones: _____
 46. N° cuartos de baño: _____

47. Superficie aproximada en m²:
48. Nº de ventanas
49. Agua corriente: 1) Si 2) No
50. Suministro: 1) Traída municipal o comunal 2) Pozo propio
51. Corriente eléctrica: 1) Si 2) No
52. Consumo en Kw:
53. Consumo en pesetas (Ultimo recibo):
54. Cocina: 1) Gas 2) Eléctrica 3) Otras
55. Lavadora: 1) Si 2) No
56. Lavavajillas: 1) Si 2) No
57. Frigorífico: 1) Si 2) No
58. Televisión: 1) Si 2) No
59. Video: 1) Si 2) No
60. Teléfono: 1) Si 2) No
61. Automóvil: 1) Si 2) No
62. Calefacción Central:
- 1-Gas 2-Eléctrica 3-Radiación 4-Leña

ANTECEDENTES FAMILIARES:

63. ¿Existe algún antecedente de consanguinidad en las generaciones anteriores?:
- 1) Padres 2) Abuelos 3) Bisabuelos 4) No
64. ¿Cuál?: _____
65. ¿Algún familiar consanguíneo ha padecido algún tipo de neoplasia?
- 1) Si 2) No
66. ¿Quién? _____
- 1) padres 2) hermanos 3) abuelos 4) tíos
5) sobrinos 6) primos 7) otros
67. ¿Recuerda el tipo de tumor? _____
68. ¿Quién? _____
69. ¿Recuerda el tipo de tumor? _____

ANTECEDENTES PERSONALES:

70. Hubo algún problema gestacional u obstétrico en su nacimiento? 1) Si 2) No
71. ¿Ha padecido alguna enfermedad importante? 1) Sí 2) No
72. Si sí, ¿cuál?: _____
73. Si sí, ¿cuándo?: _____
74. ¿Ha sufrido de catarros repetidos? 1) Sí 2) No
75. ¿Ha sufrido de la garganta con frecuencia?: 1) Sí 2) No
76. ¿Ha tomado algún tipo de medicación en la mayoría de esas ocasiones?: 1) Sí 2) No
77. ¿Recuerda las formas más frecuentes?:
- 1) Inhalada 2) Tópica bucal 3) General (Oral o parenteral) 4) Otras _____
78. ¿Ha sido sometido a alguna intervención quirúrgica?:
- 1) Sí 2) No _____
79. ¿Cuál?: _____

80. ¿Cuándo?: _____
81. ¿Fue irradiado alguna vez por causa distinta al actual padecimiento? 1) Sí 2) No
82. ¿Por qué?: _____
83. ¿Cuándo?: _____
84. ¿Durante cuánto tiempo?: _____
85. ¿Padece de hipertensión arterial?: 1) Sí 2) No
86. Tensión arterial sistólica actual
87. Tensión arterial diastólica actual
88. Peso actual (Kg)
89. Talla en cms.
90. ¿Padece diabetes?: 1) Sí 2) No
91. ¿O alguna otra enfermedad endocrina? 1) Sí 2) No
92. ¿Padece alguna enfermedad cardíaca? 1) Sí 2) No
93. ¿Padece alguna enfermedad broncopulmonar? 1) Sí 2) No
94. Padece o padeció algún proceso vírico por Citomegalovirus? _____ 1) Sí 2) No
95. ¿Padece o padeció algún proceso vírico por Herpes virus (VHS)? _____ 1) Sí 2) No
96. ¿Padece o padeció algún proceso por virus de Epstein-Barr (EBV) _____ 1) Sí 2) No
97. ¿Padece o padeció algún proceso por virus del Papiloma humano (HPV)? _____ 1) Sí 2) No
98. ¿Padeció o padece alguna enfermedad urológica? 1) Sí 2) No
99. Si sí, ¿cuál?.....

¿Ha utilizado Vd. algún medicamento a lo largo de su vida durante más de 6 meses? 1) Sí 2) No

Si sí,

101. ¿Cuál? _____

102. ¿Cuál? _____

103. ¿Cuál? _____

105. Frecuencia semanal de aseo personal (baño/ducha) 1) Sí 2) No

107. Lavado de boca:

1) 3v/d 2) 1v/d 3) 3-5v/sem 4) 1-2v/sem

5) Esporádicamente 6) Nunca _____

ACTIVIDAD SEXUAL

108. Edad de inicio _____

TABACO:

112. ¿Es fumador?: 1) No 2) Esporádico 3) Habitual _____
113. ¿Fué fumador? 1) Nunca 2) Esporádico 3) Habitual _____
114. ¿Desde qué edad? _____ /
115. ¿Hasta qué edad? _____ /
116. Tipo de consumo: 1) Cigarrillo; 2) Cigarro; 3) Pipa; 4) Otros _____
117. Tipo de Tabaco: 1) Rubio; 2) Negro; 3) Indistinto _____
118. Marca habitual: 1) _____ 2) _____ 3) _____

Intensidad del hábito:

119. N° de cigarrillos/día _____
120. N° de cigarros/día _____
121. N° de pipas/día _____

Características del hábito:

122. ¿Inhala/aba el Humo? 1) Si 2) No _____
123. ¿Traga/aba el Humo? 1) Si 2) No _____
124. ¿Consume/ía el Cigarrillo hasta su filtro? _____
1) Si 2) No
125. ¿Usa boquilla? 1) Si 2) No _____
126. ¿Usa filtro? 1) Si 2) No _____
127. ¿Intentó dejar de fumar? 1) Si 2) No _____
128. ¿Cuántas veces? _____
129. ¿Durante cuanto tiempo? (meses/años) _____
130. ¿Por qué motivo? _____
131. ¿Le aconsejó su médico dejar de fumar? 1) Si 2) No _____
132. ¿Convive con fumadores? 1) Si 2) No _____

¿Quiénes fuman en su casa?

133. Esposo/a N° de cigarrillos/día _____
134. Padre N° de cigarrillos/día _____
135. Madre N° de cigarrillos/día _____
136. Hijos ¿Cuántos? _____ *N° de cigarrillos/día _____
137. Otros ¿Cuántos? _____ *N° de cigarrillos/día _____

AMBIENTE LABORAL:

138. Dimensiones del local de trabajo(m):

Ancho _____ Largo _____ Alto _____

Superficie _____ m²

Volumen(m³) _____

139. ¿Cuántas Ventanas? _____
140. ¿Se abren regularmente? 1) Si 2) No _____
141. ¿De que tamaño? (m²) _____
142. ¿Hay algún otro sistema de ventilación? 1) Si 2) No _____
143. ¿Cuál? _____
144. ¿Cuántas personas ocupan la sala o local de trabajo? _____
145. ¿De ellas?, cuántas fuman? _____
146. ¿Qué n° de cigarrillos/persona/día? _____

BEBIDAS:

147. ¿Consume agua en las comidas? 1) Si 2) No
148. ¿De pozo? 1) Si 2) No
149. ¿De manantial? 1) Si 2) No
150. ¿De traída general o comunal? 1) Si 2) No
151. ¿La clora usted alguna vez? 1) Si 2) No
152. ¿Usa agua mineral? 1) Si 2) No
153. Con gas 1) Si 2) No
154. Sin gas 1) Si 2) No
155. Marca Comercial _____
156. Desde _____ (consignar años) _____

Frecuencia

157. ¿Come con vino?
 1) Todos los días 2) 2-3 veces/semana 3) Nunca
158. ¿De propia cosecha? 1) Si 2) No
159. ¿De qué tipo? 1) Blanco 2) Tinto 3) Rosado
160. ¿Cuántos vasos bebe al día?:
 1) Ninguno 2) 1-2 3) 3-4 4) 5-6 5) 7-8
 6) 8-10 7) >10
- Medias Botellas _____ Jarras _____ Litros _____ cm³

161. ¿En qué momento principalmente?
 1) Antes del medio día _____
 2) Antes de comer _____
 3) Sólo comidas _____
 4) Después del trabajo _____
 5) Antes de cenar _____
 6) Con la cena _____

¿Qué licores bebe?.....(Nºcopas/semana).....cm³

162. Brandy
163. Jerez
164. Güisqui
165. Ron oscuro
166. Ron blanco
167. Aguardiente
168. Ginebra
169. Otros licores blancos _____
170. _____

171. ¿Preferentemente a la hora de?:
 1) Desayuno _____
 2) Comida _____
 3) Cena _____
 4) Al salir a trabajar _____
 5) Antes de comer _____
 6) Al salir del trabajo _____
 7) Antes de cenar _____
 8) Después de cenar _____
 Totalcc

172. ¿Qué bebió el último día laborable?
 1) Antes del desayuno _____
 2) Con el desayuno _____
 3) Durante la mañana _____
 4) Con la comida _____
 5) En la sobremesa _____
 6) Antes de cenar _____
 7) Con la cena _____
 8) Antes de acostarse _____
 Total.....cc□□□□

173. ¿Qué bebió el último sábado?
 1) Antes del desayuno _____
 2) Con el desayuno _____
 3) Durante la mañana _____
 4) Con la comida _____
 5) En la sobremesa _____
 6) Antes de cenar _____
 7) Con la cena _____
 8) Antes de acostarse _____
 Total.....cc□□□□

174. ¿Qué bebió el último Domingo?
 1) Antes del desayuno _____
 2) Con el desayuno _____
 3) Durante la mañana _____
 4) Con la comida _____
 5) En la sobremesa _____
 6) Antes de cenar _____
 7) Con la cena _____
 8) Antes de acostarse _____
 Total.....cc□□□□

¿Otras bebidas?

	ESPORADICAS	Nº/DIA	Nº/SEM	cc/sem
175.CAFE	_____	_____	_____	□□□□
176.MANZANILLA	_____	_____	_____	□□□□
177.TE	_____	_____	_____	□□□□
178.TILA	_____	_____	_____	□□□□
179.OTRAS	_____	_____	_____	□□□□
180. _____	_____	_____	_____	□□□□

181. ¿Cómo prefiere tomar los alimentos y bebidas?
 1) Muy calientes 2) Calientes
 3) Tibios 4) Fríos □

182. ¿Usa hielo con las bebidas frecuentemente?
 1) Si 2) No □

ENQUISA SOBOR DA DIETA

1. ¿REALIZA NA ACTUALIDADE ALGUN REXIME? 1.SI 2.NON | |
 MOTIVO | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

2.(Se proceder) ANOS QUE LEVA CO REXIME
 1 - 1 a 5
 2 - 6 a 10
 3 - Máis de 10 | |

3.¿TOMA SUPLEMENTOS VITAMINICOS?
 1. SI 2. NON | |

4.¿CON QUE FRECUENCIA COME (Comida ou Cea) FORA DA CASA?
 1 - Nunca ou menos de 1 vez o mes
 2 - 1 a 3 veces o mes
 3 - 1 vez por semana
 4 - 2 a 4 veces por semana
 5 - Case diariamente | |

5. ¿CON QUE TIPO DE ACEITE COCIÑA HABITUALMENTE?
 1.OLIVA 2.XIRASOL 3.SEMILLAS 4.GRASA 5.OUTROS | |

TIPO DE COMIDA	CANTIDADE			F R E C U E N C I A								
	MEDIDA SERVIDA	TAMANO P. M. G.	Nunca -1/mes	1 mes	2/3 mes	1 semana	2 semana	3/4 semana	5/6 semana	1 día	2/+2 día	
	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	9

6. FRUTOS E ZUMOS.
 Mazá | 1 U. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 Pera | " | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 Laranxa | " | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 Plátano | " | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 Pexego, pavia, melocotón, peladillo | " | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 Melocotón en almíbar | 1 Mt | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 Ameixas, claudias, fatóns | 1 U. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 Outras frutas | " | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 Zumo de laranxa | 1 Va | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 Aceitunas | " | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

TIPO DE COMIDA	CANTIDADE			F R E C U E N C I A								
	MEDIDA	TAMANO	Nunca	1	2/3	1	2	3/4	5/6	1	2/+2	
	SERVIDA	P. N. G.	-1/mes	mes	mes	semana	semana	semana	semana	dia	dia	
	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	9

7. VERDURAS E HORTALIZAS

Repolo	1 Rc											
Grelos	1 PL											
Leituga	2 Fo											
Tomate	1 U.											
Zenouras	1 U.											
Xudias tenras	1 PL											
Chícharos frescos	2 Cu											
Chícharos conxelados	"											
Patacas cocida	1 U.											
Outras												

8. CARNES, CAZA E EMBUTIDOS

Bacon	2 La											
Porco chuleta	1 U.											
Chourizo	1 U.											
Filete porco	"											
Outra carne de porco	"											
Bistec de vitela	"											
Chuleta de vitela	"											
Polo	1/4											
Salchicha Frankfurt	1 U.											
Salchicha fresca (país)	"											
Outros												

		CANTIDADE			F R E C U E N C I A								
FRESCO XEITO													
TIPO DE COMIDA	MEDIDA	TAMAÑO	Nunca	1	2/3	1	2	3/4	5/6	1	2/+2		
Fre	C A G	SERVIDA											
Con: F P O:		P.	M.	G.	-1/mes	mes	mes	semana	semana	semana	semana	dia	dia
1	2	123456	1	2	3	4	5	6	7	8	9		

9. PESCADOS, MARISCOS E CRUST.

Merluza	1 To												
Sardiña	" "												
Sardiña en lata	1 Lt												
Bonito en lata	" "												
Bacallau salgado, remo.	1 PL												
Calamares	1 PL												
Marisco tipo:	1 U.												
Mexilón	6 U.												
Abadexo	1 To												
Rape	" "												
Xurelo	1 U.												
Xouvas	6 U.												
Fanecas	1 U.												
Outros pescados													
10. OVOS													

11. CEREAIS E DERIVADOS

Arroz	2 Cu												
Pan tipo:	1 Re												
Pasta	1 PL												
Sopa	1 PF												
Outros													

CANTIDADE		F R E C U E N C I A											
FRESCO	XEITO	MEDIDA		TAMAÑO	Nunca	1	2/3	1	2	3/4	5/6	1	2/+2
TIPO DE COMIDA	Fre	C	A	G	SERVIDA								
Con: F P O:		P.	N.	G.	-1/mes	mes	mes	semana	semana	semana	semana	día	día
1	2	123456	1	2	3	4	5	6	7	8	9		

12. PASTELARIA

Donut,	1 U.												
croissant													
Galletas	6 U.												
tipo Maria													
Madalenas	2 U.												
Repostaria	1 u.												
Outros													

13. LACTEOS E DERIVADOS

Leite de vaca fresco	1 Tn												
Leite de vaca "bolsa"	"												
Leite descremada	"												
Queixo tipo fábrica	Rc												
Iogurte	1 U.												
Outros													

14. PRECOCIÑADOS

Pizza	1 PL												
Croquetas	"												
Outros													

15. AZUCARES E DOCES

Azúcar	1 Cu												
Caramelos	1 U.												
Chocolate	1 Ps												
Mel	"												
Outros													

**ANEXO III. ARTÍCULO DE REVISIÓN SISTEMÁTICA-META Y POOLED
ANÁLISIS**

Meta-analysis and pooled analysis of GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms and oral and pharyngeal cancers: a HuGE-GSEC review

Leonor Varela-Lema, BSc¹, Emanuela Taioli, MD, PhD², Alberto Ruano-Ravina, PhD¹, Juan M. Barros-Dios, MD, PhD¹, Devasena Anantharaman, PhD³, Simone Benhamou, PhD⁴, Stefania Boccia, PhD⁵, Rajani A. Bhisey, PhD⁶, Gabriella Cadoni, PhD⁵, Ettore Capoluongo, PhD⁵, Chien-Jen Chen, ScD⁷, William D. Foulkes, PhD⁸, Eny Maria Goloni-Bertollo, PhD⁹, Ana Hatagima, PhD¹⁰, Richard B. Hayes, DDS, PhD¹¹, Takahiko Kato, MD, PhD¹², Sergio Koifman, PhD¹³, Phillip Lazarus, PhD¹⁴, Johannes J. Manni, MD, PhD¹⁵, Manoj Mahimkar, PhD³, Shunji Morita, MD, PhD¹⁶, Jong Park, PhD¹⁷, Kwang-Kyun Park, DDS, PhD¹⁸, Erika Cristina Pavarino Bertelli, PhD⁹, Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, PhD¹⁹, Bidyut Roy, PhD²⁰, Margaret R. Spitz, MD, MPH²¹, Richard C. Strange, PhD²², Qingyi Wei, MD, PhD²¹, and Camille C. Ragin, PhD, MPH²

The association of *GSTM1* and *CYP1A1* polymorphisms and oral and pharyngeal cancers was assessed through a meta-analysis of published case-control studies and a pooled analysis of both published and unpublished case-control studies from the Genetic Susceptibility to Environmental Carcinogens database (<http://www.upci.upmc.edu/research/ccps/ccontrol/index.html>). Thirty publications used in the meta-analysis included a total of 7783 subjects (3177 cases and 4606 controls); 21 datasets, 9397 subjects (3130 cases and 6267 controls) were included in the pooled analysis. The *GSTM1* deletion was 2-fold more likely to occur in African American and African cases than controls (odds ratio: 1.7, 95% confidence interval: 0.9–3.3), although this was not observed among whites (odds ratio: 1.0, 95% confidence interval: 0.9–1.1). The meta-analysis and pooled analysis showed a significant association between oral and pharyngeal cancer and the *CYP1A1* MspI homozygous variant (meta-OR_{m2/m2}: 1.9, 95% confidence interval: 1.4–2.7; Pooled OR_{m2/m2}: 2.0, 95% confidence interval: 1.3–3.1; OR_{m1m2 or [inf]m2m2}: 1.3, 95% confidence interval: 1.1–1.6). The association was present for the *CYP1A1* (exon 7) polymorphism (OR_{Val/Val}: 2.2, 95% confidence interval: 1.1–4.5) in ever smokers. A joint effect was observed for *GSTM1* homozygous deletion and the *CYP1A1* m1m2 variant on cancer risk. Our findings suggest that tobacco use and genetic factors play a significant role in oral and pharyngeal cancer. **Genet Med 2008;10(6):369–384.**

Key Words: *GSTM1*, *CYP1A1*, oral and pharyngeal cancers, epidemiology, meta-analysis and pooled analysis

Glutathione S-transferases

The Glutathione S-transferases (GSTs) comprise a family of phase II detoxifying enzymes that catalyze a large number of

reactions taking place between the cytosolic glutathione and compounds containing an electrophilic center.¹ These enzymes are involved in the elimination of xenobiotics and endogenous products of oxidative stress formed as a result of aerobic metabolism, exposure to ionizing radiation or any other process that causes cellular damage. Substrates for GSTs include acetaldehyde and several polyaromatic hydrocarbons (PAHs) found in tobacco smoke. The main steps for GST catalysis includes the formation of a complex with the cytosolic glutathione and the ionization of the sulfhydryl group of this enzyme bound to glutathione to yield a highly reactive thiolate anion through hydrogen bonding with the adjacent hydroxyl

¹Department of Preventive Medicine and Public Health, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain; ²University of Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, Pennsylvania; ³Cancer Research Institute, Advance Center for Treatment, Research and Education in Cancer (ACTREC), Tata Memorial Centre, India; ⁴NSERM and Evry University, Evry, France; ⁵Departments of Genetic Epidemiology and Molecular Biology Unit-Institute of Hygiene, Otorhinolaryngology, and Biochemistry-Laboratory of Molecular Biology, Catholic University, Rome, Italy; ⁶Cancer Research Institute, Mumbai, India; ⁷National Taiwan University, Taipei, Taiwan; ⁸Montreal General Hospital, Quebec, Canada; ⁹Department of Molecular Biology, School of Medicine of São José do Rio Preto, Brazil; ¹⁰Genetics Department, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil; ¹¹Division of Cancer Epidemiology and Genetics, Occupational and Environmental Epidemiology Branch, NCI, Bethesda, Maryland; ¹²Department of Public Health, Kumamoto University, Kumamoto, Japan; ¹³Department of Epidemiology and Quantitative Methods in Health, National School of Public Health, Rio de Janeiro, Brazil; ¹⁴Departments of Pharmacology, and Health Evaluation Sciences, Penn State College of Medicine, Hershey, Pennsylvania; ¹⁵Department of Otorhinolaryngology, University Hospital Maastricht, Maastricht, Netherlands; ¹⁶Yao Municipal Hospital, Yao, Japan; ¹⁷Department of Interdisciplinary Oncology, H. Lee Moffitt Cancer Center, Tampa, Florida; ¹⁸Department of Oral Biology, Yonsei University of Dentistry, Seoul, Korea; ¹⁹Genetics Department, Federal University of Parana, Brazil; ²⁰Anthropology and Human Genetics Unit (AHGU), Indian Statistical Institute, Calcutta, India; ²¹Department of Epidemiology, Uni-

versity of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas; ²²Centre for Cell and Molecular Medicine, School of Medicine, Keele University, Staffordshire, England.

E. Taioli, MD, PhD, University of Pittsburgh Cancer Institute, 5150 Centre Avenue, Pittsburgh, PA 15232. E-mail: taiolien@upmc.edu.

Disclosure: The authors declare no conflict of interest.

Submitted for publication November 14, 2007.

Accepted for publication February 1, 2008.

DOI: 10.1097/GIM.0b013e3181770196

group. The enhancement of nucleophilicity activates the glutathione and it can react with various electrophilic substrates containing carbon, nitrogen, or sulfur atoms. The result of this conjugation leads to elimination of the carcinogens from the body.

Based on sequence similarities, human cytosolic GSTs have been grouped into at least four major gene families (alpha, mu, pi, and theta). The alpha class is located in chromosome 6p12, the mu class in chromosome 1p13, pi in chromosome 11, and theta in chromosome 22. Various isoenzymes have been identified for the alpha (A1–12), mu (M1–M5), pi (P1–P2), and theta class gene families (T1–T2). The *GSTM1*, M2, M3, T1, and P1 are expressed in a variety of tissues including the squamous epithelium of the oral cavity² and are involved in the detoxification of various polycyclic aromatic hydrocarbons, including benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide,³ one of the most important carcinogens found in tobacco smoke, by catalyzing the conversion of the reactive electrophiles to inactive, water soluble conjugates that can be easily excreted.⁴ The *GSTM1* isoenzyme together with the alcohol dehydrogenase is also involved in the oxidation of ethanol to acetaldehyde.⁵

Three alleles have been identified at the *GSTM1* locus: *GSTM1**0, *GSTM1**A, and *GSTM1**B. The *GSTM1**A and *GSTM1**B differ by a C→G substitution at base position 534.⁶ This C→G substitution results in a substitution of Lys→Asn at amino acid 172. These result in monodimers (*GSTM1A*-1A, *GSTM1B*-1B) or heterodimers (*GSTM1A*-1B), but in vitro studies suggest that their activities are similar.⁷ The *GSTM1**0, also called the null allele, is a huge deletion at *GSTM1* and homozygotes express no *GSTM1* protein activity.⁸ These subjects may potentially accumulate more DNA adducts and mutagen induced damage that may cause differences in susceptibility to tumorigenesis.⁹

Cytochrome P450s

The cytochrome P450 family (CYP) of heme monooxygenases comprise phase I enzymes that oxidate a wide variety of endogenous and exogenous compounds using atmospheric oxygen.¹⁰ Currently, more than 270 CYP gene families are known. Humans have 57 potentially functional P450 genes and 33 pseudogenes arranged into 18 families and 42 subfamilies.¹¹

The *CYP1A1* gene belongs to the CYP1 subfamily and encodes for the enzyme aryl hydrocarbon hydrolase, which is involved in the activation of PAHs and aromatic amines¹² and is expressed in oral tissue.¹³ Various studies show that *CYP1A1* catalyzes the initial metabolism of benzo[a]pyrene.^{4,14} The *CYP1A1* gene is located in chromosome 15, band 15q22–24¹⁵ and several important single nucleotide polymorphisms have been identified. The nomenclature of these polymorphisms is now standardized^{16,17} but different nomenclatures were used for several years.¹² The first allele presents a single base substitution of thymine by cytosine in a noncoding region of the gene at position 3801 that creates a MspI (*m1*) restriction site (*CYP1A1**2A). A single base substitution of adenine to guanine at position 2455 in the heme binding region of exon 7

induces an amino acid change in isoleucine to valine at codon 462 and is known as the *Ile/Val* or exon 7 polymorphism (*Ile*⁴⁶²*Val*) or *CYP1A1**2C.¹⁸ In whites, this polymorphism is in complete linkage disequilibrium with the *CYP1A1* MspI (*CYP1A1**2B).¹⁹ Another polymorphism in exon 7, a base substitution of cytosine by adenine at position 2453, leading to the *Thr*⁴⁶¹*Asn* polymorphism (*CYP1A1**4) has been described.²⁰ Some *CYP1A1* polymorphisms have been shown to increase microsomal catalytic activity for converting procarcinogens, including PAH and aromatic amines, but the results are inconsistent.^{12,21–23} It has been suggested that DNA damage may depend on the link of *CYP1A1* to other polymorphisms that can affect *CYP1A1* transcription levels, such as polymorphisms for promoter genes, Ah receptor genes, or other metabolic genes such as *GSTM1*.^{23,24}

Oral and pharyngeal cancers and risk factors

According to the International Classification of Diseases-10th revision (ICD-10) oral and pharyngeal tumors are defined as those cancers comprising the locations C00–C14. These cancers represent an important problem worldwide, with 484,628 new cases and 262,784 deaths estimated per year.²⁵ The highest incidence and prevalence rates are observed in Melanesia, Central Asia, and Western Europe, even though rates vary depending on the gender and cancer location.²⁵ In men, cancers of the oral cavity are eighth in terms of incidence worldwide and they are responsible for 3% of the cancers diagnosed in this gender. Pharyngeal tumors are also common in European and Central Asian countries but the incidence rates are lower.

