

Head and neck cancer: genetic polymorphisms and folate metabolism

Câncer de cabeça e pescoço: polimorfismos genéticos e metabolismo do folato

Ana Livia Silva Galbiatti¹, Mariangela Torreglosa Ruiz², José Victor Maniglia³, Luis Sérgio Raposo⁴, Érika Cristina Pavarino-Bertelli⁵, Eny Maria Goloni-Bertollo⁶

Keywords:

genes,
head and neck
neoplasms,
polymorphism,
genetic.

Abstract

Epidemiological evidence suggests that genetic variants encoding enzymes involved in folate metabolism may modulate HNSCC risk by altering DNA methylation synthesis and genomic stability. **Aim:** A review of the literature on genetic polymorphisms involved in folate metabolism and risk of head and neck cancer was carried out. **Methodology:** An electronic search was made on the Medline database to select papers on head and neck cancer and polymorphisms involved in folate metabolism. **Results:** The association between MTHFR C677T polymorphism and the risk of this tumor type was evaluated in nine studies; there was an association with this disease in three papers. The MTR A2756G and MTRR A66G and RFC1 A80G polymorphisms were also associated with increased risk for HNSCC. MTHFD1 G1958A polymorphism was not associated with increased risk of this disease; the evaluation results of the MTHFR A1298C polymorphism in this neoplasm were contradictory. Other polymorphisms involved in folate metabolism were not studied for this neoplasm. **Conclusion:** We conclude that polymorphisms involved in folate metabolism may modulate the risk of head and neck cancer, however, these results need to be demonstrated in different populations.

Palavras-chave:

genes,
neoplasias de
cabeça e pescoço,
polimorfismo genético.

Resumo

Evidências epidemiológicas sugerem que variantes genéticas que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do folato podem modular o risco de câncer de cabeça e pescoço por alterar a metilação, síntese de DNA e estabilidade genômica. **Objetivos:** Realizar uma revisão bibliográfica sobre polimorfismos genéticos envolvidos no metabolismo do folato e o risco de câncer de cabeça e pescoço. **Metodologia:** Realizou-se uma busca eletrônica na base de dados Medline, selecionando estudos em câncer de cabeça do pescoço e polimorfismos envolvidos no metabolismo do folato. **Resultados:** A associação do polimorfismo MTHFR C677T no risco dessa neoplasia foi avaliada em nove estudos e três deles mostraram associação com essa doença. Os polimorfismos MTR A2756G e MTRR A66G e RFC1 A80G também foram associados com aumento de risco para o câncer de cabeça e pescoço. O polimorfismo MTHFD1 G1958A não mostra associação com o risco dessa doença e os resultados da avaliação do polimorfismo MTHFR A1298C nesse tipo de neoplasia são contraditórios. Outros polimorfismos envolvidos no metabolismo do folato ainda não foram estudados nesse tipo de neoplasia. **Conclusão:** Concluímos que polimorfismos envolvidos no metabolismo do folato podem modular o risco desse tipo de tumor, no entanto, esses resultados precisam ser comprovados em diferentes populações.

¹ Bióloga (Mestranda em Ciências da saúde - Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (UPGEM)).

² Doutora em Ciências da saúde (Professora Adjunta - Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)).

³ Médico, Livre Docente (Professor Adjunto - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)).

⁴ Médico (Mestrando em Ciências da saúde).

⁵ Livre Docente em Genética Humana e Médica (Professora Adjunta - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)).

⁶ Livre Docente em Genética Humana e Médica (Professora Adjunta).

FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Endereço para correspondência: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP. Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - Vila São Pedro. CEP: 15090-000. São José do Rio Preto - SP. Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da BJORL em 10 de Agosto de 2010. cod. 7260

Artigo aceito em 18 de setembro de 2010.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de cabeça e pescoço ocupa a quinta posição na lista das neoplasias mais frequentes, com incidência mundial estimada de 50.000 novos casos por ano^{1,2}. No Brasil, a estimativa para câncer de cavidade oral em 2010 era de 14.120 casos novos (10.330 homens e 3.790 mulheres)³. A grande maioria desses tumores epiteliais é classificada como carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC - *head and neck squamous cell carcinoma*) e os sítios anatômicos que estão incluídos neste grupo compreendem a cavidade oral, faringe e laringe, com ocorrência aproximada de 40%, 15% e 25%, respectivamente^{2,4-6}.