Mortality rates are substantially lower than incidence rates, with 2.2 deaths per 100,000 people worldwide.²⁵ The highest values are recorded in several countries of Central and Eastern Europe and the lowest in Central America and Northern Europe. In Hungary, the mortality rate is as high as 21.2 per 100,000.

Risk factors for oral and pharyngeal cancers

Since 1988, tobacco and alcohol consumption have been recognized as independent risk factors for oral cancer. Epidemiologic studies performed in all continents have found an increased risk in smokers and a dose-response relationship with daily cigarettes and duration of habit.

An excessive consumption of alcoholic beverages has been associated with oral and pharyngeal cancer, with relative risks sometimes higher than those found for smokers.^{26–28} The risk associated with alcohol increases with consumption^{26,29–32}, duration, starting age and type of alcohol beverage.^{26,29,33,34} When joint consumption of alcohol and tobacco was investigated, the great majority of the literature suggests that the joint effect is multiplicative or, at least, greater than additive.^{26,35}

Human papillomavirus (HPV) is another possible key factor in the etiology of oral and pharyngeal cancers^{36–38}; two recent studies reported a high risk of oral and pharyngeal cancer associated with HPV16 and HPV18 (odds ratio [OR]: 61 and OR: 63).^{31,39}

Metabolic genes and risk of oral and pharyngeal cancers

CYP1A1 and GSTM1 are important enzymes in the metabolism of tobacco carcinogens, which involves a balance between the activation steps mediated by the cytochrome P450 system and the detoxification steps involving GSTM1 that catalyze the conversion of the reactive electrophiles to inactive, water soluble conjugates that can be easily removed.⁴

Previous systematic reviews, meta-analysis and pooled analysis, have reported a relationship between the *GSTM1* null genotype and the risk of head and neck cancer^{2,40–43} but the only report that stratified the analysis for cancer site⁴¹ found important differences in risk for oral and laryngeal tumors. No association was found for the *CYP1A1* (*Ile/val*) polymorphism in this last assessment. Because different patterns of GST and CYP1A1 enzyme expression have been shown in oral and pharyngeal epithelium in comparison with laryngeal epithelium,^{12,44} we conducted a pooled and meta-analysis to evaluate the relationship between these polymorphisms and oral and pharyngeal tumors, and we explored the combined effects of polymorphisms in these two genes along with their interaction with smoking.

METHODS

Selection criteria

The association of *GSTM1* and *CYP1A1* with oral and pharyngeal cancers was determined by meta-analysis of publications identified in a systematic review as well as by a pooled analysis using both published and unpublished data from the Genetic Susceptibility to Environmental Carcinogens (GSEC) database. A bibliographic search was carried out in the MEDLINE and EMBASE databases to identify studies on oral and pharyngeal cancers published up to October 17, 2007. The search strategy used was: (oral or buccal or mouth or “head and neck” or pharyngeal or pharynx or oropharyngeal) and (cancer or neoplasms or tumor* or tumour* or carcinoma* or carcinogenesis) and (“glutathione transferase” or “glutathione S transferase” or “glutathione S-transferase” or *GSTM1* or “cytochrome P450 enzyme system” or “cytochrome P450 *CYP1A1*” or *CYP1A1*). A manual review of the bibliographic references cited in the selected articles was undertaken to retrieve articles that might have been missed in the search. Articles were independently reviewed by two researchers and the inclusion/exclusion was made by consensus on the basis of pre-established selection criteria. The inclusion criteria were: (1) articles published in English, Spanish, Italian, or French, and (2) studies that assessed the association between the polymorphisms of the genes under study and oral and pharyngeal cancers. The exclusion criteria were: (1) studies that included only cases; (2) studies that assessed the risk of secondary tumors, recurrence, or response to treatment; (3) studies where patients were overlapped; and (4) studies that included nasopharyngeal cases. When several studies included the same population we included only the most updated one.

The meta-analysis included only those articles that provided results that allowed for the calculation of crude risks for oral

and/or pharyngeal tumors. Crude ORs were used to obtain comparable estimates across studies. For each study included the author, year of publication, country where the study was carried out, number, race, and gender of patients and controls, control source (hospital based or population based), tumor site, and matching of cases and controls were rigorously tabulated. The bibliographic search led to the identification of 56 original articles. Of these, five did not include data on the genes involved in this analysis,^{45–49} three did not provide the data that was needed to calculate the ORs for oral and pharyngeal sites,^{50–52} therefore were not further evaluated. Of the remaining 48 articles, 18 were excluded from the meta-analysis because they did not provide head and neck subsite specific data and subjects with laryngeal tumors were not distinguished from the oral/pharyngeal group.^{53–70} Thirty publications were used in the meta-analysis including a total of 7783 subjects (3177 cases and 4606 controls). They were all case-control studies. There were two studies with overlapping subjects but reported data separately for *GSTM1*⁷¹ and *CYP1A1*.⁷² Two other studies each reported separately data for *CYP1A1* MspI⁷³ and exon 7.⁷⁴ However, both publications reported overlapping data for *GSTM1*. Therefore, there were 26 studies with results on *GSTM1* deletion, 11 on *CYP1A1* *Ile/Val* polymorphism, 6 on *CYP1A1* MspI polymorphism. Only three studies assessed the combined *GSTM1/CYP1A1* MspI polymorphisms and one the *GSTM1/CYP1A1* exon 7 polymorphisms.

Data collection

The pooled analysis was performed using information from the GSEC database (http://www.upci.upmc.edu/research/ccps/ccontrol/g_intro.html).^{75,76} Briefly, the GSEC study is a collection of data from both published and unpublished case-control studies of metabolic gene polymorphisms and cancer. All of the investigators of the published studies for which the GSEC database did not contain their data were contacted and invited to provide their data for this specific pooled analysis. The investigators for the other studies that were excluded because of insufficient head and neck subsite specific data were also contacted. Of the 30 studies in the meta-analysis, data for 14 studies were obtained for *GSTM1* and/or *CYP1A1*.^{5,44,71,72,77–86} However, two of these studies reported *CYP1A1* and *GSTM1* data separately for the same subjects and were counted as a single study.^{71,72} Among these 13 published studies, three provided unpublished data for *CYP1A1* polymorphisms for the same subjects. The GSEC database also had one study with unpublished data for *GSTM1* deletion (Foulkes et al., unpublished data) and another study with unpublished data for both *GSTM1* and *CYP1A1* (Ruano-Ravina et al., unpublished data). There were also seven additional published studies that were previously excluded from the meta-analysis, which were now included in the pooled analysis because the raw data allowed us to define specific head and neck subsites.^{57,59,65,66,69,70,87} Although there were 22 studies available, 2 of them reported overlapping data for *GSTM1*. Therefore, the pooled analysis included 21 datasets, with 9397 subjects (3130 cases and 6267 controls).

Statistical analysis

All statistical analyses were carried out using STATA SE (version 10) software (StataCorp LP, College Station, TX). For the meta-analysis, the frequency of cases and controls was extracted from each publication and study-specific crude ORs were calculated along with their 95% confidence intervals (CIs). The Q statistics were used to test for heterogeneity among the studies for *GSTM1* deletion and *CYP1A1* polymorphisms. When heterogeneity was observed a random-effects model was used to calculate the summary ORs for the combined studies, when heterogeneity was not observed a fixed-effects model was used. Publication bias was determined by performing the Eggers test. To explore the between study heterogeneity, sensitivity analyses were performed, to identify the influence of the individual studies on the combined OR. When a study was identified, the analysis was repeated excluding such study to assess if homogeneity between the remaining studies was reached.

In the pooled analysis for each gene, crude ORs for their overall association with oral/pharyngeal cancer were calculated. ORs adjusted for potential confounders were calculated using multivariable logistic regression models. Crude and adjusted ORs were also calculated for each gene, stratifying by control source (healthy versus hospital), smoking status, race and tumors site (oral cavity versus pharynx). The Mantel-Haenszel test was used to assess differences between stratum-specific ORs.

From south east/south Asia publications, three of the five available studies included data on consumption of other tobacco or had tobacco chewing habits; these patients were included in the pooled analysis, but the data on other tobacco was not analyzed for the present publication. Smoking status was defined as never and ex, current, or ever smokers. All smoking data were recoded into a standardized variable: ever/never smoking. Patients were classified as never smokers if they smoked < 100 cigarettes in their lifetime, and ever smokers if defined by the individual studies either as ex, current, or ever (current and ex) smokers.

RESULTS

Of the 30 studies included in the meta-analysis, 17 were carried out in Asian countries,^{73,74,77,78,80,84,86–96} seven in American countries,^{71,72,79,83,85,97,98} and six in Europe.^{5,44,81,82,99,100} Hospital patients were used as controls in 16 studies.^{5,44,71,72,78,81–85,88,92,93,97–99} The number of cases in the studies included in the meta-analysis for *GSTM1* deletion varied from 21 to 451 patients. All studies undertaken in Europe included <150 cases, with two of these having <50 cases.^{5,82} For the *CYP1A1* analysis, the case numbers ranged from 45 to 446 subjects.

Population frequencies

The frequency of the *GSTM1* null in the control group ranged from 24% to 58.9%, with considerable variation depending on the area the study was carried out. In Asia, large

differences could be observed between countries. The frequencies in India varied from 24% to 37%,^{78,80,84,90,96} in Japan from 39.8% to 48.7%^{73,77,91–94}, although the only study from Taiwan observed a frequency of 57.7%.⁹⁵ In South America these values ranged from 38.2% to 48.7%^{71,79,97,98} and in Europe and United States from 51% to 54.8%.^{5,44,81–83,99,100}

For the *CYP1A1* exon 7 polymorphism, large geographical heterogeneity could be observed. The frequency of the homozygote genotype for the variant allele in the controls was absent or very low in Europe (0–6%) whereas the heterozygous genotype was very rare (6–9.3%).^{44,100} In Asia, the heterozygous genotype was present in 32.4–53.4% of the control subjects.^{74,87,88,93} In Brazil and Puerto Rico this polymorphism was found in 19–30% of the subjects.^{72,79,85} The combined frequency of the homozygous and heterozygous genotype of the variant allele for the single study in the United States was 7.4%.⁸³ The *CYP1A1* MspI heterozygous variant allele (*m1/m2*) was present in 30–59.5% of the Asian control population.^{73,84,86,88,92} The only European study that assessed this polymorphism reported a frequency of 9.3% for the variant allele.⁴⁴ The homozygous allele was very rare in all populations (1–10.6%).

Meta-analysis

The overall meta-OR for *GSTM1* null was not reported because of the large heterogeneity between studies (Q test P value < 0.001; data not shown). We performed a sensitivity analysis and identified one study that appeared to influence the overall meta-OR,⁸⁰ however, heterogeneity was still observed after exclusion of this study. In an effort to further explore the observed heterogeneity, we stratified the studies by race. The study-specific and meta-ORs for *GSTM1* are shown for whites, Asians, and others (i.e., studies that did not specify ethnicity or included more than one ethnic group) in Table 1. There was no increased risk of oral and pharyngeal cancer with the *GSTM1* deletion among whites (OR: 1.1, 95% CI: 0.9–1.3), and no evidence of publication bias (Eggers test P value = 0.19). For Asians and all other ethnic groups and studies with mixed populations, there was still large heterogeneity between studies (Q test, P value < 0.001); therefore, the overall meta-OR was not reported although there was no evidence of publication bias (Eggers test P value = 0.77 for Asian studies and 0.80 for other studies). Sensitivity analysis of the Asian studies identified a data set that seemed to influence the meta-ORs. When this study was excluded, homogeneity was observed among the remaining studies (Q test, P value = 0.186). There was a statistically significant increase in the risk of oral and pharyngeal cancer with the *GSTM1* deletion (OR: 1.6, 95% CI: 1.3–2.0). There was no evidence of publication bias (Eggers test P value = 0.819). For the remaining studies (i.e., studies that did not specify ethnicity or included more than one ethnic group), heterogeneity was still observed even after exclusion of the outlier,⁸⁰ (Q test, P value 0.005); this was likely due to the mixed populations grouped in this category.

The 15 studies with data reported on *CYP1A1* MspI and/or exon7 (*Ile/Val*) are summarized in Table 2. There were 11 stud-

GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms and oral and pharyngeal cancers

Table 1
Description of studies included in the meta-analysis for *GSTM1*

Author	Control source	Country	Tumor site	Matching	Cases	Controls	OR (95%CI) <i>GSTM1</i> deleted vs. present
Whites							
Deakin et al. ^{82d}	Hospital	UK	Oral cavity		40	577	1.0 (0.5–1.9)
Coutelle et al. ^{5a}	Alcoholic clinic	France	Oropharynx	Alcohol	21	37	1.7 (0.6–5.1)
Park et al. ^{83a}	Healthy and hospital	USA	Oral cavity		109	109	0.9 (0.5–1.5)
Matthias et al. ^{48a}	Hospital	Germany	Oral cavity and pharynx		122	178	1.2 (0.8–1.9)
Jourenkova-Mironova et al. ^{81a}	Hospital	France	Oral cavity and pharynx	Smoking	121	172	0.8 (0.5–1.3)
Hahn et al. ¹⁰⁰	Healthy	Germany	Oral cavity	Ethnicity	94	92	1.3 (0.7–2.3)
Gronau et al. ⁶¹	Hospital	Germany	Oral cavity	Smoking and alcohol	73	129	1.2 (0.7–2.2)
META					580	1294	1.1 (0.9–1.3) ^b
<i>P</i> , <i>Q</i> test							0.796
<i>P</i> , Eggers test							0.194
Asians							
Katoh et al. ^{77a}	Healthy	Japan	Oral, NOS		45	91	1.6 (0.8–3.3)
Hung et al. ⁹⁵	Healthy	Taiwan	Oral, NOS		41	123	1.0 (0.5–2.1)
Kihara et al. ⁹⁴	Healthy	Japan	Oral cavity, Pharynx, Maxillary sinuses		75	472	1.8 (1.1–2.9)
Tanimoto et al. ⁹²	Hospital	Japan	Oral cavity	Age and sex	100	100	1.0 (0.6–1.8)
Katoh et al. ⁹³	Hospital	Japan	Oral cavity		92	147	1.7 (1.0–2.8)
Morita et al. ^{87a}	Healthy	Japan	Pharynx		45	164	1.0 (0.5–2.0)
Sato et al. ^{73,74}	Healthy	Japan	Oral cavity ^c	Age and sex	142	142	2.2 (1.4–3.6)
Nomura et al. ⁹¹	Healthy	Japan	Oral cavity and Pharynx		114	33	2.5 (1.1–5.5)
Kietthubthew et al. ⁸⁹	Healthy	Thailand	Oral cavity	Age, sex, smoking, betel-chewing and occupation	53	53	3.0 (1.4–6.7)
Cha et al. ⁸⁶	Healthy	Korea	Oral, NOS		72	209	0.7 (0.4–1.3)
<i>P</i> , <i>Q</i> test					779	1534	0.037
<i>P</i> , Eggers test							0.777
Other studies^d							
Sreelekha et al. ⁹⁰		India	Oral, NOS	Age and sex	98	60	1.9 (1.0–3.7)
Buch et al. ^{80a}	Healthy	India	Oral cavity	Region of origin	297	450	3.0 (2.2–4.0)
Xie et al. ^{79a}	Healthy	Puerto Rico	Oral, NOS		132	143	0.7 (0.4–1.2)
Sikdar et al. ^{78a}	Hospital	India	Oral cavity		256	259	1.0 (0.7–1.4)
Drummond et al. ⁹⁸	Dental clinic	Brazil	Oral cavity ^c	SES, age and sex	70	82	2.0 (1.0–3.9)
Gattas et al. ⁹⁷	Hospital	Brazil	Oral cavity and Pharynx	Age and sex	81	102	2.5 (1.4–4.5)
Sharma et al. ⁹⁶	Healthy	India	Oral, NOS		40	87	2.2 (1.0–5.1)

(Continued)

Table 1
(Continued)

Author	Control source	Country	Tumor site	Matching	Cases	Controls	OR (95%CI) <i>GSTM1</i> deleted vs. present
Anantharaman et al. ^{84a}	Healthy and dental clinic	India	Oral, NOS	Age, sex, tobacco habits	451	727	1.3 (1.0–1.7)
Hatagima et al. ^{71f}	Hospital	Brazil	Oral, Oropharynx	Sex, age, race	231	212	0.9 (0.6–1.3)
<i>P</i> , Q test					1446	2122	<0.001
<i>P</i> , Eggers test							0.801

^aStudies included in the pooled analysis.^bFixed effects estimate.^cPlus other unspecified oral subsites.^dMeta estimate was not reported because of the statistically significant test for heterogeneity. These studies had mixed ethnic groups.^eSmokers.^fSame subjects as Marques et al. in Table 2.

NOS, not otherwise specified; SES, socioeconomic status.

ies overall with *CYP1A1* (*Ile/Val*) data and 7 studies with *CYP1A1* MspI data. Nine studies reported data on the associations between the *Ile/Val* polymorphism and risk of oral and pharyngeal cancers, 6 studies reported associations for the *Val/Val* polymorphism, and 10 reported associations for all variants combined (i.e., *Ile/Val* and *Val/Val*). For each of these groups, the studies were statistically significantly heterogeneous (Q test, *P* value < 0.001), therefore no overall meta-ORs were reported. There was no evidence of publication bias (Eggers test *P* value: *Ile/Val* = 0.945, *Val/Val* = 0.625, and *Ile/Val* + *Val/Val* = 0.199). Sensitivity analysis of these studies identified a data set that appeared to influence the meta-ORs. However, exclusion of this study did not resolve the heterogeneity between the remaining studies. The observed heterogeneity is likely due to misclassification, because most of the earlier studies used a laboratory method that may not accurately distinguish between the exon 7 variant alleles.

Among the five studies with *CYP1A1* MspI data, all except for one study reported the associations for the *m1m2*, *m2m2*, and combined variants (*m1m2* + *m2m2*). The studies that reported data for the *m1m2* and combined variants (*m1m2* + *m2m2*) were statistically significantly heterogeneous; therefore the meta-ORs were not reported. No publication bias was observed (Eggers test *P* value: *m1m2* = 0.389 and *m1m2* + *m2m2* = 0.339). There was an increased risk of oral and pharyngeal cancers for patients with the *m2m2* variant (meta-OR: 1.9, 95% CI: 1.4–2.7). There was no evidence of publication bias (Eggers test *P* value: *m2m2* = 0.595). Sensitivity analyses identified a study that influenced the meta-ORs for the *m1m2* and combined variants (*m1m2* + *m2m2*).⁹² After excluding this data set, homogeneity was obtained; no association for the *m1m2* or combined variants and oral and pharyngeal cancer was observed (*m1m2* + *m2m2*) (*m1m2*, Q test, *P* value = 0.625, OR: 0.9, 95% CI: 0.8–1.1, *m1m2* + *m2m2*, Q test, *P* value = 0.798, OR: 1.0, 95% CI: 0.9–1.2). There was no evidence of publication bias (Eggers test *P* value: *m1m2* = 0.628, *m1m2* + *m2m2* = 0.407).

Only one study evaluated the interaction between the *GSTM1* null and *CYP1A1* (*Ile/Val*) polymorphism, and three evaluated the interaction between the *GSTM1* null and *CYP1A1* MspI polymorphism (Table 3). The overall meta-OR for *GSTM1* null + *m1m1* was not reported because the studies were statistically significantly heterogeneous (Q test *P* value = 0.002). There seemed to be an increased risk of oral and pharyngeal cancers for the *GSTM1* *wt* + *m1m2* or *m2m2* (meta-OR: 1.6, 95% CI: 1.0–2.7) and the *GSTM1* null + *m1m2* or *m2m2* (meta-OR: 3.0, 95% CI: 1.8–5.0). However, the association was not statistically significant for all other polymorphic isoforms. There was no publication bias observed for any of these analyses.

Pooled analysis

The GSEC pooled analysis included 21 studies (3130 cases and 6267 controls).

Significant heterogeneity was observed between the 20 studies that contained data for *GSTM1*. Similar to the meta-analysis, one study seemed to contribute to the heterogeneity.⁸⁰ Analyses were then stratified by various covariates. There was no association between the *GSTM1* deletion and oral and pharyngeal cancers (Table 4), even when the analysis was limited to healthy controls (Adjusted odds ratio [AdjOR]: 1.1, 95% CI: 0.8–1.4). A marginal statistically significant association was observed for current smokers (AdjOR: 1.2, 95% CI: 1.0–1.4) or ever smokers (AdjOR: 1.1, 95% CI: 1.0–1.3), but not in never smokers (AdjOR: 1.0, 95% CI: 0.8–1.2). The differences observed between the stratum-specific ORs for smoking were not statistically significant (*P* > 0.1) (data not shown). The data sets for never, ex, and current were homogeneous. (Q test, *P* value > 0.05) but was not for ever smokers (Q test, *P* value = 0.018). The *GSTM1* deletion was statistically significantly associated with oral and pharyngeal cancer in African Americans and Africans (OR: 1.9, 95% CI: 1.1–3.3), but was no longer statistically significant after adjusting for confounding variables (AdjOR: 1.7, 95% CI: 0.9–3.3). There was no association

GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms and oral and pharyngeal cancers

Table 2
Description of the studies included in the meta analysis for CYP1A1

Author	Control source	Country	Tumor site	Matching	Cases	Controls	OR (95% CI) Ile/Ile	OR (95% CI) Ile/Val	OR (95% CI) Val/Val	OR (95% CI) Ile/Val + Val/Val
<i>CYP1A1 (exon7)^a</i>										
Park et al. ^{83b}	Healthy + hospital	USA	Oral cavity		108	108	1.0 (ref)			2.5 (1.0–6.0)
Matthias et al. ^{48b}	Hospital	Germany	Oral cavity and Pharynx		124	186	1.0 (ref)	1.1 (0.5–2.3)		1.0 (0.5–2.1)
Katoh et al. ⁹³	Hospital	Japan	Oral cavity		92	147	1.0 (ref)	1.3 (0.7–2.2)	1.3 (0.4–4.1)	1.3 (0.8–2.2)
Morita et al. ^{87d}	Healthy	Japan	Pharynx		45	164	1.0 (ref)	0.7 (0.4–1.2)	2.4 (0.9–6.4)	0.9 (0.5–1.5)
Sato et al. ^{74c}	Healthy	Japan	^d Oral cavity	Age and sex	142	142	1.0 (ref)	1.6 (1.0–2.6)	4.2 (1.6–11.1)	1.9 (1.2–3.0)
Kao et al. ⁸⁸	Hospital	Taiwan	Oral cavity		106	146	1.0 (ref)	5.1 (2.6–9.8)	18.9 (3.6–98.5)	5.4 (2.8–10.4)
Hahn et al. ¹⁰⁰	Healthy	Germany	Oral cavity	ethnicity	94	92	1.0 (ref)	0.6 (0.2–2.3)		
Sreelekha et al. ⁹⁰		India	Oral, NOS	Age and sex	98	60	1.0 (ref)			5.2 (2.4–11.4)
Xie et al. ^{79b}	Healthy	Puerto Rico	Oral, NOS		132	143	1.0 (ref)	0.9 (0.6–1.6)	0.5 (0.2–1.8)	0.9 (0.5–1.4)
Marques et al. ^{72c}	Hospital	Brazil	Oral, NOS	Age, sex and skin color	231	212	1.0 (ref)	1.1 (0.7–1.8)	2.9 (0.6–14.3)	1.2 (0.7–1.9)
Leichsenring et al. ^{85b}	Hospital	Brazil	Oral, NOS		72	60	1.0 (ref)	1.0 (0.4–2.3)		1.0 (0.5–2.5)
<i>P, Q test</i>					1199	1296		0.001	0.014	<0.001
<i>P, Eggers test</i>								0.945	0.625	0.199
							<i>m1/m1</i>	<i>m1/m2</i>	<i>m2/m2</i>	<i>m1/m2 + m2/m2</i>
<i>CYP1A1 MspI^a</i>										
Matthias et al. ^{44b}	Hospital	Germany	Oral cavity and pharynx		122	205	1.0 (ref)	1.6 (0.8–3.2)	0.9 (0.1–9.9)	1.5 (0.8–3.0)
Sato et al. ^{73c}	Healthy	Japan	^d Oral cavity	Age and sex	142	142	1.0 (ref)	0.9 (0.6–1.6)	2.3 (1.1–4.7)	1.2 (0.7–1.9)
Tanimoto et al. ⁹²	Hospital	Japan	Oral cavity	Age and sex	100	100	1.0 (ref)	3.4 (1.8–6.4)	3.6 (1.4–9.5)	3.5 (1.9–6.2)
Kao et al. ⁸⁸	Hospital	Taiwan	Oral cavity		106	146	1.0 (ref)	0.9 (0.5–1.5)	1.3 (0.6–3.1)	0.9 (0.6–1.6)
Gattas et al. ⁹⁷	Hospital	Brazil	Oral cavity and pharynx	Age and sex	81	102	1.0 (ref)			0.9 (0.5–1.6)
Anantharaman et al. ^{84b}	Healthy + dental clinic	India	Oral, NOS	Age, sex, tobacco habits	446	727	1.0 (ref)	0.9 (0.7–1.2)	1.5 (0.9–2.3)	1.0 (0.8–1.3)
Cha et al. ⁸⁶	Healthy	Korea	Oral, NOS		72	163	1.0 (ref)	0.8 (0.4–1.6)	3.2 (1.3–7.8)	1.1 (0.6–2.2)
META							1.0 (ref)		1.9 (1.4–2.7) ^f	
<i>P, Q test</i>					1069	1585		0.003	0.342	0.007
<i>P, Eggers test</i>								0.389	0.595	0.339

^aMeta estimate was not reported because of the statistically significant test for heterogeneity.

^bStudies included in the pooled analysis.

^cSato et al., 1999 and Sato et al., 2000 included the same subjects.

^dPlus other unspecified oral subsites.

^eSame subjects as Hatagima et al. in Table 1.

^fFixed effects estimate.

NOS, not otherwise specified.

Table 3
Description of studies included in the meta analysis for *GSTM1-CYP1A1* interaction

Author	Control source	Country	Tumor site	Matching	Cases	Controls	(+) Ile/Ile OR (95% CI)	(-) Ile/Ile OR (95% CI)	(+) Ile/Val or Val/Val OR (95% CI)	(-) Ile/Val or Val/Val OR (95% CI)	All polymorphic isoforms OR (95% CI)
<i>GSTM1/CYP1A1</i> exon7											
Sato et al. ^{74a}	Healthy	Japan	Oral cavity ^b	Age and sex	142	142	1.0 (ref)	2.3 (1.2–4.3)	1.9 (0.9–3.9)	4.0 (2.0–7.9)	2.6 (1.5–4.6)
							(+) <i>m1/m1</i>	(-) <i>m1/m1</i>	(+) <i>m1/m2</i> or <i>m2/m2</i>	(-) <i>m1/m2</i> or <i>m2/m2</i>	All polymorphic isoforms
<i>GSTM1/CYP1A1</i> <i>MspI</i>											
Gattas et al. ⁹⁷	Hospital	Brazil	Oral cavity and pharynx	Age and sex	103	102	1.0 (ref)				2.4 (1.1–5.1)
Sato et al. ^{73a}	Healthy	Japan	Oral cavity ^b	Age and sex	142	142	1.0 (ref)	2.7 (1.3–5.6)	1.4 (0.7–2.8)	2.7 (1.4–5.3)	2.2 (1.2–3.9)
Tanimoto et al. ⁹²	Hospital	Japan	Oral cavity	Age and sex	100	100	1.0 (ref)	0.4 (0.2–1.0)	2.0 (0.9–4.1)	3.5 (1.6–8.0)	1.6 (0.9–3.0)
META					345	344	1.0 (ref)		1.6 (1.0–2.7) ^c	3.0 (1.8–5.0) ^c	2.0 (0.4–2.9) ^c
<i>P</i> , <i>Q</i> test								0.002	0.485	0.597	0.704

^aSato et al., 1999 and Sato et al., 2000 included the same subjects.

^bPlus other unspecified oral subsites.

^cFixed effects estimate.

between *GSTM1* deletion and oral and pharyngeal cancer risk in white, Asian populations, or other ethnic groups.

The adjusted summary OR for the association of *CYP1A1* *MspI* polymorphism and oral and pharyngeal cancers (Table 5) was not significant for the *m1m2* genotype but was for the *m2m2* genotype (AdjOR: 2.0, 95% CI: 1.3–3.1). Among oral and pharyngeal cancers, there was a 2-fold likelihood of having the *m2m2* genotype compared with the controls in never smokers (AdjOR: 1.8, 95% CI: 1.1–2.9) but not in current or ever smokers. There was a statistically significant difference when the stratum-specific ORs for never and current smokers were compared (*P* value = 0.019). The association of the *m2m2* variant also differed when limited to healthy controls (AdjOR- healthy controls: 1.2, 95% CI: 0.7–2.2) versus hospital controls: 1.7, 95% CI: 1.1–2.7). A statistically significant association of the *m2m2* genotype was observed for white (AdjOR: 2.1, 95% CI: 1.4–3.3) but not for other ethnic groups, although these were a mixed population.

In contrast, there was no association between the *CYP1A1* (exon7) variant and oral and pharyngeal cancers regardless of the type of controls used in the analysis (Table 6). However, there was a statistically significant association of the *Val/Val* genotype for ever smokers (AdjOR: 2.2, 95% CI: 1.1–4.5). Asian cases seemed to have almost a 4-fold likelihood of having the *Val/Val* genotype when compared with the controls; however, this was only marginally statistically significant (AdjOR: 3.5, 95% CI: 1.0–12.6).

A marginal increased risk of cancer with the *GSTM1* deletion was observed when examining oral cavity (AdjOR: 1.1,

95% CI: 1.0–1.2) and pharyngeal (AdjOR: 1.3, 95% CI: 1.1–1.6) cases independently. Among subjects with oral cavity tumors, no associations were observed for *CYP1A1* (exon7) but for *CYP1A1* *MspI* polymorphisms there was a marginal association; the *m2m2* genotype was significantly associated with oral cavity tumors (AdjOR: 2.0, 95% CI: 1.3–3.1) (Table 7). We were unable to determine the association of this variant genotype for subjects with pharyngeal tumors.

When evaluating alcohol use, a marginal increased risk of cancer with *GSTM1* deletion was observed for both never and ever drinkers (never drinkers, AdjOR: 1.2, 95% CI: 1.0–1.5, ever drinkers, AdjOR: 1.2, 95% CI: 1.0–1.3) (Table 4). There was no association of the *CYP1A1* (exon7) polymorphisms with oral and pharyngeal cancer according to alcohol consumption (Table 5), but an increase risk associated with the *CYP1A1* *m2m2* genotype in never drinkers only was observed (AdjOR: 2.6, 95% CI: 1.5–4.3) (Table 6).

Complete *GSTM1* and *CYP1A1* genotype

The combination of the *CYP1A1* *MspI* and *CYP1A1* (exon7) polymorphisms was not associated with the risk of oral and pharyngeal cancers (data not shown). The combination of the *GSTM1* null plus the *CYP1A1* (*m1m2*) variant genotypes increased the risk of oral and pharyngeal cancers (AdjOR: 1.3, 95% CI: 1.0–1.7), similar observations were made when the homozygous *CYP1A1* variant (*m2m2*) was considered (AdjOR: 1.9, 95% CI: 1.0–3.9—Table 8). This marginal association was also observed in never smokers, but not in current or ever smokers. Similarly, the *GSTM1* null plus the *CYP1A1*

Table 4

Overall and stratified odds ratios of the association of *GSTM1* deletion with oral and pharyngeal cancers—pooled analysis

<i>GSTM1</i>	Controls (N)	Cases (N)	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR ^a (95% CI)
No. studies = 19 ^b				
N = 7046				
Present	2436	1242	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Null	2222	1146	1.0 (0.9–1.1) ^c	1.0 (0.9–1.1)
Healthy controls (N = 926) ^d				
	556	370		
Present	299	199	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Null	257	171	1.0 (0.8–1.3)	1.1 (0.8–1.4)
Hospital controls (N = 2966) ^d				
	1922	1044		
Present	943	542	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Null	979	502	0.9 (0.8–1.0)	0.9 (0.8–1.1)
Never smokers (N = 2751)				
	1974	777		
Present	1059	428	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Null	915	349	0.9 (0.8–1.1)	1.0 (0.8–1.2)
Ex smokers (N = 864)				
	548	316		
Present	265	157	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Null	283	159	1.0 (0.7–1.3)	1.0 (0.7–1.3)
Current smokers (N = 1963)				
	1150	813		
Present	645	423	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Null	505	390	1.2 (1.0–1.4)	1.2 (1.0–1.4)
Ever smokers (N = 3651)				
	2126	1525		
Present	1122	776	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Null	1004	749	1.1 (1.0–1.2)	1.1 (1.0–1.3)
Never drinkers (N = 4822)				
	1280	579		
Present	691	282	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Null	589	297	1.2 (1.0–1.5)	1.2 (1.0–1.5)
Ever drinkers (N = 2963)				
	1776	1187		

(Continued)

Table 4

(Continued)

<i>GSTM1</i>	Controls (N)	Cases (N)	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR ^a (95% CI)
Present	938	587	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Null	838	600	1.1 (1.0–1.3)	1.2 (1.0–1.3)
Whites (N = 5851)				
	3857	1994		
Present	1987	1034	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Null	1870	960	1.0 (0.9–1.1)	1.0 (0.9–1.1)
African Americans + Africans (N = 294)				
	195	99		
Present	149	62	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Null	46	37	1.9 (1.1–3.3)	1.7 (0.9–3.3)
Asians (N = 681)				
	491	190		
Present	236	93	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Null	255	97	1.0 (0.7–1.4)	1.2 (0.8–1.8)
Other (N = 220)				
	115	105		
Present	64	53	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Null	51	52	1.2 (0.7–2.0)	1.2 (0.7–2.1)

^aAdjusted for study number, age (<54, 54–95), sex, race, and smoking (never/ever) where appropriate.

^bOne dataset conducted in an Indian population was excluded from the analysis because of heterogeneity.

^cQ test ($P = 0.048$); Eggers test ($P = 0.825$); Q test (P for all strata >0.05) except for Ever smokers, $P = 0.018$.

^dHealthy controls: includes 5 studies with healthy controls; Hospital controls: includes 8 studies with hospital controls; 6 studies were excluded from this subanalysis because they consisted of both hospital and healthy controls combined. Other = Latinos and other ethnicities not specified.

m1m1 or *m1m2* genotypes were marginally associated with the risk of oral and pharyngeal cancers in never smokers (AdjOR: 1.4, 95% CI: 0.9–2.0) but not in ever smokers (AdjOR: 1.3, 95% CI: 0.8–2.2). When oral cavity and pharyngeal cancer case subjects were examined independently, the interaction between the *GSTM1* null and *CYP1A1* MspI polymorphism was observed for oral cancer but not for cancer of the pharynx (Table 8).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first meta-analysis and pooled analysis carried out to assess the role of *GSTM1* and *CYP1A1* in oral and pharyngeal cancers and to evaluate potential gene-gene and gene-environment joint effects. The results obtained in this study support the hypothesis that *GSTM1* deletion and certain *CYP1A1* polymorphisms may play a role in the carcinogenesis process leading to oral and pharyngeal cancers. Both the

Table 5
Overall and stratified odds ratios of the association of *CYP1A1* MspI polymorphism with oral and pharyngeal cancers—pooled analysis

<i>CYP1A1</i> MspI	Controls (N)	Cases (N)	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR ^a (95% CI)
No. studies for <i>CYP1A1</i> MspI = 8				
N = 4063				
m1m1	1415	796	1.0 (ref)	1.0 (ref)
m1m2	980	525	1.0 (0.8–1.1) ^b	1.2 (1.0–1.5)
m2m2	186	161	1.5 (1.2–1.9) ^b	2.0 (1.3–3.1)
m1m2 + m2m2	1166	686	1.1 (0.9–1.2) ^b	1.3 (1.1–1.6)
Never smokers (N = 2119)				
	1318	801		
m1m1	652	365	1.0 (ref)	1.0 (ref)
m1m2	566	337	1.1 (0.9–1.3)	1.2 (0.9–1.5)
m2m2	100	99	1.8 (1.3–2.4)	1.8 (1.1–2.9)
m1m2 + m2m2	666	436	1.2 (1.0–1.4)	1.2 (1.0–1.6)
Current (N = 822)				
	545	277		
m1m1	283	127	1.0 (ref)	1.0 (ref)
m1m2	219	114	1.2 (0.9–1.6)	1.3 (0.8–2.3)
m2m2	43	36	1.9 (1.1–3.0)	2.6 (0.9–7.5)
m1m2 + m2m2	262	150	1.3 (1.0–1.7)	1.5 (0.9–2.5)
Ever smokers (N = 1320)				
	772	548		
m1m1	468	355	1.0 (ref)	1.0 (ref)
m1m2	258	154	0.8 (0.6–1.0)	1.2 (0.8–1.8)
m2m2	46	39	1.1 (0.7–1.8)	2.4 (0.9–5.8)
m1m2 + m2m2	304	193	0.8 (0.7–1.1)	1.3 (0.9–1.9)
Never drinker (N = 1045)				
	635	410		
m1m1	356	210	1.0 (ref)	1.0 (ref)
m1m2	248	162	1.1 (0.9–1.4)	1.3 (1.0–1.7)
m2m2	31	38	2.1 (1.3–3.4)	2.6 (1.5–4.3)
m1m2 + m2m2	279	200	1.2 (1.0–1.6)	1.5 (1.1–1.9)
Ever drinker (N = 919)				
	546	373		
m1m1	346	281	1.0 (ref)	1.0 (ref)
m1m2	178	83	0.6 (0.4–0.8)	1.1 (0.8–1.5)
m2m2	22	9	0.5 (0.2–1.1)	1.0 (0.4–2.5)
m1m2 + m2m2	200	92	0.6 (0.4–0.8)	1.1 (0.8–1.5)

(Continued)

Table 5
(Continued)

<i>CYP1A1</i> MspI	Controls (N)	Cases (N)	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR ^a (95% CI)
Healthy controls (N = 1109) ^c				
	161	948		
m1m1	137	438	1.0 (ref)	1.0 (ref)
m1m2	23	391	0.9 (0.7–1.1)	1.1 (0.8–1.6) ^d
m2m2	1	119	1.3 (0.8–1.9)	1.2 (0.7–2.2) ^d
m1m2 + m2m2	24	510	0.9 (0.7–1.2)	1.1 (0.8–1.6) ^d
Hospital controls (N = 1546) ^c				
	968	578		
m1m1	665	366	1.0 (ref)	1.0 (ref)
m1m2	256	168	1.2 (1.0–1.5)	1.3 (1.0–1.7) ^d
m2m2	47	44	1.7 (1.1–2.6)	1.7 (1.1–2.7) ^d
m1m2 + m2m2	303	212	1.3 (1.0–1.6)	1.4 (1.1–1.8) ^d
Whites (N = 2880)				
	1769	1111		
m1m1	1059	645	1.0 (ref)	1.0 (ref)
m1m2	612	375	1.0 (0.9–1.2)	1.2 (1.0–1.5)
m2m2	98	91	1.5 (1.1–2.1)	2.1 (1.4–3.3)
m1m2 + m2m2	710	466	1.1 (0.9–1.3)	1.3 (1.1–1.6)
Other (N = 1183)				
	812	371		
m1m1	356	151	1.0 (ref)	1.0 (ref)
m1m2	368	150	1.0 (0.7–1.3)	1.0 (0.7–1.4)
m2m2	88	70	1.9 (1.3–2.7)	1.6 (0.9–2.6)
m1m2 + m2m2	456	220	1.1 (0.9–1.5)	1.1 (0.8–1.6)

^aAdjusted for study number, age (<54, 54–95), race, alcohol use (never/ever) and smoking (never/ever) where appropriate.

^bQ test (P): m1m2 = 0.973, m2m2 = 0.403, m1m1 + m1m2 = 0.980; Eggers test (P): m1m2 = 0.666, m2m2 = 0.327, m1m1 + m2m2 = 0.515.

^cHealthy controls: includes 2 studies with healthy controls; Hospital controls: includes 4 studies with hospital controls; 2 studies were excluded from this subanalysis because it consisted of both hospital and healthy controls combined; Other = African Americans, Africans, Asians, Latinos, and other ethnicities not specified.

^dAlcohol use (never/ever) was excluded from the adjustment due to collinearity.

meta-analysis and pooled analysis showed a significant association between oral and pharyngeal cancer and the homozygous variant genotype of the *CYP1A1* MspI polymorphism. In addition, the data suggest that the combined effect of *GSTM1* and *CYP1A1* may be associated with oral and pharyngeal cancers. In the meta-analysis, the *GSTM1* null genotype was not found to be associated with oral and pharyngeal tumors in whites. Sensitivity analysis of the Asian studies identified a data set that determined the heterogeneity. This result suggests that differences in oral and pharyngeal cancer risk factors may be present according to the geographic origin of the subjects. Ethnic differences in the associ-

Table 6
Overall and stratified odds ratios of the association of CYP1A1 (exon7) polymorphism with oral and pharyngeal cancers—pooled analysis

CYP1A1 (exon 7)	Controls (N)	Cases (N)	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR ^a (95% CI)
No. studies for CYP1A1 (exon 7) = 10				
N = 3814	2295	1519		
Ile/Ile	1778	1183	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Ile/Val	479	298	0.9 (0.8–1.1) ^b	1.0 (0.8–1.1)
Val/Val	38	38	1.5 (1.0–2.4) ^b	1.5 (0.9–2.4)
Ile/Val + Val/Val	517	336	1.0 (0.8–1.1) ^b	1.0 (0.8–1.2)
Never smokers (N = 1194)				
	741	453		
Ile/Ile	568	352	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Ile/Val	159	94	1.0 (0.7–1.3)	1.0 (0.7–1.3)
Val/Val	14	7	0.8 (0.3–2.0)	0.9 (0.3–2.2)
Ile/Val + Val/Val	173	101	0.9 (0.7–1.2)	1.0 (0.7–1.3)
Current (N = 1048)				
	533	515		
Ile/Ile	403	392	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Ile/Val	123	104	0.9 (0.7–1.2)	0.9 (0.6–1.2)
Val/Val	7	19	2.8 (1.2–6.7)	2.3 (0.9–5.8)
Ile/Val + Val/Val	130	123	1.0 (0.7–1.3)	1.0 (0.7–1.3)
Ever smokers (N = 1751)				
	832	919		
Ile/Ile	641	712	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Ile/Val	180	179	0.9 (0.7–1.1)	0.9 (0.7–1.1)
Val/Val	11	28	2.3 (1.1–4.6)	2.2 (1.1–4.5)
Ile/Val + Val/Val	191	207	1.0 (0.8–1.2)	1.0 (0.8–1.2)
Never drinkers (N = 144)				
	81	63		
Ile/Ile	66	56	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Ile/Val	14	6	0.5 (0.2–1.4)	0.3 (0.1–1.3)
Val/Val	1	1	1.2 (0.1–19.3)	4.9 (0.3–92.3)
Ile/Val + Val/Val	15	7	0.6 (0.2–1.4)	0.5 (0.1–1.7)
Ever drinkers (N = 1115)				
	534	581		
Ile/Ile	405	476	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Ile/Val	121	92	0.7 (0.5–0.9)	0.8 (0.5–1.0)
Val/Val	8	13	1.4 (0.6–3.4)	2.0 (0.8–5.0)
Ile/Val + Val/Val	129	105	0.7 (0.5–0.9)	0.8 (0.6–1.1)

(Continued)

Table 6
(Continued)

CYP1A1 (exon 7)	Controls (N)	Cases (N)	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR ^a (95% CI)
Healthy controls (N = 1,876) ^c				
	1286	590		
Ile/Ile	952	442	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Ile/Val	305	128	0.9 (0.7–1.1)	0.8 (0.6–1.0)
Val/Val	29	20	1.5 (0.8–2.7)	1.0 (0.5–1.9)
Ile/Val + Val/Val	334	148	1.0 (0.8–1.2)	0.8 (0.6–1.0)
Hospital controls (N = 1787) ^c				
	949	838		
Ile/Ile	782	686	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Ile/Val	158	143	1.0 (0.8–1.3)	1.0 (0.8–1.3)
Val/Val	9	9	1.1 (0.4–2.9)	1.1 (0.4–2.6)
Ile/Val + Val/Val	167	152	1.0 (0.8–1.3)	1.0 (0.8–1.3)
Whites (N = 2085)				
	1095	990		
Ile/Ile	872	793	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Ile/Val	207	180	1.0 (0.8–1.2)	0.9 (0.8–1.2)
Val/Val	16	17	1.2 (0.6–2.3)	1.1 (0.5–2.3)
Ile/Val + Val/Val	223	197	1.0 (0.8–1.2)	1.0 (0.8–1.2)
Asians (N = 261)				
	189	72		
Ile/Ile	122	45	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Ile/Val	61	18	0.8 (0.4–1.5)	0.7 (0.4–1.3)
Val/Val	6	8	3.5 (1.2–10.8)	3.5 (1.0–12.6)
Ile/Val + Val/Val	67	26	1.0 (0.6–1.8)	0.9 (0.5–1.7)
Other (N = 1468)				
	1011	457		
Ile/Ile	784	344	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Ile/Val	211	100	1.1 (0.8–1.4)	1.0 (0.7–1.3)
Val/Val	16	13	1.9 (0.9–3.9)	1.4 (0.6–3.2)
Ile/Val + Val/Val	227	113	1.1 (0.9–1.5)	1.0 (0.8–1.4)

^aAdjusted for study number, age (<54, 54–95), sex, race where appropriate.
^bQ test (P): Ile/Val = 0.435, Val/Val = 0.425, Ile/Val + Val/Val = 0.282; Eggers test (P): Ile/Val = 0.968, Val/Val = 0.766, Ile/Val + Val/Val = 0.967.