Cerca de dois terços dos pacientes com essa doença apresentam estágio avançado, geralmente envolvendo linfonodos regionais. Metástase à distância ocorre somente em 10% do pacientes⁷. O tratamento varia de acordo com o estágio da doença e, segundo dados da literatura, cerca de 60% a 65% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço podem ser curados com cirurgia e/ou radioterapia. Pacientes com fase inicial (estádios I e II) da doença são tratados com uma única modalidade de tratamento (cirurgia ou radioterapia), enquanto pacientes com doença mais avançada (estádios III e IV) necessitam de uma abordagem combinada, como a cirurgia e radioterapia ou quimioradioterapia⁸.

Este tipo de tumor acomete em maior proporção indivíduos do gênero masculino e com idade avançada, sendo que a média de idade de diagnóstico é de 60 anos^{7,9}. No entanto, a incidência de câncer na base da língua e amígdalas tem aumentado em pessoas com idade inferior a 45 anos e isto é atribuído ao aumento da prevalência da infecção pelo vírus HPV, que contribui para o desenvolvimento desta neoplasia nos países em desenvolvimento¹⁰⁻¹¹.

Os principais fatores de risco já estabelecidos para esta doença são tabagismo e etilismo, que quando atuam em conjunto multiplicam o risco para câncer, especialmente câncer de cavidade oral e faringe¹². Isto porque o cigarro possui aproximadamente 4.700 substâncias e, dessas, pelo menos 50 são carcinogênicas. Já o consumo frequente de bebida alcoólica impede que as células epiteliais formem a barreira de proteção contra agentes externos, permitindo, assim, a entrada facilitada dos agentes carcinógenos do cigarro, que formam adutos de DNA, que não são reconhecidos durante o processo de replicação do DNA^{13,14}.

O estudo de Hashibe et al.¹² mostrou que o consumo de álcool, independente do fumo, apresentou risco elevado para o câncer de orofaringe, hipofaringe e laringe em indivíduos que nunca fumaram. O consumo excessivo de álcool pode também resultar em deficiências nutricionais devido às falhas na absorção intestinal e alterar vias metabólicas importantes, como, por exemplo, a do metabolismo do folato envolvida nas reações de metilação celular. Como

consequência, a metilação de genes com um potencial papel na carcinogênese pode ser comprometida¹⁵.

Estudos também sugerem que a pobre higienização oral está associada com o risco de câncer de cabeça e pescoço. As doenças periodontais, resultantes da pobre higienização oral, podem levar a infecções, com consequente liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas e as reações contra as inflamações podem favorecer o desenvolvimento do câncer¹⁶. A perda de dentes também pode contribuir para o desenvolvimento do câncer oral; uma vez que leva a alteração da flora oral, favorece a redução de nitritos e nitratos e a produção de acetaldeído, que leva à formação de adutos de DNA^{14,17}.

Em relação à dieta, os resultados da literatura evidenciam que a dieta rica em cereais integrais, frutas e verduras, e pobre em alimentos processados, associada a um estilo de vida saudável pode proteger contra danos oxidantes do DNA, uma vez que esses alimentos possuem micronutrientes, tais como vitaminas B, C e E, carotenóides, flavonóides entre outros, com propriedades antioxidantes e anticarcinogênicas, diminuindo, assim, o risco de câncer oral¹⁸⁻²¹.

A deficiência de folato no organismo, vitamina presente em frutas e vegetais, está associada ao aumento do risco de vários tipos de câncer, entre eles, de cabeça e pescoço^{20,22-26}, pois este micronutriente participa da síntese, reparo e metilação do DNA^{22,27}.