^cHealthy controls: includes 4 studies with healthy controls; hospital controls: includes 5 studies with hospital controls; one study was excluded from this subanalysis because it consisted of both hospital and healthy controls combined. Other = African Americans, Africans, Latinos, and other ethnicities not specified.

ation between metabolic polymorphisms and tobacco related cancers may be related to gene-gene interactions, different linkages to the polymorphisms determining oral and pharyngeal cancer risk, and different lifestyles. For example other forms of tobacco in addition to tobacco smoke, such as chewed tobacco with

Table 7
The association of *GSTM1*, *CYP1A1* polymorphisms with oral and pharyngeal cancers according to tumor site—pooled analysis

	Controls	Cases	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI)
<i>GSTM1</i> ^a Oral cavity (N = 7306)				
	5329	1977		
Present	3002	1070	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Null	2327	907	1.1 (1.0–1.2)	1.1 (1.0–1.2)
Pharynx (N = 5807)				
	5329	478		
Present	3002	232	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Null	2327	246	1.4 (1.1–1.7)	1.3 (1.1–1.6)
<i>CYP1A1 MspI</i> ^b Oral cavity (N = 3936)				
	2581	1355		
m1m1	1415	687	1.0 (ref)	1.0 (ref)
m1m2	980	507	1.1 (0.9–1.2)	1.2 (1.0–1.5)
m2m2	186	161	1.8 (1.4–2.2)	2.0 (1.3–3.1)
m1m2 + m2m2	1166	668	1.2 (1.0–1.4)	1.3 (1.1–1.6)
Pharynx (N = 2708)				
	2581	127		
m1m1	1415	109	1.0 (ref)	1.0 (ref)
m1m2	980	18	0.2 (0.1–0.4)	1.1 (0.6–2.1)
m2m2	186	0	—	—
m1m2 + m2m2	1166	18	0.2 (0.1–0.3)	1.0 (0.5–1.9)
<i>CYP1A1</i> (exon7) ^c Oral cavity (N = 3102)				
	2083	1019		
Ile/Ile	1608	795	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Ile/Val	439	201	0.9 (0.8–1.1)	0.9 (0.7–1.1)
Val/Val	36	23	1.3 (0.8–2.2)	1.1 (0.6–1.9)
Ile/Val + Val/Val	475	224	1.0 (0.8–1.1)	0.9 (0.8–1.1)
Pharynx (N = 2351)				
	2083	268		
Ile/Ile	1608	208	1.0 (ref)	1.0 (ref)
Ile/Val	439	51	0.9 (0.7–1.2)	1.0 (0.7–1.4)
Val/Val	36	9	1.9 (0.9–4.1)	1.8 (0.8–4.0)
Ile/Val + Val/Val	475	60	1.0 (0.7–1.3)	1.1 (0.8–1.5)

^aAdjusted for study number, age (<54, 54–95), sex, and smoking (never/ever) where appropriate.

^bAdjusted for study number, age (<54, 54–95), race, smoking (never/ever), and alcohol use (never/ever) where appropriate.

^cAdjusted for study number, age (<54, 54–95), sex, race where appropriate.

areca nut or wrapped in betel quid or pan¹⁰¹ are used in certain geographic areas. We were unable to evaluate the other ethnic groups because of heterogeneity among the studies included in this very mixed stratum.

Table 8

Overall and stratified odds ratios of the association of *GSTM1/CYP1A1 MspI* polymorphism with oral and pharyngeal cancers—pooled analysis

<i>GSTM1/CYP1A1 MspI</i>	Controls (N)	Cases (N)	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR ^a (95% CI)
No. studies: 8				
N = 4004				
	2536	1468		
+/m1m1	809	419	1.0 (ref)	1.0 (ref)
+/m1m2	608	292	0.9 (0.8–1.1)	1.4 (1.0–1.8)
+/m2m2	116	96	1.6 (1.2–2.2)	2.4 (1.4–4.2)
+/m1m2 + m2m2	724	388	1.0 (0.9–1.2)	1.5 (1.1–2.0)
–/m1m1	571	368	1.2 (1.0–1.5)	1.3 (1.0–1.7)
–/m1m2	362	228	1.2 (1.0–1.5)	1.3 (1.0–1.7)
–/m2m2	70	65	1.8 (1.3–2.6)	1.9 (1.0–3.9)
–/m1m2 + m2m2	432	293	1.3 (1.1–1.6)	1.3 (1.0–1.8)
Never smokers (N = 2098)				
	1304	794		
+/m1m1	407	196	1.0 (ref)	1.0 (ref)
+/m1m2	332	195	1.2 (1.0–1.6)	1.5 (1.0–2.1)
+/m2m2	63	58	1.9 (1.3–2.8)	2.3 (1.2–4.3)
+/m1m2 + m2m2	395	253	1.3 (1.1–1.7)	1.6 (1.1–2.2)
–/m1m1	239	166	1.4 (1.1–1.9)	1.6 (1.1–2.3)
–/m1m2	226	138	1.3 (1.0–1.7)	1.3 (0.9–1.9)
–/m2m2	37	41	2.3 (1.4–3.7)	2.1 (0.9–4.6)
–/m1m2 + m2m2	263	179	1.4 (1.1–1.8)	1.4 (0.9–2.0)
Ever smokers (N = 1285)				
	743	542		
+/m1m1	245	182	1.0 (ref)	1.0 (ref)
+/m1m2	163	79	0.7 (0.5–0.9)	1.2 (0.7–2.0)
+/m2m2	27	25	1.3 (0.7–2.2)	2.9 (1.0–8.8)
+/m1m2 + m2m2	190	104	0.7 (0.5–1.0)	1.3 (0.8–2.3)
–/m1m1	196	168	1.2 (0.9–1.5)	1.0 (0.7–1.5)
–/m1m2	93	74	1.1 (0.8–1.5)	1.3 (0.7–2.2)
–/m2m2	19	14	1.0 (0.5–2.0)	1.7 (0.3–8.4)
–/m1m2 + m2m2	112	88	1.1 (0.8–1.5)	1.3 (0.8–2.2)
Oral cavity (N = 3880)				
	2536	1344		
+/m1m1	809	369	1.0 (ref)	1.0 (ref)
+/m1m2	608	285	1.0 (0.9–1.2)	1.4 (1.0–1.8)
+/m2m2	116	96	1.8 (1.4–2.4)	2.5 (1.4–4.2)
+/m1m2 + m2m2	724	381	1.2 (1.0–1.4)	1.5 (1.1–2.0)
–/m1m1	571	312	1.2 (1.0–1.4)	1.3 (1.0–1.6)

(Continued)

Table 8
(Continued)

<i>GSTM1/CYP1A1 MspI</i>	Controls (N)	Cases (N)	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR ^a (95% CI)
-/m1m2	362	217	1.3 (1.1–1.6)	1.3 (0.9–1.8)
-/m2m2	70	65	2.0 (1.4–2.9)	2.0 (1.0–4.0)
-/m1m2 + m2m2	432	282	1.4 (1.2–1.7)	1.3 (1.0–1.8)
Pharynx (N = 2660)				
	2536	124		
+/m1m1	809	50	1.0 (ref)	1.0 (ref)
+/m1m2	608	7	0.2 (0.1–0.4)	1.7 (0.6–5.1)
+/m2m2	116	0	—	—
+/m1m2 + m2m2	724	7	0.2 (0.1–0.4)	1.7 (0.6–4.7)
-/m1m1	571	56	1.6 (1.1–2.4)	1.5 (0.9–2.6)
-/m1m2	362	11	0.5 (0.3–1.0)	1.0 (0.4–2.4)
-/m2m2	70	0	—	—
-/m1m2 + m2m2	432	11	0.4 (0.2–0.8)	0.9 (0.4–2.1)

^aAdjusted for study number, race, smoking status (never/ever), and alcohol use (never/ever) where appropriate.

Previous meta-analysis and pooled analysis have reported an association between the *GSTM1* null genotype and head and neck tumors,^{40–42} but did not analyze ethnic specific or subsite specific differences. We were able to evaluate ethnic specific and subsite specific differences in the pooled analysis. We confirmed that there was no association of the *GSTM1* null genotype with oral and pharyngeal cancers in whites. In contrast to the meta-analysis, there was also no association observed for Asians (OR: 1.2, 95% CI: 0.8–1.8). This difference in result may be attributed to differences in the number of subjects in the meta-analysis and pooled analysis (2313 Asian subjects in the meta-analysis versus 681 in the pooled analysis). Although not statistically significant, African American and African populations seemed to be almost two times more likely to have the *GSTM1* null genotype. (Adj OR: 1.7, 95% CI: 0.9–3.3). This lack of statistical significance might also be attributed to the small number of African American and African subjects included in this pooled analysis.

Although the head and neck tumors have been historically grouped together because of the similar risk factors involved in their etiology, several authors suggest that the role of genetic susceptibility might be different in the head and neck subsites.^{44,83,92,94} The oral cavity, pharynx, and larynx are unique structures with different functions and possibly different sensitivities to carcinogens, especially alcohol and tobacco. Studies suggest that HPV may be the etiologic agent involved in most pharyngeal tumors (particularly those in the oropharynx).^{102,103} The presence of HPV along with the polymorphisms of the genes in question would certainly be relevant to our analysis. However, these data were not available in the studies included in this meta-analysis and pooled analysis. In

the pooled analysis, a difference in risk for oral and pharyngeal tumors was seen for the *CYP1A1* MspI variant, with oral cavity tumors statistically significantly associated with the *m1m2* and *m2m2* variant genotypes. We also observed that the combination of *GSTM1* deletion and *CYP1A1* MspI variant was significantly associated with oral cavity cancer but not with pharyngeal cancer.

There is great discrepancy in the literature as to the association of *CYP1A1* genotypes with various smoking related cancers.^{12,20,41,43,104} The pooled analysis results confirm the association found in the meta-analysis for the variant allele of the *CYP1A1* MspI polymorphism (*m2/m2*) and oral and pharyngeal cancers. Regarding the *CYP1A1* exon 7 polymorphism, the pooled analysis revealed that the association of the *Val/Val* genotype with oral and pharyngeal cancers was limited only to ever smokers. One caveat is the possibility that individuals could have been misclassified because most of the earlier studies used a laboratory method that may not accurately distinguish between the exon 7 variant alleles having a C2455 base change and another recently described allele having a C2453 base change.²⁰

The pooled analysis showed a role of tobacco consumption on the association between *GSTM1* deletion and oral and pharyngeal cancer, that could be explained by the involvement of this enzyme in the metabolism of PAHs. However, there is no consistent evidence supporting this association. Some studies have found a higher level of DNA adducts and chromosome damage in lymphocytes of coke oven workers, bus drivers and tobacco smokers who lack the *GSTM1* gene,^{24,105–108} whereas others failed to find a significant relationship.^{109,110} The same can be said for *CYP1A1* polymorphisms.^{24,109,111,112} When we stratified the pooled analysis by smoking status we also observed that combined effects of *GSTM1* null and *CYP1A1* MspI were only present among nonsmokers. This might seem controversial because it has been demonstrated that smokers with high activating *CYP1A1*/low deactivating *GSTM1* genotypes tend to have higher benzo[a] pyrene diol-epoxide-DNA adducts.^{24,113,114} It has been suggested that the role of *CYP1A1* and *GSTM1* on lung cancer risk might be more important at low levels of exposure, but these findings need further investigation.⁴³ Other risk factors such as alcohol must be into account. Alcohol might act as a solvent for other carcinogens, or perhaps generate and exacerbate coincident inflammation and modify the effect of susceptibility to tobacco.^{8,115} It might also be recommendable to assess the combined effects among other polymorphisms of the GST and CYP genes (*GSTM3*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A2*), and of other genes involved in the detoxification of tobacco and alcohol such as *N*-acetyltransferases (*NAT1*, *NAT2*), microsomal epoxide hydrolase, UDP-glucuronosyltransferases, and alcohol dehydrogenase.^{20,41,100,116–120}

The presence of heterogeneity and/or publication bias may compromise the interpretation of the meta-analyses and result in an erroneous and potentially misleading conclusion. We performed sensitivity and stratified analyses to identify the sources of heterogeneity. Potential sources of heterogeneity include ethnic group, sample size, tumor location, case-con-

tol recruitment and tobacco and alcohol consumption, most of which were easily evaluated in the pooled analysis. A general limitation to the results obtained with both the meta-analysis and the pooled analysis is the potential selection bias that may have been introduced by a poorly defined study base. Some of the publications do not provide sufficient details on the characteristics of the cases and controls, the way controls have been recruited or even the period where this occurred.^{66,77,79,85,88,92,94} In some hospital-based studies information on the causes for hospital admission were not provided. Nevertheless, we were able to evaluate the influence of control group source in this analysis.

There were 18 published studies that were excluded from the meta-analysis because they included laryngeal cases and did not provide site-specific data.^{53–69} This unavoidable exclusion was a major loss of the literature. Efforts were made to obtain these datasets for inclusion in the pooled analysis; we were successful in obtaining 6 of the 18 datasets.^{57,59,65,66,69,87} However, the potential for publication bias in the pooled analysis cannot be dismissed because the datasets did not entirely represent all of the published studies. Nonetheless, we did not observe any evidence of publication bias for the overall associations of *GSTM1* or *CYP1A1* with oral and pharyngeal cancers.

An important shortcoming to the investigation of the gene-environment effects is the possibility of misclassification of exposure. The categorization of individuals as never/ex/current/ever smokers could be inaccurate and not sufficiently standardized across studies.^{77,79,81,88,92,94} Misclassification of exposure could lead to biased results so this must be taken into account when interpreting the findings. It would be preferable to further characterize tobacco consumption as lifetime exposure (pack-years), but in the present meta-analysis and pooled analysis this was not possible because of the heterogeneous categorization of the smoking habits. In the majority of studies there was no information of alcohol intake, thus making it impossible to stratify for this factor.

Laboratory methods

The methods for determining the gene polymorphisms discussed in this review are described in each article. The majority of the studies used genomic DNA extracted from lymphocytes with PCR as the method for genotyping.

CONCLUSIONS

Overall, the association of *GSTM1* deletion and oral and pharyngeal cancers may be dependent upon ethnicity. A possible association observed for Asians and African American/African groups and not for whites cannot be ruled out. The *CYP1A1* exon 7 polymorphism was associated with oral and pharyngeal cancer only for ever smokers, when studied independently in the pooled analysis, although the *CYP1A1* MspI variant homozygote allele (*m2/m2*) was significantly associated with this cancer in both the meta-analysis and pooled analysis. When analyzing the complete genotype of *GSTM1* deletion and *CYP1A1* MspI polymorphism, the risk of oral and pharyngeal cancers seems to be higher for never smokers than

for ever smokers. It should be highlighted that the results of the pooled analysis varied according to the type of controls considered, indicating that a selection bias might be present in some studies and therefore the results should be considered with caution. There is no indication at this point for population testing of these genes as risk factors for oral and pharyngeal cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by NIH grants P50CA097190 (Head and neck SPORE: Project 1) and the ECNIS project, Grant number: EU Contract 513943 (to E.T.) and 5P50CA097190 (Head and neck SPORE: minority supplement) (to C.C.R.). This work was also supported in part by the 1KL2 RR024154–02 (to C.C.R.), from the National Center for Research Resources (NCRR), a component of the National Institutes of Health (NIH), and NIH Roadmap for Medical Research. The authors acknowledge Ms. Barbara Stadterman (GSEC administrator), who managed the various datasets included in the pooled analysis, a significant contribution to this published work. The authors acknowledge the dataset contributions of Christiane Coutelle, PhD.

References

- Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprevention and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995;30:445–600.
- Geisler SA, Olshan AF. *GSTM1*, *GSTT1*, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-huge review. *Am J Epidemiol* 2001;154:95–105.
- Coles B, Ketterer B. The role of glutathione transferase in chemical carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1990;25:47–70.
- Shimada T, Martin MV, Pruess-Schwartz D, Marnett LJ, et al. Roles of individual human cytochrome P-450 enzymes in the bioactivation of benzo(a)pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res* 1989;49:6304–6312.
- Coutelle C, Ward PJ, Fleury B, Quattrocchi P, et al. Laryngeal and oropharyngeal cancer, and alcohol dehydrogenase 3 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms. *Hum Genet* 1997;99:319–325.
- Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes *GSTM1* and *GSTT1* in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1997;6:733–743.
- Widersten M, Pearson WR, Engstrom A, Mannervik B. Heterologous expression of the allelic variant mu-class glutathione S-transferase. *Biochem J* 1991;276(pt 2):519–524.
- Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ* 1999;231–244.
- Sundberg K, Dreij K, Seidel A, Jernstrom B. Glutathione conjugation and DNA adduct formation of dibenzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene diol epoxides in V79 cells stably expressing different human glutathione transferases. *Toxicology* 2002;15:170–179.
- Hasler JA. Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 1999;20:12–137.
- Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochrome P450. *Lancet* 2002; 12:1155–1162.
- Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, et al. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination as a risk modifier of tobacco related cancers. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2000;9:3–28.
- Romkes M, White C, Johnson J, Eibling D, et al. Expression of cytochrome P450 mRNA in human lung, head and neck tumors and normal adjacent tissues. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1996;37:105.
- Quan T, Reiners JJ Jr, Bell AO, Hong N, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of \pm -benzo-a-pyrene-trans-7,8-dihydrodiol in CYP1A1-expressing human fibroblasts quantitatively correlate with CYP1A1 expression level. *Carcinogenesis* 1994; 15:1827–1832.
- Hilderbrand CE, Gonzalez FJ, McBride OW, Nebert DW. Assignment of the human 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin inducible cytochrome P1–450 gene on chromosome 15. *Nucleic Acids Res* 1985;13:2009–2016.

GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms and oral and pharyngeal cancers

16. Oscarson M, Ingelman S. CYPalleles: a web page for nomenclature of human cytochrome P450 alleles. *Drug Metab Pharmacokinet* 2002;17:491–495.
17. Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, Daly AK, Garte SJ, et al. Human cytochrome P-450 (CYP) genes: a web page for the nomenclature of alleles. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2001;10:1307–1308.
18. Vineis P, Malats N, Lang M, d'Errico A, et al, editors. Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer (IARC Scientific Publications No 148). Lyon, France: IARC, 1999.
19. Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. Genetic linkage of lung cancer associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of human cytochrome P4501A1 gene. *J Biochem* 1991;110:407–411.
20. Cascorbi I, Brockmoller J, Roots I. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 1996;56:4965–4969.
21. Kiyohara C, Hirohata T, Inutsuka S. The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms in the CYP1A1 gene. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:18–24.
22. Zhang Z-Y, Fasco MJ, Huang L, Guengerich FP, et al. Characterization of purified human recombinant cytochrome P4501A1 Ile 462 and Val 462: assessment of a role for the rare allele in carcinogenesis. *Cancer Res* 1996;56:3926–3933.
23. Crofts F, Taioli E, Trachman J, Cosma GN, et al. Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. *Carcinogenesis* 1994;15:2961–2963.
24. Rojas M, Alexandrov K, Cascorbi I, Brockmoller J. High benzo[a]pyrene diol-epoxide DNA adduct levels in lung and blood cells from individuals with combined CYP1A1 MspI/MspI-GSTM1*0*0 genotypes. *Pharmacogenetics* 1998;8:109–118.
25. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002 cancer incidence, mortality and prevalence worldwide IARC CancerBase, Version 2.0 No. 5. Lyon, IARC Press, 2004.
26. Bundgaard T, Wildt J, Frydenberg M, Elbrond O, et al. Case-control study of squamous cell cancer of the oral cavity in Denmark. *Cancer Causes Control* 1995;6:57–67.
27. La Vecchia C, Franceschi S, Favero A, Talamini R, et al. Alcohol intake and cancer of the upper digestive tract. Pattern of risk in Italy is different from that in Denmark. *BMJ* 1999;318:1289–1290.
28. Groenbaek M, Becker U, Johansen D, Tonnesen H, et al. Population based cohort study of the association between alcohol intake and cancer of the upper digestive tract. *BMJ* 1998;317:844–847.
29. Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, et al. The role of type of tobacco and diet of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 2004;108:741–749.
30. Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, González-Navarro A, Cero-Lapiedra R, et al. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Spain. *Oral Oncol* 2000;6:170–174.
31. Rosenquist K. Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population based case-control study in southern Sweden. *Swed Dent J Suppl* 2005;179:1–66.
32. Altieri A, Bosetti C, Gallus S, Franceschi S, et al. Wine, beer and spirits and risks of oral and pharyngeal cancer: a case-control study from Italy and Switzerland. *Oral Oncol* 2004;40:904–909.
33. Lissowska J, Pilarska A, Pilarski P, Samolczyk-Wanyura D, et al. Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev* 2003;12:25–33.
34. Garrote LF, Herrero S, Reyes RM, Vaccarella S, et al. Risk factors for cancer of oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *Br J Cancer* 2001;85:46–54.
35. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, et al. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 1997;3:302–312.
36. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on cancer multicentre study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1772–1783.
37. Maden C, Beckmann AM, Thomas DB, McKnight B, et al. Human papillomavirus, herpes simplex viruses, and risk of oral cancer in men. *Am J Epidemiol* 1992;135:1093–1102.
38. Mork J, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001;344:1125–1131.
39. Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, et al. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol* 2005;125:1337–1344.
40. Tripathy CB, Roy N. Meta-analysis of glutathione S-transferase M1 genotype and risk toward head and neck cancer. *Head Neck* 2006;28:217–224.
41. Hashibe M, Brennan P, Strange RC, Bhisney R, et al. Meta- and pooled analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:1509–1517.
42. Ye Z, Song H, Guo Y. Glutathione S-transferase M1, T1 status and the risk of head and neck cancer: a meta-analysis. *J Med Genet* 2004;41:360–365.
43. Hung RJ, Boffetta P, Brockmoller J, Butkiewicz D, et al. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in caucasian non-smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis* 2003;24:875–882.
44. Matthias C, Bockmuhl U, Jahnke V, Jones PW, et al. Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers. *Pharmacogenetics* 1998;8:91–100.
45. Jourenkova-Mironova N, Mitrunen K, Bouchardy C, Dayer P, et al. High-activity microsomal epoxide hydrolase genotypes and the risk of oral, pharynx, and larynx cancers. *Cancer Res* 2000;60:534–536.
46. Mulder TPJ, Manni JJ, Roelofs HM, Peters WH, et al. Glutathione S-transferases and glutathione in human head and neck cancer. *Carcinogenesis* 1995;16:619–624.
47. Worrall SF, Corrigan M, High A, Starr D, et al. Susceptibility and outcome in oral cancer: preliminary data showing an association with polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6. *Pharmacogenetics* 1998;8:433–439.
48. Matthias C, Bockmuhl U, Jahnke V, Harries LW, et al. The glutathione S-transferase GSTP1 polymorphism: effects on susceptibility to oral/pharyngeal and laryngeal carcinomas. *Pharmacogenetics* 1998;8:1–6.
49. Wenghofer M, Pesch B, Harth V, Broede P, et al. Association between head and neck cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Arch Toxicol* 2003;77:37–41.
50. Cabelguenne A, Loriot MA, Stucker I, Blons H, et al. Glutathione-associated enzymes in head and neck squamous cell carcinoma and response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. *Int J Cancer* 2001;93:725–730.
51. Lee E, Huang Y, Zhao B, Seow-Choen F, et al. Genetic polymorphism of conjugating enzymes and cancer risk: GSTM1, GSTT1, NAT1 and NAT2. *J Toxicol Sci* 1998;23:140–142.
52. Amador AG, Righi PD, Radpour S, Everett ET, et al. Polymorphisms of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:440–445.
53. König-Greger D, Riechelmann H, Wittich U, Gronau S. Genotype and phenotype of glutathione-S-transferase in patients with head and neck carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:718–725.
54. Evans AJ, Henner WD, Eilers KM, Montalto MA, et al. Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck* 2004;26:63–70.
55. Park JY, Stimson PS, Lazarus P. Epoxide hydrolase genotype and orolaryngeal cancer risk: interaction with GSTM1 genotype. *Oral Oncol* 2003;9:483–490.
56. McWilliams JE, Evans AJ, Beer TM, Andersen PE, et al. Genetic polymorphisms in head and neck cancer risk. *Head Neck* 2000;22:609–617.
57. Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Char D, et al. Glutathione-S-transferase polymorphisms and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer* 1999;84:220–224.
58. Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:185–191.
59. Oude Ophuis MB, van Lieshout EM, Roelofs HM, Peters WH, et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphisms in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. *Cancer* 1998;82:936–943.
60. Gaudet MM, Olshan AF, Poole C, Weissler MC, et al. Diet, GSTM1 and GSTT1 and head and neck cancer. *Carcinogenesis* 2004;25:735–740.
61. Gronau S, König-Greger D, Jerg M, Riechelmann H. Gene polymorphisms in detoxification enzymes as susceptibility factor for head and neck cancer? *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;128:674–680.
62. Gonzalez MV, Alvarez V, Pello MF, Menendez MJ, et al. Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase-M1, and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to head and neck cancer. *J Clin Pathol* 1998;51:294–298.
63. Trizna Z, Clayman GL, Spitz MR, Briggs KL, et al. Glutathione s-transferase genotypes as risk factors for head and neck cancer. *Am J Surg* 1995;170:499–501.
64. Ko Y, Abel J, Harth V, Brode P, et al. Association of CYP1B1 codon 432 mutant allele in head and neck squamous cell cancer is reflected by somatic mutations of p53 in tumor tissue. *Cancer Res* 2001;61:4398–4404.
65. Boccia S, Cadoni G, Sayed-Tabatabaei FA, Volante M, et al. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, EPHX1 exons 3 and 4, and NAT2 polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:93–100.
66. Biselli JM, de Angelo Calaverini Leal RC, Ruiz MT, Goloni-Bertollo EM, et al. GSTT1 and GSTM1 polymorphism in cigarette smokers with head and neck squamous cell carcinoma. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)* 2006;72:654–658.
67. Goloni-Bertollo EM, Biselli JM, Correa LC, Maniglia JV, et al. [Evaluation of the influence of GSTT1 and GSTM1 null genotypes in head and neck carcinogenesis]. *Rev Assoc Med Bras* 2006;52:365–368.
68. Peters ES, McClean MD, Marsit CJ, Luckett B, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and the synergy of alcohol and tobacco in oral, pharyngeal, and laryngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2196–2202.
69. Capoluongo E, Almadori G, Concolino P, Bussu F, et al. GSTT1 and GSTM1 allelic polymorphisms in head and neck cancer patients from Italian Lazio Region. *Clin Chim Acta* 2007;376:174–178.
70. Park LY, Muscat JE, Kaur T, Schantz SP, et al. Comparison of GSTM polymor-

- phisms and risk for oral cancer between African-Americans and Caucasians. *Pharmacogenetics* 2000;10:123–131.
71. Hatagima A, Costa EG, Marques CF, Koifman RJ, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and oral cancer: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol* 2008;44:200–207.
 72. Marques CFS, Koifman S, Koifman RJ, Boffetta P, et al. Influence of CYP1A1, CYP2E1, GSTM3 and NAT2 genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: results from a case-control study in Rio de Janeiro. *Oral Oncol* 2006;42:632–637.
 73. Sato M, Sato T, Izumo T, Amagasa T. Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. *Carcinogenesis* 1999;20:1927–1931.
 74. Sato M, Sato T, Izumo T, Amagasa T. Genetically high susceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined genotyping of CYP1A1 and GSTM1 genes. *Oral Oncol* 2000;36:267–271.
 75. Taioli E. International collaborative study on genetic susceptibility to environmental carcinogens. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1999;8:727–728.
 76. Gaspari L, Marinelli D, Taioli E. International collaborative study on Genetic Susceptibility to Environmental Carcinogens (GSEC): an update. *Int J Hyg Environ Health* 2001;204:39–42.
 77. Katoh T, Kaneko S, Ohya R, Higashi K, et al. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism in patients with oral squamous cell carcinoma in relation to cigarette smoking. *Asian J Oral Maxillofac Surg* 1995;7:13–17.
 78. Sikdar N, Paul RR, Roy B. Glutathione S-transferase M3 (A/A) genotype as a risk factor for oral cancer and leukoplakia among Indian tobacco smokers. *Int J Cancer* 2004;109:95–101.
 79. Xie H, Hou L, Shields PG, Winn DM, et al. Metabolic polymorphisms, smoking, and oral cancer in Puerto Rico. *Oncol Res* 2004;14:315–320.
 80. Buch SC, Notani PN, Bhisey RA. Polymorphism at GSTM1, GSTM3 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer in an Indian population. *Carcinogenesis* 2002;23:803–807.
 81. Jourenkova-Mironova N, Voho A, Bouchardy C, Wikman H, et al. Glutathione S-transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 genotypes and the risk of smoking-related oral and pharyngeal cancers. *Int J Cancer* 1999;81:44–48.
 82. Deakin M, Elder J, Hendrickse C, Peckham D, et al. Glutathione S-transferase GSTT1 genotype and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis* 1996;17:881–884.
 83. Park JY, Muscat JE, Ren Q, Schantz SP, et al. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:791–797.
 84. Anantharaman D, Chhabal PM, Kannan S, Bhisey RA, et al. Susceptibility to oral cancer by genetic polymorphisms at CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 loci among Indians: tobacco exposure as a risk modulator. *Carcinogenesis* 2007;28:1455–1462.
 85. Leichsenring A, Losi-Guembarovski R, Maciel ME, Losi-Guembarovski A, et al. CYP1A1 and GSTP1 polymorphisms in an oral cancer case-control study. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:1569–1574.
 86. Cha IH, Park JY, Chung WY, Choi MA, et al. Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 genes and susceptibility to oral cancer. *Yonsei Med J* 2007;48:233–239.
 87. Morita S, Yano M, Tsujinaka T, Akiyama Y, et al. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1999;80:685–688.
 88. Kao SY, Wu CH, Lin SC, Yap SK, et al. Genetic polymorphism of cytochrome P4501A1 and susceptibility to oral squamous cell carcinoma and oral precancer lesions associated with smoking/betel use. *J Oral Pathol Med* 2002;31:505–511.
 89. Kietthubthew S, Sriplung H, Au WW. Genetic and environmental interactions on oral cancer in Southern Thailand. *Environ Mol Mutagen* 2001;37:111–116.
 90. Sreelekha TT, Ramadas K, Pandey M, Thomas G, et al. Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol* 2001;37:593–598.
 91. Nomura T, Noma H, Shibahara T, Yokoyama A, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms in relation to the risk for oral cancer in Japanese drinkers. *Oral Oncol* 2000;36:42–46.
 92. Tanimoto K, Hayashi S, Yoshiga K, Ichikawa T. Polymorphisms of the CYP1A1 and GSTM1 gene involved in oral squamous cell carcinoma in association with a cigarette dose. *Oral Oncol* 1999;35:191–196.
 93. Katoh T, Kaneko S, Kohshi K, Munaka M, et al. Genetic polymorphisms of tobacco- and alcohol-related metabolizing enzymes and oral cavity cancer. *Int J Cancer* 1999; 83:606–609.
 94. Kihara M, Kubota A, Furukawa M, Kimura H. GSTM1 gene polymorphism as a possible marker for susceptibility to head and neck cancers among Japanese smokers. *Cancer Lett* 1997;112:257–262.
 95. Hung HC, Chuang J, Chien YC, Chern HD, et al. Genetic polymorphisms of CYP2E1, GSTM1, and GSTT1; environmental factors and risk of oral cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:901–905.
 96. Sharma A, Mishra A, Das BC, Sardana S, et al. Genetic polymorphism at GSTM1 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer. *Neoplasma* 2006;53:309–315.
 97. Gattas GJ, de Carvalho MB, Siraque MS, Curioni OA, et al. Genetic polymorphisms CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. *Head Neck* 2006;28:819–826.
 98. Drummond SN, De Marco L, Noronha JC, Gomez RS. GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004;40:52–55.
 99. Gronau S, Koenig-Greger D, Jerg M, Riechelmann H. GSTM1 enzyme concentration and enzyme activity in correlation to the genotype of detoxification enzymes in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Dis* 2003;9:62–67.
 100. Hahn M, Hagedorn G, Kuhlisch E, Schackert HK, et al. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity cancer. *Oral Oncol* 2002;38:486–490.
 101. Gupta C, Ray CS. Epidemiology of betel quid usage. *Ann Acad Med Singapore* 2004; 33(4 suppl):315–365.
 102. Ragin CC, Taioli E, Weissfeld JL, White JS, et al. 11q13 amplification status and human papillomavirus in relation to p16 expression defines two distinct etiologies of head and neck tumours. *Br J Cancer* 2006;95:1432–1438.
 103. Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, et al. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 2006; 31:259–266.
 104. Taioli E, Gaspari L, Benhamou S, Boffetta P, et al. Polymorphisms in CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and lung cancer below the age of 45 years. *Int J Epidemiology* 2003; 32:60–63.
 105. Rojas M, Cascorbi I, Alexandrov K, Kriek E, et al. Modulation of benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Carcinogenesis* 2000;21:35–41.
 106. Sram RJ. Effect of glutathione S-transferase M1 polymorphisms on biomarkers of exposure and effects. *Environ Health Perspect* 1998;106(suppl 1):231–239.
 107. Ryberg D, Skaug V, Hower A, Phillips DH, et al. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis* 1997;18:1285–1289.
 108. Weiserbs KF, Jacobson JS, Begg MD, Wang LW, et al. A cross-sectional study of polycyclic aromatic hydrocarbon—DNA adducts and polymorphism of glutathione S-transferases among heavy smokers by race/ethnicity. *Biomarkers* 2003;8:142–155.
 109. Peluso M, Neri M, Margarino G, Mereu C, et al. Comparison of DNA adduct levels in nasal mucosa, lymphocytes and bronchial mucosa of cigarette smokers and interaction with metabolic gene polymorphisms. *Carcinogenesis* 2004;25:2459–2465.
 110. Binkova B, Topinka J, Mrackova G, Gajdosova D, et al. Biomarkers in humans exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Mol Mutagen* 1997;29(S28): S19–S23.
 111. Mooney LA, Bell DA, Santella RM, Van Bennekum AM, et al. Contribution of genetic and nutritional factors to DNA damage in heavy smokers. *Carcinogenesis* 1997;18:503–509.
 112. Shields PG, Bowman ED, Harrington AM, Doan VT, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon—DNA adducts in human lung and cancer susceptibility genes. *Cancer Res* 1993;53:3486–3492.
 113. Pastorelli R, Guanci M, Cerri A, Negri E, et al. Impact of inherited polymorphisms in glutathione S-transferase M1, microsomal epoxide hydrolase, cytochrome P450 enzymes on DNA and blood protein adducts of benzo (a) pyrene-diolepoxide. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1998;7:703–709.
 114. Lodovici M, Luceri C, Guglielmi F, Bacci C, et al. Benzo(a)pyrene diol-epoxide (BPDE)-DNA adduct levels in lymphocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1 and mEH. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2004; 13:1342–1348.
 115. Lai C, Shields PG. The role of interindividual variation in human carcinogenesis. *J Nutr* 1999;129(suppl):552S–555S.
 116. Cheng YJ, Chien YC, Hildesheim A, Hsu MM, et al. No association between genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, NAT2, and nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:179–180.
 117. Slattery ML, Samowitz W, Murtaugh M, Sweeney C, et al. CYP1A1, cigarette smoking and colon and rectal cancer. *Am J Epidemiol* 2004;160:842–852.
 118. Li D, Jiao L, Li Y, Doll MA, et al. Polymorphisms of cytochrome P4501A2 and N-acetyltransferase genes, smoking and risk of pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2006;27:103–111.
 119. Kiyohara C, Yoshimasu K, Takayama K, Nakanishi Y, et al. EPHX1 polymorphisms and the risk of lung cancer: a HUGO review. *Epidemiology* 2006;17:89–99.
 120. Zheng Z, Park JY, Guillemette C, Schantz SP, et al. Tobacco carcinogen-detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with orolaryngeal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1411–1418.

ANEXO IV. ARTÍCULO SOBRE EL TABACO

Tobacco consumption and oral and pharyngeal cancer in a Spanish male population.

Authors: Varela-Lema L,^{1,2} Ruano-Ravina A,^{1,2,3} Juiz Crespo MA,³
Barros-Dios JM.^{1,3,5}

Authors' Affiliations

- (1) Department of Preventive Medicine & Public Health. University of Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. Spain.
- (2) Galician Agency for Health Technology Assessment. Galician Health Service. Santiago de Compostela. Spain.
- (3) CIBER de Epidemiología y Salud Pública. CIBERESP, Spain.
- (4) Centro de Saúde Porto do Son. A Coruña.
- (5) Preventive Medicine Service. Santiago de Compostela University Hospital. Galician Health Service.

Address Prof. A Ruano-Ravina.
Department of Preventive Medicine & Public Health.
School of Medicine. C/ San Francisco, s/n.
Santiago de Compostela 15782. SPAIN
e-mail: mr Albert@usc.es
Tel: +34-981581237; Fax: +34-981-5722282

Conflict of interests: none

Abstract (words)	100
Text (words)	2501
References (number)	66
Tables (number)	5
Figures (number)	0

Funding: This work was funded by the Galician Regional Research Authority (XUGA 208001B93).

Tobacco consumption and oral and pharyngeal cancer in a Spanish male population.

ABSTRACT

The incidence of oral and pharyngeal cancer in Spain is among the highest in Europe. A hospital-based case-control study was carried out in NW Spain to investigate the role of tobacco in this population. The study included 92 incident male cases and 230 male hospital controls. Tobacco smoking was strongly associated with oral and pharyngeal cancer ($OR_{\text{ever smokers}} = 27.7$). The risk for black tobacco ($OR = 33.1$) was approximately double that of blond tobacco ($OR = 15.4$). A very strong interaction was found with alcohol consumption. Leaving the habit reduced the risk immediately and risks were significantly lower when smoking started at later ages.

Key words

“mouth neoplasms”, “pharyngeal neoplasms”, “case-control study”, “smoking”, “risk factors”.

INTRODUCTION.

Cancer of the oral cavity and pharynx account for approximately 6% of all cancer cases in men and 3% of all cancers in women in the world [1]. Spain is the third European Community Country with the highest incidence rates of oral cavity cancer in males and trends are rising since 1983 [2]. The mortality rates in Galicia and other regions of Northern Spain are among the highest in our country.

Tobacco and alcohol have been recognized as the main risk factors for oral and pharyngeal cancers. Approximately 75-80% of these tumors are attributed to both factors [3, 4]. Epidemiologic studies performed in all continents have found an increased risk in smokers, but risk estimates exhibit important differences, finding that risks are excessively high in some countries of Latin America, Spain and Italy [4-9]. Results are inconsistent as to when carcinogenic effect begins (cigarette dose and duration of habit), how accumulative tobacco consumption and age at starting smoking influences risk and the time that must elapse before the risk of an ex-smoker equals that of a non-smoker. It is known that there is an interaction between tobacco and alcohol consumption, although the risk posed by different studies varies.

The objective of this study is to investigate the role of tobacco in the risk of oral and pharyngeal cancer in a Spanish population and assess the possible synergism with alcohol.

MATERIALS AND METHODS.

Design, subjects and settings.

Between 1996 and 2000 a hospital-based case-control study was carried out in the Santiago de Compostela Public Health Care Area (Galicia, NW Spain). A total of 93 consecutive-incident male cases with histopathologically confirmed diagnosis of primary oral or pharyngeal cancers (*International Classification of Diseases-10th revision* (ICD-10) locations C00-C14) were considered for study entry. The study was restricted to newly diagnosed patients over 20 years without a prior history of cancer. Tumors of the lip were excluded.

After consecutive sampling, a total of 236 male controls were selected from patients attending the Hospital Complex Preoperative Unit in the same period for non-smoking and non-alcohol related trivial surgery. Control patients should not have suffered from cancer and should not have had any oral disease. Subjects under 20 years were excluded. The type of surgery for controls comprised inguinal hernias, cataracts and orthopedic surgery. Informed consent was obtained from all study subjects prior to the interview. Only one case and 6 controls refused to participate in the study. The study protocol was approved by the Galician Ethical Research Committee.

Data collection and information retrieval

All study subjects were interviewed using a structured questionnaire. All interviews of case subjects were carried out prior to any major medical procedure that could potentially affect patient's habits or their ability to communicate or to recall information. The subjects were questioned about demographic and socioeconomic aspects and risk factors for oral and pharyngeal cancer, with a special emphasis on tobacco and alcohol use. For cases, the interview was before 15 days from diagnosis.

Smoking status was recorded as ever-smokers, current and ex-smokers. Ever-smokers were defined as those that smoked at least one cigarette per day for a minimum period of 6 months. Current smokers were defined as those having the habit at the time of the interview or within the six months before the

recruitment date. Ex smokers were defined as those who had quit more than six months earlier. Lifetime tobacco consumption was expressed as pack-years.

The frequency of alcohol consumption was recorded as never, occasional, one to six times per weeks and daily. For regular drinkers, the number of drinks consumed per day or per week was ascertained. Alcohol consumption was measured in “standard drink units” (SDUs), being one Spanish SDUs (1 glass of wine/1 beer/1 appetiser) equivalent to 10 g of alcohol and accounting distilled spirits for 2 SDUs [10]. Individuals were classified as non/light drinkers when they consumed less than 2 SDUs per day, moderate/heavy drinkers when they consumed 3-8 SDUs per day, very heavy drinkers when they drunk 8-12 SDUs per day and excessive drinkers when they consumed more than 12 SDUs per day. A category of non drinkers was not established because there were only 2 alcohol abstainers in the case group.

Occupations were classified as high or low risk taking into account the results of previous investigations on the association between occupation and oral and pharyngeal cancers [11-15].

Statistical analysis.

Data was analyzed using multivariate unconditional logistic regression models to obtain odds ratio (OR) with their 95% confidence intervals (CI). The regression models were adjusted for age, alcohol consumption in gr/week, high risk occupations and education level. The dependent variable was subject´s case or control status. As independent variables, the following were analyzed in successive models: a) smoking status, b) type of tobacco, c) smoking amount (cig/day), d) duration of habit, e) lifetime tobacco consumption (pack-yrs), f) years since quitting smoking, g) age at starting smoking and h) interaction with alcohol in a stratified fashion.

In order to explore the risk of oral and pharyngeal cancer among ex-smokers, these subjects were grouped into two categories (1-10 years and > 10 years of abstinence). The age of initiation was also categorized to study the effect of this variable, with the reference category being those that started to smoke after the

age of 15. In addition to age, alcohol consumption, occupation and education level, these regression models were also adjusted for lifetime tobacco consumption.

To examine the extent to which oral and pharyngeal cancer is associated with cigarette smoking among never/light drinkers and moderate/heavy drinkers we carried out a stratified analyses of these groups, calculating the odds ratios per lifetime tobacco consumption for different alcohol consumption categories. All the analyses were performed with SPSS 11.5 statistical package.

RESULTS.

The study population comprised a total of 322 male subjects, 92 cases and 230 controls. Table 1 summarizes the demographic and lifestyle sample characteristics. Smoking and alcohol consumption were more frequent among cases than controls.

The multivariate analysis showed that tobacco smoking was strongly associated with oral and pharyngeal cancer ($OR_{\text{ever smokers}} = 27.7$ CI95% 6.07-126.3). Current smokers showed about a 2 fold increased risk in comparison to ex-smokers. The risk for smokers of black tobacco ($OR = 33.1$ CI95% 6.03-168.8) approximately doubled that of blond tobacco smokers ($OR = 15.4$ CI95% 2.8-84.9) (table 2).

When we analyzed the intensity of smoking we found that the overall risk was approximately twofold in subjects that smoked more than 20 cigarettes per day in comparison to those that smoked between 1-20 cigarettes per day (table 3). The risk for current smokers was very high with independence of the amount smoked per day ($OR_{1-20 \text{ cig/day}} = 42.8$ CI95% 0.41-148.3; $OR_{>20 \text{ cig/day}} = 46.9$ CI95% 3.4-871.5). For ex-smokers the ORs estimates appeared to be only statistically significant for those subjects that smoked more than 20 cigarettes per day ($OR = 30.8$ CI95% 2.5-384.6).

Analysis of smoking duration showed that the risk of oral and pharyngeal cancer remained fairly constant in the first 30 years of smoking, but doubled after that time (table 3). The relationship between lifetime tobacco consumption (pack-years) and oral and pharyngeal cancer risk followed a strong, dose-response like relationship overall ($OR_{1-40 \text{ pack-years}} = 15.6$ CI95% 2.8-87.1; $OR_{>40 \text{ pack-years}} = 46.5$ CI95% 8.2-264.2). For ex-smokers the risk was only relevant in the category of subjects that consumed more than 40 pack-years, reaching in this group a similar value to that found in current smokers.

When we explored the association with years since quitting smoking we found that the risk in ex-smokers experienced important reductions within the first 10 years of leaving the habit, even though these reductions were only significant after 10 years since quitting (table 4). Analyzing the relationship with age at

starting smoking we found that risk estimates were slightly higher for those that started smoking before the age of 15 than those that started this habit at later ages.

Table 5 shows the risk of oral and pharyngeal cancer according to tobacco smoking related characteristics among non/light drinkers and moderate/heavy drinkers. Non drinkers were grouped together with light drinkers because there were only 5 cases that consumed less than 2 drinks per day. In comparison to non-smokers, smokers that were non/light drinkers showed non-significant risk estimates. The magnitude of the risk in this group seemed to increase with frequency and pack-years of cigarette smoking but did not reach significant levels. In moderate to heavy drinkers strong associations were found for all smoking categories analyzed and risks increased considerably with cigarette consumption, duration and cumulative exposure.

DISCUSSION.

Cigarette smoking is a very strong risk factor for oral and pharyngeal cancer in the Galician population (NW Spain). The magnitude of the risk is very high in comparison to those reported in previous case-control studies [4, 6, 7, 16-22]. A strong synergistic effect with alcohol consumption is shown. Significantly lower risks of oral and pharyngeal cancer were found for those that started smoking at later ages in comparison to those starting younger.

Similar excessive risks associated with tobacco have been reported in our area for other smoking related cancers such as oesophageal [23] and lung cancer [24]. Even though we do not have incidence data for oral and pharyngeal cancer in Galicia, mortality rates suggest that it is among the highest in Spain and thus in Europe, suggesting that this region might have different tobacco consumption or smoking patterns modifying risk factors for these cancers [21, 25].

The widespread use of black tobacco in this region might be partly responsible for the high risk observed. 88% of the cases and 79% of the controls smoked black tobacco. Many studies are consistent with the fact that the risk of developing tobacco-related cancers is higher among black tobacco smokers than blond tobacco smokers [26-30]. In agreement with this, it can be seen that studies that have been carried out in countries where black tobacco is common (South Europe and Latin America) [5, 7-9, 22, 31-34] show higher risks for oral and pharyngeal cancer than those carried out in countries where the main type of tobacco consumed is blond (North America and Western Europe) [35, 36]. Furthermore, in the present study we found that blond tobacco smokers seemed to experience significant risks only after high lifetime consumptions but this association could not be properly analyzed due to the fact that only 11 cases were blond-tobacco smokers (data not shown). The results published by Castellsagué et al [4] in the largest case-control study carried out in Spain seem to support this theory as do other studies carried out in countries where blond tobacco is predominant [36, 37].

The higher concentrations of carcinogenic substances such as N-nitrosamine and 2-naphtylamine in black tobacco smoke in comparison to blond tobacco [38] could clearly explain the pattern observed with tobacco type. Since in the present study nearly 100% of black tobacco smoked is of traditional Spanish brands it can not be dismissed that other variables such as paper composition, types of additives, type of filter, and inhalation patterns might also be implicated in the high risk observed [39].

When we investigated the risk in current smokers we observed that the risk was very high with independence of smoking amount or habit duration. This pattern of risk is not shared by some of the previous studies where they found a clear dose-response relationship with smoking amount and habit duration [5, 6, 8, 18]. Even though these findings are unclear we hold the hypothesis that they could be partly attributed to the very high alcohol consumption in our population, in comparison to other regions [40]. In fact, in the present study around 70% of cancer cases were heavy to excessive drinkers. It is recognised that chronic alcohol consumption can interfere with nutritional intake or bioavailability, enhance the penetration of carcinogens within the oral mucosa, reduce immune function, cause genotoxicity or enhance activation of carcinogenic agents, diminish folate intake or interfere with DNA repair or inhibit carcinogenic detoxification [41-45].

Regarding ex-smokers, they presented significant risks only after long lifetime accumulative exposures and risk decreased soon after leaving the habit, even though reductions were only significant after 10 years of ceasing smoking. Previous studies are inconsistent as to the time that must elapse before risk in ex-smokers returns to baseline levels, ranging values from immediately after [32, 36] to over 20 years of ceasing smoking [4, 20]. These differences suggest that the association between oral and pharyngeal cancer is very complex and that there might be different factors involved in accumulation and reparation of genetic events that lead to cancer.

One interesting result found was the significantly higher risk observed for smokers that started the habit before the age of 15 in comparison to those that started the habit at later ages. Support for the observation of a decline in risk with an increase in the age of initiation is found in some early studies [5, 22, 46] and can be partly explained by the fact that smoking may be responsible for physiological changes among young smokers, entailing an increase in the persistence of DNA adducts [24].

We observed that the risk was not significant for any of the categories evaluated in the non/low drinking subgroup. Such findings are consistent with other available evidence [47, 48] but the very low number of non/light drinkers (n=4) in our study greatly decreases the precision of the estimates for this subgroup.

The present study has some other limitations. Case-control studies can be easily influenced by information or selection bias. To avoid selection bias we have tried to identify all incident cases of oral and pharyngeal cancer by reviewing anatomopathology results in collaboration with clinicians. The bias in the selection of control subjects was also minimized by excluding patients with other oral and pharyngeal conditions, other cancers or other conditions potentially related to alcohol and smoking consumption. The participation in our study was very high (99% of cases, 97,3% of controls) and this is also a guarantee that selection bias was minimal. It must be mentioned that a small percentage of control interviews had to be carried out at home. It cannot be dismissed that patients with less serious diseases (whether interviewed at home or in hospital) underreport their alcohol and cigarette uptake and this would overestimate the risk. Cases were interviewed before any treatment was administered to avoid the interference of this on smoking and drinking habits. Finally, the power of our study was hampered by the fact that we only had 2 cases that were non smokers. The fact that we included only male patients might be a reason for this finding.

In conclusion, tobacco is a strong risk factor for oral and pharyngeal cancer in the Galician Region. Black tobacco presents a higher risk than blond tobacco. Our study displayed that leaving the habit reduces the risk immediately and

that risks are significantly lower when smoking starts at later ages, having this important implications in terms of prevention. A very strong increase of the risk of smoking was found with alcohol consumption indicating that smokers that are high alcohol drinkers have many more chances of developing oral and pharyngeal cancer.

Table 1. Distribution of subjects according to demographic variables

Characteristics of patients	Controls (n=230)	Cases (n=92)
Age		
Range	23-86	34-83
Mean (CI95%)	60.5 (58.83-62.11)	55.02 (52.73-57.31)
Education level		
No studies accounted for	70 (30.4%)	25 (27.5%)
Primary school	135 (58.7%)	63 (69.2%)
Secondary school	19 (8.3%)	2 (2.2%)
University	6 (2.6%)	1 (1.1%)
Smoking status		
Never smoker	82 (35.7%)	2 (2.2%)
Former smoker	81 (35.2%)	17 (18.5%)
Current smoker	67 (29.1%)	73 (79.3%)
Smoking amount* (cigs/day)		
1-20		
21-40	98 (66.2%)	44 (48.9%)
> 40	41 (27.7%)	38 (42.2%)
	9 (6.1%)	8 (8.9%)
Duration of smoking habit in years*		
Mean (CI95%)		
1-20	33.7 (31.2-36.2)	35.3 (32.7-38)
21-30	28 (18.9%)	6 (6.7%)
31-40	34 (23%)	23 (25.6%)
> 40	38 (25.7%)	31 (34.4%)
	48 (32.4%)	30 (33.3%)
Age of starting smoking*		
Range	(8-51)	(8-55)
Mean (CI95%)	16.3 (14.8-17.8)	11.4 (10.2-12.7)
Drinking habit		
Non/light drinker (\leq 2 SDUs per day) (0-140 gr/week)	76 (33%)	5 (5.4%)
Moderate/heavy drinker (2-8 SDUs per day) (141-560 g/week)	102 (44.3%)	22 (23.9%)
Very heavy drinkers (8-12 SDUs per day) (561-840 g/week)	30 (13%)	22 (23.9%)
Excessive drinkers (>12 SDUs per day) (> 841 g/week)	22 (9.6%)	43 (46.7%)
High risk occupations		
No	100 (43.5%)	15 (16.3%)
Yes	130 (56.5%)	77 (83.7%)

SDSs=standard drink units (1 glass of wine/1 beer/1 appetizer drink)

*Percentages calculated for ever smokers.

Table 2. Risk of oral and pharyngeal cancer according to smoking status and type of tobacco smoked.

	No of subjects (%)		OR crude ¹ (95% CI)	OR adjusted ² (95%CI)
	Cases (n=92)	Controls (n=230)		
Smoking status				
Never smoker	2	82	1.00 (reference)	1.00 (reference)
Ever smokers	90	148	25.5 (6.1-107.7)	27.7 (6.1-126.3)
Current smokers	73	67	41.4 (9.8-175.4)	34.5 (7.5-157.8)
Ex-smokers	17	81	9.2 (2.1-41.6)	14.8 (2.9-73.5)
Type of tobacco				
Blond	11	31	11.5 (2.4-55.7)	15.4 (2.8-84.9)
Black	79	105	36.2 (8.4-155.8)	33.1 (7.2-152.8)
Indistinctive	0	13	-	-

¹ Adjusted for age; ² Adjusted for age, alcohol consumption in gr/week (4 categories), occupations at risk (2 categories), education level (4 categories) and lifetime tobacco consumption (3 categories).

Table 3. Risk of oral and pharyngeal cancer according to smoking amount, duration of habit and lifetime cigarette consumption (pack-years).

	No of subjects (%)		OR crude ¹ (95% CI)	OR adjusted ² (95%CI)
	Cases (n=92)	Controls (n=230)		
Smoking amount (cigs/day)²				
<i>Never smokers</i>	2	82	1.00 (reference)	1.00 (reference)
<i>Ever smokers</i>				
1-20	44	98	19.1 (4.4-82.1)	7.5 (1.02-54.7)
21-40	38	41	37.8 (8.6-166.4)	13.5 (1.7-104.9)
> 40	8	9	35.4 (6.4-195.1)	15.8 (1.56-160.8)
<i>Current smokers</i>				
1-20	39	38	39.1 (8.9-171.1)	42.8 (3.9-755.2)
> 20	34	29	44.6 (10.0-198.0)	46.9 (3.4-871.5)
<i>Ex-smokers</i>				
1-20	5	60	3.6 (0.67-19.5)	3.5 (0.3-36.7)
> 20	12	21	23.8 (4.9-115.4)	30,8 (2.5-384.6)
Duration of smoking habit (yrs)³				
<i>Never smokers</i>	2	82	1,00 (reference)	1,00 (reference)
<i>Ever smokers</i>				
1-20				
21-30	6	28	7.6 (1.3-42.7)	7.8 (1.1-56.3)
31-40	23	36	20.8 (4.4-98.4)	8.3 (1.3-52.6)
> 40	31	37	46.5 (9.5-227.4)	18.4 (2.9-117.3)
<i>Current smokers</i>	30	47	88.9 (15.8-501.2)	20.7 (2.9-143.5)
1-30				
> 30	25	22	32.5 (6.9-153.9)	24,5 (3.3-183.2)
<i>Ex-smokers</i>	48	45	46.6 (10.6-204.2)	24.2 (3.6-126.6)
1-30				
> 30	4	40	3.8 (0.65-22.6)	0.8 (0.07-8.5)
	13	41	26.1 (4.4-155.6)	2.7 (0.23-31.8)
Lifetime tobacco consumption (pack-yrs)⁴				
<i>Never smokers</i>	2	82	1.00 (reference)	1.00 (reference)
<i>Ever smokers</i>				
1-40	36	88	15.5 (3.5-68.2)	15.6 (2.8-87.06)
> 40	54	60	51.65 (11.5-232.5)	46.5 (8.2-264.2)
<i>Current smokers</i>				
1-40	31	34	30.0 (6.7-13.9)	27.5 (4.6-165.4)
> 40	42	33	54.8 (12.3-242.7)	40.0 (6.8-234.4)
<i>Ex-smokers</i>				
1-40	5	54	4.05 (0.7-22.2)	4.4 (0.71-27.3)
>40	12	27	26.9 (4.99-145.2)	42.7 (6.6-278.05)

¹ Adjusted for age; ² Adjusted for age, alcohol consumption in gr/week (4 categories), habit duration (3 categories), high risk occupation (yes/no) and education level; ³ Adjusted for age, alcohol consumption in gr/week (4 categories), smoking amount (3 categories), high risk occupation (yes/no) and education level; ⁴ Adjusted for age, alcohol consumption in gr/week (3 categories), high risk occupation (yes/no) and education level

Table 4. Risk of oral and pharyngeal cancer according to years since quit smoking and age at starting smoking.

	No of subjects (%)		OR crude ¹ (95% CI)	OR adjusted ² (95%CI)
	Cases (n=92)	Controls (n=230)		
Years since quitting smoking				
Current smokers	73	67	1.00 (reference)	1.00 (reference)
1-10	10	31	0.3 (0.14-0.7)	0.6 (0.2-1.5)
> 10	7	50	0.1 (0.1-0.4)	0.3 (0.1-0.9)
Never smokers				
1-10	10	31	13.7 (2.8-66.8)	3.5 (0.4-28.7)
> 10	7	50	6.2 (1.2-31.6)	2.9 (0.4-20.7)
Age at starting smoking				
≤ 15 years	49	55	1.00	1.00
> 15 years	58	93	0.4 (0.2-0.8)	0.5 (0.2-0.9)

¹ Adjusted for age; ² Adjusted for age, lifetime tobacco consumption (3 categories), alcohol consumption in gr/week (4 categories), high risk occupation (yes/no) and education level (4 categories).

Table 5. Risk of oral and pharyngeal cancer

	Non/light drinkers (≤ 2 SDUs* a day)			Moderate/heavy drinkers (> 2 SDUs a day)		
	Cases	Controls	OR (95%CI) ¹	Cases	Controls	OR (95%CI) ¹
Smoking status						
<i>Never smokers</i>	1	32	1.00 (reference)	1	50	1.00 (reference)
<i>Ever smokers</i>	4	44	3.7 (0.38-35.8)	86	104	44.9 (4.9-411.8)
Type of tobacco						
Blond	1	10	3.5 (0.3-371)	10	21	18.5 (1.8-191.6)
Black	3	29	6.4 (0.3-142.9)	76	75	59.1 (6.4-546.3)
Smoking amount (cigs/day)						
1-20	2	30	2.4 (0.2-28.9)	42	68	32.4 (3.6-293.2)
> 20	2	14	8.2 (0.6-11.2)	44	36	62.7 (6.9-569.7)
Duration of habit (yrs)						
1-30	2	20	4.3 (0.31-57.9)	27	42	20.3 (2.05-201.9)
> 30	2	24	3.2 (0.2-43.7)	59	62	77.2 (7.8-757.5)
Lifetime tobacco consumption (pack-yrs)						
1-40 pack-years	2	29	2.4 (0.2-29.3)	34	59	24.5 (2.6-228.8)
> 40	2	15	8.4 (0.6-121.2)	52	45	74.4 (8.02-390.6)

*SDU= standard daily unit

¹ Adjusted for age, high risk occupation (yes/no) and education level.

- [1]. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancerbase n°5, version 2.0, IARC Press, Lyon. 2004.
- [2]. Grupo de trabajo del Area de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. La situación del cáncer en España. Ministerio de Sanidad y Consumo. 2007.
- [3]. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988;48:3282-7.
- [4]. Castellsague X, Quintana MJ, Martínez MC, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2004;108:741-49.
- [5]. Garrote LF, Herrero S, Ortiz Reyes RM, et al. Risk factors for cancer of oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *Br J Cancer.* 2001;85(1):46-54.
- [6]. Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, González-Navarro A, Cero-Lapiedra R, González-Hernández MJ, Domínguez-Rojas V. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Spain. *Oral Oncol.* 2000;36:170-74.
- [7]. Talamini R, Vaccarella S, Barbone F, et al. Oral hygiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer. *Br J Cancer.* 2000;82:1238-42.
- [8]. De Stefani E, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, et al. The effect of smoking and drinking in oral and pharyngeal cancers: a case-control study in Uruguay. *Cancer Letters.* 2007;246:282-9.
- [9]. Bosetti C, Gallus S, Peto R, et al. Tobacco smoking, smoking cessation, and cumulative risk of upper aerodigestive tract cancers. *Am J Epidemiol.* 2008;167:468-73.
- [10]. Gual A, Rodriguez M, Lligoña A, Llopis JJ. Does the concept of a standard drink apply to viticultural societies? *Alcohol & Alcoholism.* 1999;34:153-60.
- [11]. Merletti F, Boffetta P, Ferro p, Pisani P, Terracini B. Occupation and cancer of the oral cavity or oropharynx in Turin, Italy. *Scand J Work Environ Health.* 1991;17:248-54.
- [12]. Schildt E-B, Eriksson M, Lennart H, Magnuson A. Occupational exposures as risk factors for oral cancer evaluated in a Swedish case-control study. *Oncology Reports.* 1999;6:317-20.
- [13]. Huebner WW, Schoenberg JB, Kelsey JL, et al. Oral and pharyngeal cancer and occupation: a case control study. *Epidemiology.* 1992;3:300-9.
- [14]. Andreotti M, Rodrigues AN, Cardoso LM, Figueiredo RA, Eluf-Neto J, Wunsch-Filho V. Occupational status and cancer of the oral cavity and oropharynx. *Cad Saude Publica.* 2006;22(3):543-52.
- [15]. Olsen JH, Jensen OM. Occupation and risk of cancer in Denmark: an analysis of 93810 cancer cases, 1970-1979. *Scand J Work Environ Health.* 1987;13(Suppl 1):7-91.

- [16]. Macfarlane GF, Zheng T, Marshall JR, et al. Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer. *Oral Oncol.* 1995;31:181-87.
- [17]. Gandini S, Botteri E, Iodice S, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2008;122:155-64.
- [18]. Franceschi S, Favero A, Conti E, et al. Food groups, oil and butter and cancer of the oral cavity and pharynx. *Br J Cancer.* 1999;80(3/4):614-20.
- [19]. Lissowska J, Pilarska A, Pilarski P, et al. Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev.* 2003;12:25-33.
- [20]. Lewin F, Norell SE, Johansson H, et al. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 1998;82:1367-75.
- [21]. Sánchez MJ, Martínez C, Nieto A, et al. Oral and pharyngeal cancer in Spain: influence of dietary patterns. *Eur J Cancer.* 2003;12(1):49-56.
- [22]. Franceschi S, Talamini R, Barra S. Smoking and drinking in relation to cancers of oral cavity, pharynx, larynx and esophagus in Northern Italy. *Cancer Res.* 1990;50: 6502-07.
- [23]. Aragonés N, Ramis R, Pollán M, et al. Oesophageal cancer mortality in Spain: a spatial analysis. *BMC.* 2007;7(3).
- [24]. Ruano Raviña A, Figueiras A, Montes-Martínez A, Barros-Dios JM. Dose-response relationships between tobacco and lung cancer: new findings. *Eur J Cancer Prev.* 2003;12:257-63.
- [25]. Ragin CCR, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res.* 2007;86:104-14.
- [26]. Sancho-Garnier R, Theobald S. Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco and cancer risk II: Pharynx and larynx cancer. *Eur J Cancer.* 1993;29A(2):273-6.
- [27]. De Stefani E, Boffetta P, Oreggia F, Mendilaharsu M, Deneo-Pellegrini H. Smoking patterns and cancer of the oral cavity and pharynx: a case-control study in Uruguay. *Oral Oncol.* 1998;34(5):340-6.
- [28]. Benhamou S, Sancho-Garnier H. Black and blond tobacco smoking: a review. *Cancer Detect Prev.* 1993;17(1).
- [29]. Armadans-Gil L, Vaqué-Rafart J, Rosselló J, Olona M, Alsedà M. Cigarette smoking and male lung cancer risk with special regard to type of tobacco. *Int J Epidemiology.* 1999;28:614-9.
- [30]. Samanic C, Kogevinas M, Dosemeci M, et al. Smoking and bladder cancer in Spain: Effects of tobacco type, timing, environmental tobacco smoke and gender. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2006;15(7):1348-54.
- [31]. Negri E, La Vecchia C, Franceschi S, Tavani A. Attributable risk for oral cancer in Northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 1993;2:189-93.
- [32]. Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case control study. *Int J Cancer.* 1989;43:992-1000.
- [33]. de Stefani E, Boffetta P, Oreggia F, Mendilaharsu M, Deneo-Pellegrini H. Smoking patterns and cancer of the oral cavity and pharynx: a case-control study in Uruguay. *Oral Oncol.* 1998;34:340-6.

- [34]. Bosetti C, Gallus S, Trichopoulou A, et al. Influence of the Mediterranean diet on the risk of cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2003;12:1091-94.
- [35]. Rosenquist K. Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population based case-control study in southern Sweden. *Swe Dent J Suppl.* 2005;179:1-66.
- [36]. Day GL, Blot WJ, Austin DF, et al. Racial differences in risk in oral and pharyngeal cancer: alcohol, tobacco and other determinants. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:465-73.
- [37]. Bundgaard T, Wildt J, Frydenberg M, Elbrond O, Nielsen JE. Case control study of squamous cell cancer of the oral cavity in Denmark. *Cancer Causes Control.* 1995;6:57-67.
- [38]. Vineis P, Pirastu R. Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes Control.* 1997;8:346-55.
- [39]. López-Abente G, González CA, Errezola M, et al. Tobacco smoke inhalation pattern, tobacco type and bladder cancer in Spain. *Am J Epidemiol.* 1991;134(8):830-9.
- [40]. Ruano Raviña A, Figueiras A, Barrios-Dios JM. Type of wine and risk of lung cancer: a case control study. *Thorax.* 2004;59:981-85.
- [41]. Seitz HK, Stickel F, Homann N. Pathogenetic mechanisms of upper digestive tract cancer in alcoholics. *Int J Cancer.* 2004;108:483-7.
- [42]. Reis SR, do Esparito Santo AR, Andrade MG, Sadigursky M. Cytological alterations in oral mucosa after chronic exposure to ethanol. *Braz Oral Res.* 2006;20(2):97-102.
- [43]. Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer- a review. *Oral Oncol.* 1998;34:441-47.
- [44]. Blot WJ. Alcohol and cancer. *Cancer Res.* 1992;52:2119s-23s.
- [45]. Lewis S, Campbell S, Jr., Proudfoot E, Weston A, Cotter T, Bishop JF. Alcohol as a cause of cancer. Sydney, Cancer Institute NSW. May 2008.
- [46]. Talezaki T, Hirose K, Inoue M, et al. Tobacco, alcohol and dietary factors associated with the risk of oral cancer among japanese. *Jpn J Cancer Res.* 1996;87(555-62).
- [47]. Macfarlane GF, Zheng T, Marshall JR, et al. Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Oral Oncol, Eur J Cancer.* 1995;31B:181-7.
- [48]. Hashibe M, Brennan P, Strange RC, et al. Meta- and pooled analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Dec;12(12):1509-17.

ANEXO V. ARTÍCULO SOBRE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Clinical Study

CYP1A1, mEH, and GSTM1 Polymorphisms and Risk of Oral and Pharyngeal Cancer: A Spanish Case-Control Study

L. Varela-Lema,^{1,2} A. Ruano-Ravina,^{1,2,3} M. A. Juiz Crespo,⁴ K. T. Kelsey,⁵
L. Loidi,⁶ and J. M. Barros-Dios^{1,3,6}

¹ Department of Preventive Medicine and Public Health, University of Santiago de Compostela,
15782 Santiago de Compostela, Galicia, Spain

² Galician Agency for Health Technology Assessment, Galician Health Service, 15782 Santiago de Compostela, Galicia, Spain

³ Biomedical Research Centre Network for Epidemiology and Public Health (CIBERESP), 08003 Barcelona, Spain

⁴ Centro de Saúde Porto do Son, 15970 A Coruña, Spain

⁵ Department of Genetics and Complex Diseases, Harvard School of Public Health, MA 02115, USA

⁶ Unit of Molecular Medicine, Santiago de Compostela University Hospital, Galician Health Service,
15706 Santiago de Compostela, Galicia, Spain

Correspondence should be addressed to A. Ruano-Ravina, mralbert@usc.es

Received 21 May 2008; Accepted 22 July 2008

Recommended by Youcef M. Rustum

Background. Genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes involved in the detoxification pathways of carcinogenic substances may influence cancer risk. **Methods.** Case-control study that investigates the relationship between CYP1A1 Ile/Val, exon 4 mEH, and GSTM1 null genetic polymorphism and the risk of oral and pharyngeal cancer examining the interaction between these genes, tobacco, and alcohol. 92 incident cases and 130 consecutive hospital-based controls have been included. **Results.** No significant associations were found for any of the genotypes assessed. The estimated risk was slightly elevated in subjects with the wild type of the mEH gene and the null GSTM1 genotype. For exon 4 mEH heterozygous polymorphism, the risk was slightly lower for heavy smokers than for light smokers. The inverse association was observed for the GSTM1 null genotype. **Conclusions.** The results suggest that exon 4 mEH and GSTM1 null polymorphisms might influence oral and pharyngeal cancer.

Copyright © 2008 L. Varela-Lema et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. Introduction

Oral and pharyngeal cancers represent an important problem worldwide. The incidence and prevalence rates for these tumors are double in men than in women. Cancers of the oral cavity rank as the eighth most common cancer among men, being responsible for 3% of the cancers diagnosed in this gender [1]. Mortality rates are substantially lower than incidence rates. According to the World Health Organization (WHO) data, the standardized mortality rate for 2002 was 2.2 deaths per 100 000 population.

Tobacco and alcohol are the main risk factors for oral and pharyngeal cancers. In USA and Europe, they are responsible for 75–80% of these tumors [2, 3]. Epidemiologic studies performed in all continents have found an increased risk in smokers, which seems to rise with daily consumption

and duration [4–7]. There is also sufficient evidence to conclude that excessive consumption of alcoholic beverages is associated with oral and pharyngeal cancers, causing in some cases risks higher than those found for smokers [8–10].

The reason why some individuals develop cancer and others do not can be attributed, at least partly, to variations in genetic polymorphisms responsible for metabolizing carcinogenic substances found in tobacco and alcohol. Although many genes have been associated with metabolism of these compounds, some with the highest rational of those being involved are CYP1A1, mEH, and GSTM1.

The CYP1A1 gene belongs to the CYP1 subfamily and encodes for the enzyme aryl hydrocarbon hydrolase, which is involved in the activation of many polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic amines [11] and is present in oral tissue [12]. This enzyme is implicated in the metabolism

of benzo[a]pyrene, a potent tobacco carcinogen. Various studies have shown that CYP1A1 catalyzes the initial conversion of benzo[a]pyrene to 7,8 dihydrodiol-9,10-oxide [13, 14]. Two CYP1A1 polymorphisms have been related to different tumors, including head and neck cancers. One of these is a single-base substitution of adenine to guanine at position 2455 in the heme-binding region of exon 7, which induces an amino acid change in isoleucine to valine at codon 462, known as the Ile/Val or exon 7 polymorphism (Ile 462 Val) or CYP1A1*2C. This mutation has also been referred to as mutation m2. The Ile/Ile genotype corresponds to the wild type, and Ile-Val and Val-Val to the heterozygous and homozygous genotypes for the mutant allele, respectively [15]. This mutation is rare in Caucasians, and is in complete linkage disequilibrium with the CYP1A1 MspI mutation (CYP1A1*2B) [16].

The microsomal form of epoxide hydrolase is primarily associated with the metabolism of exogenous xenobiotic compounds. Its interest in oral and pharyngeal cancers comes from the fact that it has been detected in all tissues including the aerodigestive tract and catalyzes the hydrolysis of arene, alkene, and aliphatic epoxides from polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic amines [17]. Enzymatically, mEH catalyzes the hydrolysis of epoxides to trans-dihydrodiols [18, 19]. Two polymorphisms in the mEH gene have been reported [20, 21]. The first polymorphism is produced as a consequence of a substitution of C → T within exon 3 of the gene and results in a substitution of His to Tyr in amino acid position 113. This polymorphism is known as the "slow allele" since *in vitro* studies show a 40–60% decrease in enzyme activity in comparison to the wild type. This allele is also known as HYL*2. In the second polymorphism, G substitutes A in exon 4, leading to an emplacement of histidine for arginine in the amino acid position 139 (139 Arg → His). This polymorphism is known as the fast allele HYL*3 since it produces a 25% increase in enzyme activity *in vitro*. Tyr is the predominant amino acid at the 113 position in Caucasian populations, and His is the most predominant at position 139.

The glutathione S transferase (GST) comprises a family of phase II detoxifying enzymes that catalyze a great number of detoxification reactions that take place between the cytosolic glutathione and compounds containing an electrophilic centre [22]. The GST substrates include acetaldehyde and several polycyclic aromatic hydrocarbons found in tobacco smoke. The GSTM1 is involved in the detoxification of benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-oxide [23]. Metabolism of this carcinogen involves a balance between the activation steps mediated by the epoxide hydrolase and the cytochrome system and the detoxification steps, involving GSTM1, that inhibit the activity of the DNA binding intermediates and catalyze the conversion of the reactive electrophiles to inactive, water-soluble conjugates that can be easily removed [13]. Even though frequencies of GSTM1 null genotypes vary among different ethnic groups, in white Caucasians, it is deleted in approximately 50% of the population [24–33].

In the present case-control study, we aimed to examine the relationship between the CYP1A1 Ile/Val, exon 4 mEH (139 Arg → His), and GSTM1 null genetic polymorphism

and the risk of oral and pharyngeal cancers, investigating also the association with smoking, drinking, and the gene-gene interactions.

2. Patients and Methods

2.1. Design, Subjects, and Settings. The present hospital-based case-control study was conducted at the Santiago de Compostela University Hospital Complex (Galicia, NW Spain) between January 1996 and January 2000. Data was collected on a total of 92 incident Caucasian male cases with histopathologically confirmed diagnosis of primary oral or pharyngeal cancers. The study was restricted to newly diagnosed patients over 20 years of age without a prior history of cancer. For study purposes, tumors of the lip were excluded.

A total of 130 consecutive controls were included from patients attending the Hospital Complex Preoperative Unit for nonsmoking- and nonalcohol-related trivial surgery. The inclusion criterion for controls was absence of prior history of cancer. Subjects under 20 years of age were excluded. The types of surgical procedures controls were scheduled to undergo mainly comprised inguinal hernias, cataracts, and orthopedic surgery. Informed consent was obtained from all study subjects prior to the interview and the extraction of total blood. Only 1 case and 6 controls refused to participate in the study. The study protocol was approved by the Galician Ethical Research Committee.

2.2. Information Retrieval. All study subjects were interviewed by a person purpose-trained to administer a structured questionnaire addressing various aspects of lifestyle, with special emphasis on smoking habit, alcohol consumption, occupation, and other activities related to the development of oral and pharyngeal cancers. For cases, the interview was done as soon as possible after cancer was detected and always within 15 days from diagnosis. The questionnaire used was previously applied to a group of individuals fulfilling the characteristics of the subjects going to be included and all questions with difficult interpretation were duly amended.

2.3. Laboratory Methods. After cases and controls were identified, whole blood samples of 6 mL were collected from each subject in heparin-containing tubes. The samples were stored at 4°C and centrifuged at 2800 rpm for at least 10 minutes within the next 24 hours. The three independent fractions were isolated and stored at –84°C until analysis. DNA was extracted from the buffy coat of middle layer containing monocytes. The cells were washed with TE (10x) and centrifuged at 3000 rpm during 10 minutes several times until they were cleaned. The pellet was then treated with lysis buffer and proteinase K in 1% SDS previous to the extraction of DNA with phenol-chloroform and ethanol precipitation similarly as previously described [34]. The DNA was precipitated in the presence of high concentrations of ammonium acetate (to further purify the DNA) and resuspended in TE to approximately 300 µg/mL. The genotyping assays were

performed at the Molecular Medicine Unit of the Santiago de Compostela University Hospital Complex.

Genotyping for GSTM1 was carried out in the whole sample using a modified PCR method described previously [35]. Reactions were carried out in a final volume of 12.5 μ L containing 20 mM Tris-HCl (PH 8.4), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.25 μ M of each GSTM1 primer, 0.25 μ M of each β -globin primer (internal control), 1 U Taq DNA polymerase (Promega), 2 μ M each dNTPs, and 600–900 ng of DNA. The GSTM1 primers were 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAGC and 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG. A negative control was included in all batches. The PCR conditions were 94° for 3 minutes, followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 58°C for 30 seconds, 72°C for 45 seconds, and a final extension of 72°C for 7 minutes.

To analyse the exon 4 mEH polymorphism (EH¹³⁹ arg), a 357-bp fragment containing the polymorphic site was amplified [36]. The PCR was performed in all subjects using the sense primer 5'-GGGGTGCCAGAGCCTGACCGT-3' and the antisense primer 5'-AACACCGGGCCACCCCTGGC-3' (Sigma-Genosys). The PCR cycling conditions were 95°C for 2 minutes, followed by 35 cycles at 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds, with a final step at 72°C for 7 minutes. After PCR amplification, 10 μ L of the PCR product was digested overnight at 37°C with 10U of RsaI (Invitrogen). The wild-type genotype (AA) produced 295-bp and 62-bp bands, the heterozygous genotype (AG) yielded 295-bp, 174-bp, 121-bp, 62-bp; and the rare allele (GG) gave 174-bp, 121-bp, and 62-bp bands.

The Ile-Val polymorphism was analysed in only 158 of the 222 individuals included using an allele-specific oligonucleotide-PCR procedure previously described by Hayashi et al. [16]. In the same reaction mix, two primers with different terminal bases (1A1A or 1A1G), which contained the polymorphic site at the 3' end, were added (1A1G: 5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT-3' and 1A1A: 5'-AAG-ACCTCCCAGCGGGCAAT-3') in conjunction with another strand of primer (1A1.1: 5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT-3'). Two amplification reactions were necessary for each one of the subjects analysed, one with the primers 1A1.1/1A1A which recognize the Ile462 allele and another with the primers 1A1.1/1A1G which recognize the Val462 allele. PCR was carried out at 30 cycles under the following conditions: 30 seconds at 95° for denaturing, 1 minute at 60°C for primer annealing, and 1 minute at 72°C for primer extension.

All the products were electrophoresed on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light. To test for eventual contamination, negative controls were introduced in each run.

2.4. Statistical Analysis. Logistic regression was employed to analyse the effect of each of the genes studied. The wild type gene was considered as the reference category for each gene in each analysis. All the regressions were adjusted for age, tobacco consumption in pack-years, and alcohol consumption in grams/week. For analyzing the effect of the different polymorphisms across different categories

of tobacco and alcohol consumption, the cutpoint was established on the median creating two categories, low and high consumption in order to achieve a higher statistical power. In all analyses, the dependent variable was the status of case or control and the risks were expressed as ORs with CI 95%. All the analyses were performed with SPSS 11.5 statistical package.

3. Results

The study population covered a total of 222 subjects, comprising 92 cases and 130 controls. A description of the sample characteristics is presented in Table 1. The mean age of the controls (59.4 years; CI 95% 57–61.8) was slightly higher than that of cases (55 years; CI 95% 52.7–57.3). The 57.6% of the tumors were located in the oral cavity (tongue 27, oral floor 7, palate 6, and other parts 12) and 96.7% were squamous cell carcinomas. Smoking and alcohol consumption were more frequent among cancer cases than controls. A percentage of 98% of the cases were smokers and 46.7% of these ($n = 43$) were considered as heavy drinkers (more than six glasses of wine/beers or two liquors a day), whilst in the control group 62% of the individuals smoked and 10.8% ($n = 14$) were heavy drinkers.

The frequency of GSTM1 null genotype was 51.1% among oral and pharyngeal cancer patients and 47.7% among controls. The exon 4 mEH (139 Arg \rightarrow His) heterozygous polymorphism (His/Arg) was present in 31.5% of the control group and in 27.2% of the case group. Only 4 subjects (4.3%) in the case group and 1 subject in the control group (0.8%) presented homozygous mutations. There were no differences in the frequency of mutations for the CYP1A1 exon 7 polymorphism. The mutant alleles (Ile/Val, Val/Val) were observed in only 2 cases (3%) and 2 controls (2.2%).

Table 2 shows the odds ratio estimates for combined oral and pharyngeal cancers associated with the GSTM1, CYP1A1, and exon 4 mEH polymorphisms. To determine the effect of these polymorphisms on different cancer sites, oral cavity and pharyngeal tumors were evaluated separately. No statistically significant effect was observed for any of the polymorphisms studied for any of the anatomic subtypes. The limited number of subjects with mutant CYP1A1 alleles did not allow for a calculation of the OR for oral cavity tumors.

To assess dose-response relationship, we have calculated pack-years of smoking (1 pack (20 cigarettes/day) \times years of smoking). Smokers were classified as non-to-light/moderate smokers (≤ 35 pack-years) and heavy smokers (> 35 pack-years). Non smokers were analysed together with light/moderate smokers because there were only 2 nonsmokers among the cases and this did not allow for a separate analysis. The odds ratios associated with tobacco consumption by the different genotypes analysed are shown in Table 3. This analysis was not performed for CYP1A1 due to the limited number of patients with mutated alleles and the same happened for alcohol consumption. For the His/Arg genotype of exon 4 mEH, it could be observed that the risk was slightly lower for heavy smokers (OR 0.68; 95% CI 0.25–1.86) than for light smokers (OR 1.08; 95% CI 0.37–3.13) but

TABLE 1: Description of the study individuals.

Variable considered	Cases	Controls
Age (mean, IC95%)	55.0 (52.7–57.3)	59.4 (57.0–61.8)
Cancer location		
Oral	53 (57.6%)	
Pharyngeal	39 (42.4%)	
Cigarette smoking		
Never smoker	2 (2.2%)	49 (37.7%)
Former smoker	17 (18.5%)	42 (32.3%)
Current smoker	73 (79.3%)	39 (30%)
Tobacco consumption (pack-years)		
Percentil 25	33.0	0
Percentil 50	46.5	9.9
Percentil 75	67.5	43.8
Drinking habit		
No alcohol drinking	2 (2.2%)	20 (15.4%)
Light drinker (≤ 2 glasses of wine/beers or 2 licors a day) (0–280 gm/week)	6 (6.5%)	50 (38.5%)
Moderate drinkers (3–6 drinks/day) (281–840 g/week)	41 (44.6%)	46 (35.4%)
Heavy drinkers (> 6 drinks/day) (> 840 gm/week)	43 (46.7%)	14 (10.8%)
Alcohol consumption gm/week		
Percentil 25	290	70
Percentil 50	560	145
Percentil 75	840	300
CYP1A1		
Wild type (Ile/Ile)	64 (97%)	90 (97.8%)
Mutation (Ile/Val, Val/Val)	2 (3%)	2 (2.2%)
mEH (139 Arg \rightarrow His)		
Arg/Arg	63 (68.5%)	88 (67.7%)
Arg/His	25 (27.2%)	41 (31.5%)
His/His	4 (4.3%)	1 (0.8%)
GSTM1		
Present (GSTM1 +)	45 (48.9%)	68 (52.3%)
Absent (GSTM1 –)	47 (51.1%)	62 (47.7%)
Total	92	130

the associations were not significant for any of the categories of tobacco consumption. The GSTM1 null genotype revealed an inverse pattern, showing an OR of 0.88 (95% CI 0.34–2.34) for light smokers and an OR of 1.40 (95% CI 0.57–3.43) for heavy smokers.

To examine the interaction between these genotypes and the drinking status, we carried out a second stratification analysis. Two categories of alcohol consumption were established. Those that consumed 280 gm/week of alcohol or less (≤ 2 glasses of wine/beers or 2 liquors a day) were considered as light drinkers, and those that exceeded those values as heavy drinkers. Once again, due to the low number of nondrinkers among the cases ($n = 2$), these subjects were analysed in combination with light drinkers. The risks for the two different categories of alcohol consumption, light and heavy drinkers, are displayed in Table 4. There seems to be a very slight nonsignificant negative association for the His/Arg genotype of exon 4 mEH for both categories

of alcohol consumption. The GSTM1 gene has a different effect, with its absence posing a slightly higher association for light drinkers (OR 1.97; 95% CI 0.73–5.35) than for moderate/heavy drinkers (OR 0.69; 95% CI 0.28–1.72).

The interaction between mEH and GSTM1 genes is shown in Table 5. No significant effect was detected for the interaction although the estimated risk was higher for those subjects with the wild-type mEH gene and the null GSTM1 genotype (OR 1.45; 95% CI 0.66–3.17). There was no any apparent effect when both genes were mutated or absent (OR 1.07; 95% CI 0.39–2.92).

4. Discussion

Even though previous studies have been undertaken to examine the association between CYP1A1 Ile/Val, mEH, and GSTM1 null polymorphisms, as well as oral and pharyngeal cancers, few investigated the modification of

TABLE 2: Risks for oral and pharyngeal cancers associated with polymorphisms in genes CYP1A1, mEH, and GSTM1.

Gene	Cases	Controls	OR crude (CI 95%)*	OR adjusted (CI 95%)+
All cancers				
CYP1A1				
No mutated			1.00	1.00
Mutated			0.72 (0.10–5.28)	1.68 (0.18–15.70)
mEH (139His → Arg)				
His/His			1.00	1.00
His/Arg			0.95 (0.52–1.75)	0.81 (0.38–1.71)
Arg/arg			4.30 (0.46–40.07)	4.45 (0.39–50.45)
GSTM1				
Present			1.00	1.00
Absent			1.16 (0.73–1.99)	1.25 (0.65–2.40)
Oral cancer				
CYP1A1				
No mutated	53	64 (97%)	1.00	1.00
Mutated	0	2 (3%)	—	—
mEH (139His → Arg)				
His/His	39 (73,6%)	88 (67,7%)	1.00	1.00
His/Arg	12 (22,6%)	41 (31,5%)	0.74 (0.34–1.58)	0.54 (0.21–1.41)
Arg/arg	2 (3,8%)	1 (0,8%)	3.44 (0.29–40.16)	4.32 (0.32–58.63)
GSTM1				
Present	26 (49,1%)	68 (52,3%)	1.00	1.00
Absent	27 (50,9%)	62 (47,7%)	1.14 (0.60–2.19)	1.20 (0.56–2.18)
Pharyngeal cancer				
CYP1A1				
No mutated	37 (94,9%)	64 (97%)	1.00	1.00
Mutated	2 (5,1%)	2 (3%)	1.74 (0.23–12.92)	4.06 (0.43–38.24)
mEH (139His → Arg)				
His/His	24 (61,5%)	88 (67,7%)	1.00	1.00
His/Arg	13 (33,3%)	41 (31,5%)	1.27 (0.58–2.80)	1.07 (0.42–2.71)
Arg/arg	2 (5,2%)	1 (0,8%)	5.58 (0.47–66.10)	5.74 (0.34–97.71)
GSTM1				
Present	19 (48,7%)	68 (52,3%)	1.00	1.00
Absent	20 (51,3%)	62 (47,7%)	1.20 (0.58–2.48)	1.44 (0.61–3.37)

* Adjusted for age.

+ Adjusted for age, smoking, and alcohol intake.

risk associated with tobacco and alcohol consumption, and to our knowledge, this is the first to analyse the gene-gene interactions between these polymorphisms. Our results support the view that there is no significant association for any of these polymorphisms in Caucasians but our data suggest that exon 4 mEH (139 Arg → His) and GSTM1 null polymorphism might modify the risk related to tobacco and alcohol consumption.

We observed that the exon mEH polymorphism 139 Arg → His was mutated in a very similar proportion in cases and controls and the frequencies found (32,3% in controls versus 31,5% in cases) were consistent with the results of the previous investigations that assessed the association between this polymorphism in head and neck tumors in both sexes [32, 37–41]. In these studies, mutated alleles were present in 29.7–39.8% of the control population

and in 28.9–39% of the cancer patients. In the present analysis, the estimated risks were not significant for any of the tobacco or alcohol consumption levels but the results were in agreement with those of Wenghoefer et al. [37] that showed that the heterozygous allele (His/Arg) of exon 4 mEH could modulate the risk of head and neck cancer in smokers (OR 0.57; CI 95% 0.34–0.95). In our study, the risk was lower in heavy smokers (OR 0.68; 95% CI 0.25–1.86) than in light smokers (OR 1.08; 95% CI 0.37–3.13) but not significant, maybe influenced by the small sample size.

Enzymatically, mEH catalyzes the hydrolysis of arene, alkene, and aliphatic epoxides from polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic amines to trans-dihydrodiols [19]. This reaction is usually regarded as a detoxifying pathway because the majority of metabolites produced are less reactive and can be easily excreted, but, in some instances,

TABLE 3: Risks for the different polymorphisms broken down by smoking categories.

Genetic polymorphism	Cases	Controls	OR crude	OR adjusted
Light/moderate smokers (≤ 35 pack-years)				
CYP1A1				
No mutated	28	41	1.00	1.00
Mutated	1	2	0.76 (0.06–8.90)	1.12 (0.09–13.94)
mEH (139His \rightarrow Arg)				
His/His	20	58	1.00	1.00
His/Arg	8	24	1.06 (0.40–2.78)	1.08 (0.37–3.13)
Arg/arg	1	1	1.91 (0.11–33.10)	2.82 (0.15–52.41)
GSTM1				
Present	17	43	1.00	1.00
Absent	12	40	0.74 (0.31–1.76)	0.88 (0.34–2.34)
Heavy smokers (> 35 pack-years)				
CYP1A1				
No mutated	23	62	1.00	1.00
Mutated	0	1	—	—
mEH (139His \rightarrow Arg)				
His/His	43	30	1.00	1.00
His/Arg	17	17	0.94 (0.39–2.26)	0.68 (0.25–1.86)
Arg/arg	3	0	—	—
GSTM1				
Present	28	25	1.00	1.00
Absent	35	22	1.50 (0.67–1.33)	1.40 (0.57–3.43)

TABLE 4: Risks for the different polymorphisms broken down by alcohol intake.

Genetic polymorphism	Cases	Controls	OR crude	OR adjusted
Light drinkers (≤ 280 gm alcohol/week)				
CYP1A1				
No mutated	23	43	1.00	1.00
Mutated	0	2	—	—
mEH (139His \rightarrow Arg)				
His/His	18	64	1.00	1.00
His/Arg	5	31	0.57 (0.19–1.72)	0.71 (0.22–2.24)
Arg/arg	0	1	—	—
GSTM1				
Present	10	52	1.00	1.00
Absent	13	44	1.55 (0.62–3.88)	1.97 (0.73–5.35)
Moderate/heavy drinkers (> 280 gm alcohol/week)				
CYP1A1				
No mutated	67	21	1.00	1.00
Mutated	2	0	—	—
mEH (139His \rightarrow Arg)				
His/His	45	24	1.00	1.00
His/Arg	20	10	1.28 (0.50–3.31)	0.83 (0.30–2.30)
Arg/arg	4	0	—	—
GSTM1				
Present	35	16	1.00	1.00
Absent	34	18	0.79 (0.34–1.86)	0.69 (0.28–1.72)

TABLE 5: Combination of polymorphisms mEH and GSTM1 and risk of oropharyngeal cancer.

Combination of genetic polymorphisms	Cases	Controls	OR crude	OR adjusted
mEH (Arg/Arg)/GSTM1 present	31	48	1.00	1.00
mEH (Arg/Arg)/GSTM1 absent	32	40	1.22 (0.63–2.36)	1.45 (0.66–3.17)
mEH mutated/GSTM1 present	14	20	1.15 (0.50–2.65)	1.19 (0.43–3.27)
mEH mutated/GSTM1 absent	15	22	1.18 (0.52–2.66)	1.07 (0.39–2.92).

these initial trans-dihydrodiol metabolites can be further activated by subsequent P450 catalysis to form highly carcinogenic electrophilic intermediates that can bind covalently to DNA. Such is the case of the 7,8-diol-9,10-epoxide, which is more carcinogenic than the other benzo[a]pyrene diol epoxide formed [42]. Whilst the results of some studies, including the present one, are compatible with the fact that a high or intermediate activity might exert a protective effect in subjects exposed to tobacco products [39, 43, 44], others carried out in various aerodigestive tract cancers find no association or a significantly higher risk for smokers with the exon 4 mEH variant allele [32, 36, 38, 39]; reasons for these inconsistencies are unclear. It could be argued that high activity should be assessed taking into account both the exon 3 and exon 4 mEH polymorphisms. Some authors predicted mEH activity as low, intermediate, or high based on the presence or absence of the two polymorphisms but the results are also contradictory [37, 38, 40, 41, 45, 46]. The study undertaken by Wenghoefer et al. [37] found an association for the single genotypes in head and neck cancers but not the combination genotypes, raising uncertainties in categorizing enzymes. Given the dual role of mEH on the bioactivation/detoxification of carcinogens, it is highly probable that other polymorphisms might influence the formation of carcinogenic metabolites and that gene-gene interactions might exist. In this investigation, we did not find a significant interaction between the GSTM1 and exon 4 mEH polymorphism.

The frequency of the GSTM1 null allele polymorphisms in oral and pharyngeal cancers has been reported to vary greatly depending on the geographical regions [47, 48]. Whilst in Europe and USA the frequencies reported in control populations range from around 49–55.6% [24–32] in Asian and South American countries, this allele is frequently present in less than 49% of the control subjects [49–60]. In the present study, 47.7% of the control population presented the GSTM1 null polymorphism. This is slightly lower than the values found in other Caucasian studies and could be partly due to the fact that only males were included. Our study, like other previous reports on Caucasians [24–26, 28–32], failed to find a significant association between the GSTM1 null polymorphism and oral and pharyngeal cancers. Several studies undertaken in Asian populations showed contradictory results [49, 56–60]. In a very recent meta- and pooled analysis, it was observed that the GSTM1 null polymorphism was significantly associated with risk in Asian and African-American populations in the meta- (OR 1.5; 95% CI 1.3–1.8) and pooled (adjusted OR 2.4, 95% CI 1.1–5.5) analysis, respectively, but not in Caucasians [48]. This discrepancy might be attributed to differences in

lifestyle, environmental risk factors, and variations in the activity of other metabolizing enzymes, which often displays genetic polymorphisms that might differ in Caucasians and in other ethnic groups [11, 41, 59, 61].

We did not find a significant interaction between the GSTM1 null polymorphism and tobacco smoking, but we did observe that the risk was slightly higher in heavy smokers than in light/moderate smokers. To verify that these differences were not due to the fact that nonsmokers were analysed together with light/moderate smokers, we carried out a separate analysis leaving out these subjects and found that the variations in the odds ratios were minimum (data not shown). It has been hypothesised that lack of GSTM1 enzyme activity increases cancer susceptibility as a result of a decreased ability to detoxify reactive intermediates of tobacco carcinogens such as benzo[a]pyrene-7,8-diol epoxide, the activated form of benzo[a]pyrene [22] but the results of previous studies undertaken in oral and pharyngeal cancers are inconsistent [26, 54, 56, 57]. Some authors find a lower difference in risk among the genotypes at high dose levels and suggest a dose-response relationship of the enzymatic reaction [48, 57]. In the present study, the relationship between tobacco exposure and these polymorphisms is difficult to assess because there were only 2 nonsmokers among the cases and 6 subjects that smoked for less than 20 years, forcing us to create a category that was light/moderate smokers. Studies with larger number of patients are needed to properly assess this dose response relationship taking into account that ethnic and geographical differences might exist due to the different forms of tobacco consumption and diet intake. In Asian and South American countries, tobacco is usually smoked as “bidis” and the carcinogenic substances found in this form of preparation are different to that in cigarettes, implying that other enzymes different than GSTM1 and CYP1A1 might be involved in the detoxification [28].

Our study suggests that the effect of the GSTM1 null polymorphism is more noticeable among light drinkers, although this association was nonsignificant. This relationship was maintained when we took out the nondrinkers from the analysis (data not shown). This differential effect could be explained by the fact that the GSTM1 isoenzyme, together with the alcohol dehydrogenase, is involved in the oxidation of ethanol to acetaldehyde [30]. Even though the exact mechanisms by which ethanol may exert an influence in oral cancer is still unknown, it has been suggested that acetaldehyde, a known carcinogenic agent, [62] could be responsible for some DNA changes that could lead to cancer [63]. Individuals with a null GSTM1 and high drinkers would not convert ethanol in acetaldehyde and then the

absence of the gene would confer them a protective effect for oropharyngeal cancer. Another explanation for these findings could be that ethanol increases the permeability of tobacco carcinogens, such as nitrosonornicotine, across the oral membrane when it is present at low concentrations. At concentrations higher than 50%, no further permeabilization is noted, probably due to the fixative effect of ethanol on the mucosa [64]. It should be highlighted that the alcohol consumption in the Galician population is very high, as other studies have reported [65], and this is a limitation that does not allow for a proper analysis of the interaction.

Even though the CYP1A1 mutation has been shown to increase microsomal activity for converting procarcinogens, including PAH aromatic amines, the results of various reports on smoking-related cancers are inconsistent [11, 32, 47, 66–70]. It has been suggested that the DNA damage may depend on the link of CYP1A1 to other polymorphisms that can affect the CYP1A1 transcription levels, such as polymorphisms for promoter genes, AHR (Ah receptor) genes, or metabolic genes such as GSTM1 [69, 70]. In our study, only 4 of the analysed subjects showed an Ile/Val mutation. Although these frequencies are in accordance with those found by Hahn et al. in a Caucasian population [25], it made it impossible to draw any conclusion for this polymorphism. Confidence intervals obtained were very wide and the distribution of this polymorphism was very similar between cases and controls. In any case, neither the previous meta- and pooled analysis on CYP1A1 and risk of head and neck cancer [47] nor the recently published meta and pooled analysis on oral and pharyngeal cancer found a significant association between CYP1A1 (Ile/Val) polymorphism and oral and pharyngeal cancer [48].

This paper has several limitations. The main one is the small sample size included. This is especially important when analyzing polymorphisms that have a very low frequency in the population, such as CYP1A1 Ile/Val, but also limits the power to identify gene-environmental and gene-gene interactions in any polymorphisms investigated. Nevertheless, it has to be taken into account that for cancers with a low incidence such as oral and pharyngeal ones, 92 cases can be a relatively good number. Another limitation could be the fact that our study was hospital-based and this could result in selection bias. Even though it has been suggested that studies with hospital controls can provide lower risk estimates, since diseases of controls could be associated with the polymorphisms under study, previous meta- and pooled analysis that assessed these polymorphisms on head and neck cancers found no differences for hospital-based studies in relation to population-based studies [47, 66]. The fact that not all the sample was analysed for CYP1A1 polymorphisms limited the power to detect a significant risk.

The present study has also some advantages. One of them is that the participation of cases and controls was very high. All the cases belonged to the same catchment area, which has a unique reference hospital, and were collected consecutively, making them representative of the cases in that area. The controls also belonged to the same area and did not have any symptom or disease related to alcohol or tobacco consumption. Another advantage is the fact that the genes

analysed here were of phase I and phase II, which adds value to the results obtained. When studying susceptibility genes in many occasions, both types of genes are not studied and individuals can have susceptibility in type I compensated with the activity of the other type such as it was shown in Park et al. investigation [29].

As a conclusion, it seems that even though none of the three genotypes analysed have a significant association with the risk of oral and pharyngeal cancer in this population, the risks of tobacco and alcohol consumption might be modified by GSTM1 null and exon 4 mEH polymorphisms. The small number of nonsmoking and nondrinking subjects in our population limited our analysis, so we propose that further studies are carried out to clarify this question. Even though we found no significant interaction between the GSTM1null genotype and the exon 4 mEH genotype, the GSTM1 absence did show a slight rise in risk so this should also be investigated taking into account other polymorphisms including the CYP1A1.

Acknowledgments

This work was funded by the Galician Regional Research Authority (XUGA 208001B93). Part of this work has been done while the second author was doing a research stay at the Harvard School of Public Health.

References

- [1] J. Ferlay, F. Bray, P. Pisani, and D. M. Parkin, *GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*, IARC CancerBase no. 5, IARC Press, Lyon, France, 2004.
- [2] W. J. Blot, J. K. McLaughlin, D. M. Winn, et al., "Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer," *Cancer Research*, vol. 48, no. 11, pp. 3282–3287, 1988.
- [3] X. Castellsagué, M. J. Quintana, M. C. Martínez, et al., "The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis," *International Journal of Cancer*, vol. 108, no. 5, pp. 741–749, 2004.
- [4] S. Franceschi, R. Talamini, S. Barra, et al., "Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in Northern Italy," *Cancer Research*, vol. 50, no. 20, pp. 6502–6507, 1990.
- [5] J. Lissowska, A. Pilarska, P. Pilarski, et al., "Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland," *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 12, no. 1, pp. 25–33, 2003.
- [6] L. A. Moreno-López, G. C. Esparza-Gómez, A. González-Navarro, R. Cerero-Lapiedra, M. J. González-Hernández, and V. Domínguez-Rojas, "Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain," *Oral Oncology*, vol. 36, no. 2, pp. 170–174, 2000.
- [7] K. Rosenquist, "Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden," *Swedish Dental Journal. Supplement*, no. 179, pp. 1–66, 2005.
- [8] T. Bundgaard, J. Wildt, M. Frydenberg, O. Elbrond, and J. E. Nielsen, "Case-control study of squamous cell cancer of the oral cavity in Denmark," *Cancer Causes and Control*, vol. 6, no. 1, pp. 57–67, 1995.

- [9] C. La Vecchia, S. Franceschi, A. Favero, R. Talamini, and E. Negri, "Alcohol intake and cancer of the upper digestive tract. Pattern of risk in Italy is different from that in Denmark," *British Medical Journal*, vol. 318, no. 7193, pp. 1289–1291, 1999.
- [10] M. Grønbaek, U. Becker, D. Johansen, H. Tønnesen, G. Jensen, and T. I. A. Sørensen, "Population based cohort study of the association between alcohol intake and cancer of the upper digestive tract," *British Medical Journal*, vol. 317, no. 7162, pp. 844–848, 1998.
- [11] H. Bartsch, U. Nair, A. Risch, M. Rojas, H. Wikman, and K. Alexandrov, "Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 9, no. 1, pp. 3–28, 2000.
- [12] M. Romkes, C. White, J. Johnson, D. Eibling, R. Landreneau, and R. Branch, "Expression of cytochrome P450 mRNA in human lung, head and neck tumors and normal adjacent tissues," in *Proceedings of the 87th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR '96)*, vol. 37, p. 105, Washington, DC, USA, April 1996.
- [13] T. Shimada, M. V. Martin, D. Pruess-Schwartz, L. J. Marnett, and F. P. Guengerich, "Roles of individual human cytochrome P-450 enzymes in the bioactivation of benzo(a)pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons," *Cancer Research*, vol. 49, no. 22, pp. 6304–6312, 1989.
- [14] T. Quan, J. J. Reiners Jr., A. O. Bell, N. Hong, and J. C. States, "Cytotoxicity and genotoxicity of (\pm)-benzo[a]pyrene-*trans*-7,8-dihydrodiol in CYP1A1-expressing human fibroblasts quantitatively correlate with CYP1A1 expression level," *Carcinogenesis*, vol. 15, no. 9, pp. 1827–1832, 1994.
- [15] K. Kawakiri, "CYP1A1," in *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer*, P. Vineis, N. Malats, M. Lang, et al., Eds., vol. 148, pp. 173–195, IARC Scientific Publications no. 148, Lyon, France, 1999.
- [16] S. Hayashi, J. Watanabe, K. Nakachi, and K. Kawajiri, "Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene," *The Journal of Biochemistry*, vol. 110, no. 3, pp. 407–411, 1991.
- [17] F. P. Guengerich, "Epoxide hydrolase: properties and metabolic roles," *Reviews in Biochemical Toxicology*, vol. 4, pp. 5–30, 1982.
- [18] J. K. Beetham, D. Grant, M. Arand, et al., "Gene evolution of epoxide hydrolases and recommended nomenclature," *DNA and Cell Biology*, vol. 14, no. 1, pp. 61–71, 1995.
- [19] A. J. Fretland and C. J. Omiecinski, "Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 129, no. 1–2, pp. 41–59, 2000.
- [20] C. Hassett, K. B. Robinson, N. B. Beck, and C. J. Omiecinski, "The human microsomal epoxide hydrolase gene (EPHX1): complete nucleotide sequence and structural characterization," *Genomics*, vol. 23, no. 2, pp. 433–442, 1994.
- [21] C. Hassett, L. Aicher, J. S. Sidhu, and C. J. Omiecinski, "Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants," *Human Molecular Genetics*, vol. 3, no. 3, pp. 421–428, 1994.
- [22] J. D. Hayes and D. J. Pulford, "The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 30, no. 6, pp. 445–600, 1995.
- [23] B. Coles and B. Ketterer, "The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 25, no. 1, pp. 47–70, 1990.
- [24] S. Gronau, D. Koenig-Greger, M. Jerg, and H. Riechelmann, "GSTM1 enzyme concentration and enzyme activity in correlation to the genotype of detoxification enzymes in squamous cell carcinoma of the oral cavity," *Oral Diseases*, vol. 9, no. 2, pp. 62–67, 2003.
- [25] M. Hahn, G. Hagedorn, E. Kuhlisch, H. K. Schackert, and U. Eckelt, "Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity cancer," *Oral Oncology*, vol. 38, no. 5, pp. 486–490, 2002.
- [26] N. Jourenkova-Mironova, A. Voho, C. Bouchardy, et al., "Glutathione S-transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 genotypes and the risk of smoking-related oral and pharyngeal cancers," *International Journal of Cancer*, vol. 81, no. 1, pp. 44–48, 1999.
- [27] V. Nazar-Stewart, T. L. Vaughan, R. D. Burt, C. Chen, M. Berwick, and G. M. Swanson, "Glutathione S-transferase M1 and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 8, no. 6, pp. 547–551, 1999.
- [28] C. Matthias, U. Bockmühl, V. Jahnke, et al., "Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers," *Pharmacogenetics*, vol. 8, no. 2, pp. 91–100, 1998.
- [29] J. Y. Park, J. E. Muscat, Q. Ren, et al., "CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 6, no. 10, pp. 791–797, 1997.
- [30] C. Coutelle, P. J. Ward, B. Fleury, et al., "Laryngeal and oropharyngeal cancer, and alcohol dehydrogenase 3 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms," *Human Genetics*, vol. 99, no. 3, pp. 319–325, 1997.
- [31] M. Deakin, J. Elder, C. Hendrickse, et al., "Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers," *Carcinogenesis*, vol. 17, no. 4, pp. 881–884, 1996.
- [32] S. Boccia, G. Cadoni, F. A. Sayed-Tabatabaei, et al., "CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, EPHX1 exons 3 and 4, and NAT2 polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 134, no. 1, pp. 93–100, 2008.
- [33] H. S. Suzen, G. Guvenc, M. Turanli, E. Comert, Y. Duydu, and A. Elhan, "The role of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in head and neck cancer risk," *Oncology Research*, vol. 16, no. 9, pp. 423–429, 2007.
- [34] A. F. Olshan, M. C. Weissler, M. A. Watson, and D. A. Bell, "GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 9, no. 2, pp. 185–191, 2000.
- [35] D. A. Bell, J. A. Taylor, D. F. Paulson, C. N. Robertson, J. L. Mohler, and G. W. Lucier, "Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 85, no. 14, pp. 1159–1164, 1993.

- [36] H. Zhao, M. R. Spitz, K. M. Gwyn, and X. Wu, "Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk in non-hispanic whites," *Molecular Carcinogenesis*, vol. 33, no. 2, pp. 99–104, 2002.
- [37] M. Wenghoefer, B. Pesch, V. Harth, et al., "Association between head and neck cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes," *Archives of Toxicology*, vol. 77, no. 1, pp. 37–41, 2003.
- [38] M. Lacko, H. M. J. Roelofs, R. H. M. te Morsche, et al., "Microsomal epoxide hydrolase genotypes and the risk for head and neck cancer," *Head & Neck*, vol. 30, no. 7, pp. 836–844, 2008.
- [39] J. To-Figueras, M. Gené, J. Gómez-Catalán, et al., "Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphisms in relation to laryngeal carcinoma risk," *Cancer Letters*, vol. 187, no. 1-2, pp. 95–101, 2002.
- [40] N. Jourenkova-Mironova, K. Mitrunen, C. Bouchardy, P. Dayer, S. Benhamou, and A. Hirvonen, "High-activity microsomal epoxide hydrolase genotypes and the risk of oral, pharynx, and larynx cancers," *Cancer Research*, vol. 60, no. 3, pp. 534–536, 2000.
- [41] J. Y. Park, S. P. Schantz, and P. Lazarus, "Epoxide hydrolase genotype and orolaryngeal cancer risk: interaction with GSTM1 genotype," *Oral Oncology*, vol. 39, no. 5, pp. 483–490, 2003.
- [42] M. Shou, F. J. Gonzalez, and H. V. Gelboin, "Stereoselective epoxidation and hydration at the K-region of polycyclic aromatic hydrocarbons by cDNA-expressed cytochromes P450 1A1, 1A2, and epoxide hydrolase," *Biochemistry*, vol. 35, no. 49, pp. 15807–15813, 1996.
- [43] S. R. Heckbert, N. S. Weiss, S. K. Hornung, D. L. Eaton, and A. G. Motulsky, "Glutathione S-transferase and epoxide hydrolase activity in human leukocytes in relation to risk of lung cancer and other smoking-related cancers," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 84, no. 6, pp. 414–422, 1992.
- [44] A. G. Amador, P. D. Righi, S. Radpour, et al., "Polymorphisms of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma," *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, & Endodontics*, vol. 93, no. 4, pp. 440–445, 2002.
- [45] C. Kiyohara, K. Yoshimasu, K. Takayama, and Y. Nakanishi, "EPHX1 polymorphisms and the risk of lung cancer: a HuGE review," *Epidemiology*, vol. 17, no. 1, pp. 89–99, 2006.
- [46] W. J. Lee, P. Brennan, P. Boffetta, et al., "Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk: a quantitative review," *Biomarkers*, vol. 7, no. 3, pp. 230–241, 2002.
- [47] M. Hashibe, P. Brennan, R. C. Strange, et al., "Meta- and pooled analysis of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 12, no. 12, pp. 1509–1517, 2003.
- [48] L. Varela-Lema, E. Taioli, A. Ruano-Ravina, et al., "Meta-analysis and pooled analysis of GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms and oral and pharyngeal cancers: a HuGE-GSEC review," *Genetics in Medicine*, vol. 10, no. 6, pp. 369–384, 2008.
- [49] S. S. Soya, T. Vinod, K. S. Reddy, S. Gopalakrishnan, and C. Adithan, "Genetic polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) and upper aerodigestive tract cancer risk among smokers, tobacco chewers and alcoholics in an Indian population," *European Journal of Cancer*, vol. 43, no. 18, pp. 2698–2706, 2007.
- [50] N. Sikdar, R. R. Paul, and B. Roy, "Glutathione S-transferase M3 (A/A) genotype as a risk factor for oral cancer and leukoplakia among Indian tobacco smokers," *International Journal of Cancer*, vol. 109, no. 1, pp. 95–101, 2004.
- [51] S. C. Buch, P. N. Notani, and R. A. Bhisey, "Polymorphism at GSTM1, GSTM3 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer in an Indian population," *Carcinogenesis*, vol. 23, no. 5, pp. 803–807, 2002.
- [52] T. T. Sreelekha, K. Ramadas, M. Pandey, G. Thomas, K. R. Nalinakumari, and M. R. Pillai, "Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer," *Oral Oncology*, vol. 37, no. 7, pp. 593–598, 2001.
- [53] G. J. F. Gattá, M. B. de Carvalho, M. S. Siraque, et al., "Genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer," *Head & Neck*, vol. 28, no. 9, pp. 819–826, 2006.
- [54] H. Xie, L. Hou, P. G. Shields, et al., "Metabolic polymorphisms, smoking, and oral cancer in Puerto Rico," *Oncology Research*, vol. 14, no. 6, pp. 315–320, 2003.
- [55] S. N. Drummond, L. De Marco, J. C. M. Noronha, and R. S. Gomez, "GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma," *Oral Oncology*, vol. 40, no. 1, pp. 52–55, 2004.
- [56] S. Kietthubthew, H. Sriplung, and W. W. Au, "Genetic and environmental interactions on oral cancer in Southern Thailand," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 37, no. 2, pp. 111–116, 2001.
- [57] M. Sato, T. Sato, T. Izumo, and T. Amagasa, "Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer," *Carcinogenesis*, vol. 20, no. 10, pp. 1927–1931, 1999.
- [58] M. Sato, T. Sato, T. Izumo, and T. Amagasa, "Genetically high susceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined genotyping of CYP1A1 and GSTM1 genes," *Oral Oncology*, vol. 36, no. 3, pp. 267–271, 2000.
- [59] T. Nomura, H. Noma, T. Shibahara, A. Yokoyama, T. Muramatsu, and T. Ohmori, "Aldehyde dehydrogenase 2 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms in relation to the risk for oral cancer in Japanese drinkers," *Oral Oncology*, vol. 36, no. 1, pp. 42–46, 2000.
- [60] M. Kihara, M. Kihara, A. Kubota, M. Furukawa, and H. Kimura, "GSTM1 gene polymorphism as a possible marker for susceptibility to head and neck cancers among Japanese smokers," *Cancer Letters*, vol. 112, no. 2, pp. 257–262, 1997.
- [61] C. F. S. Marques, S. Koifman, R. J. Koifman, P. Boffetta, P. Brennan, and A. Hatagima, "Influence of CYP1A1, CYP2E1, GSTM3 and NAT2 genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: results from a case-control study in Rio de Janeiro," *Oral Oncology*, vol. 42, no. 6, pp. 632–637, 2006.
- [62] IARC (International Agency for Research on Cancer), *Alcohol Drinking*, vol. 44 of *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human*, IARC Press, Lyon, France, 1998.
- [63] H. Ristow and G. Obe, "Acetaldehyde induces cross-links in DNA and causes sister-chromatid exchanges in human cells," *Mutation Research*, vol. 58, no. 1, pp. 115–119, 1978.
- [64] N. M. Howie, T. K. Trigkas, A. T. Cruchley, P. W. Wertz, C. A. Squier, and D. M. Williams, "Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa," *Oral Diseases*, vol. 7, no. 6, pp. 349–354, 2001.
- [65] A. Ruano-Ravina, A. Figueiras, and J. M. Barros-Dios, "Type of wine and risk of lung cancer: a case-control study in Spain," *Thorax*, vol. 59, no. 11, pp. 981–985, 2004.
- [66] R. J. Hung, P. Boffetta, J. Brockmüller, et al., "CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis," *Carcinogenesis*, vol. 24, no. 5, pp. 875–882, 2003.
- [67] E. Taioli, L. Gaspari, S. Benhamou, et al., "Polymorphisms in CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and lung cancer below the age of 45 years," *International Journal of Epidemiology*, vol. 32, no. 1, pp. 60–63, 2003.

- [68] P. Vineis, F. Veglia, S. Anttila, et al., "CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and lung cancer: a pooled analysis of gene-gene interactions," *Biomarkers*, vol. 9, no. 3, pp. 298–305, 2004.
- [69] F. Crofts, E. Taioli, J. Trachman, et al., "Functional significance of different human CYP1A1 genotypes," *Carcinogenesis*, vol. 15, no. 12, pp. 2961–2963, 1994.
- [70] M. Rojas, K. Alexandrov, I. Cascorbi, et al., "High benzo[a]pyrene diol-epoxide DNA adduct levels in lung and blood cells from individuals with combined CYP1A1 MspI/MspI-GSTM1*0/*0 genotypes," *Pharmacogenetics*, vol. 8, no. 2, pp. 109–118, 1998.