OBJETIVO E MÉTODO

Mostrar os resultados de estudos que avaliaram a modulação de polimorfismos envolvidos no metabolismo do folato e o risco de câncer de cabeça e pescoço por meio de revisão em literatura.

METABOLISMO DO FOLATO

O folato está envolvido na formação de grupos metil (CH₃) durante a interconversão de um carbono no metabolismo intermediário de S-adenosilmetionina (SAM), que serve como um doador de grupos metil nas reações de metilação celulares^{26,28,29}. A metilação do DNA é a transferência de grupos metil para a posição 5 de resíduos de citosinas localizadas em dinucleotídeos citosina-guanina (CpG), por meio de reações catalisadas por proteínas denominadas DNA metiltransferases³⁰. Esta modificação epigenética do DNA possui vários papéis funcionais, incluindo controle da expressão gênica, estabilidade da estrutura da cromatina e manutenção da estabilidade genômica^{23,26,29,30-34}.

Existem três mecanismos pelos quais as alterações no metabolismo do folato podem contribuir com a carcinogênese: (1) hipometilação de DNA e subsequente ativação dos proto-oncogenes^{26,35}; (2) erro de incorporação da uracila durante a síntese de DNA que leva à instabilidade genômica^{26,35,36}; e (3) aumento na desaminação de citosina nos sítios de metilação de DNA^{26,36}.

Alterações nos níveis de folato devido a polimorfismos genéticos envolvidos em sua via metabólica estão associadas com mudanças na metilação, síntese e reparo do DNA, pois níveis adequados de folato são essenciais para a biossíntese de purinas e pirimidinas, necessárias para esses processos biológicos³⁷⁻⁴⁵.

Na Figura 1, estão apresentadas as enzimas que participam do metabolismo do folato. O folato é primeiramente convertido em folato fisiológico reduzido pela enzima Dihidrofolato redutase (DHFR). A enzima Serina hidroximetiltransferase (SHMT) catalisa a reação reversível de THF em 5,10-MTHF, constituindo uma enzima chave na manutenção e regulação da homeostase da concentração de folato e de grupos metil intracelulares. É uma enzima dependente de vitamina B₆ e possui papel significativo na síntese de DNA e proteínas e nas reações de metilação dos ácidos nucleicos^{46,47}.

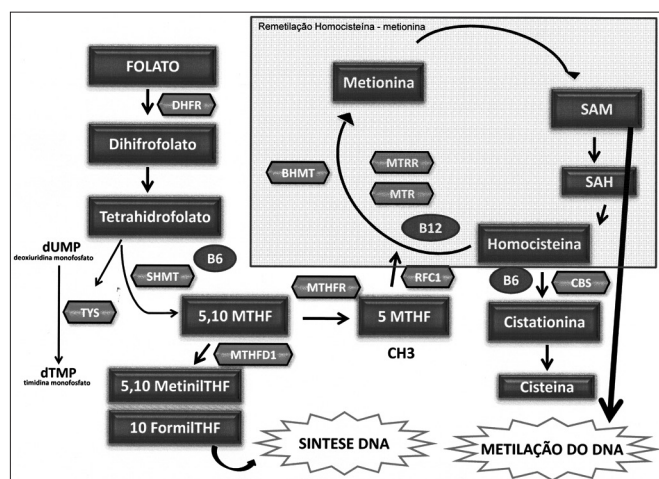


Figura 1. Principais enzimas envolvidas no metabolismo do folato. Metabolismo do Folato – DHF: Dihidrofolato; THF- Tetrahydrofolato; DHFR: Dihidrofolato redutase; SHMT: Serina hidroximetiltransferase; TYS: Timidilato sintase; MTHFD1: Metileno tetrahydrofolato desidrogenase 1; MTHFR: Metileno tetrahydrofolato redutase; MTR: metionina sintase; MTRR: Metionina sintase redutase; BHMT: Betaína-homocisteína metiltransferase; CBS: Cistationina beta sintase; RFC1: Carreador de folato reduzido 1; SAM: S S-adenosilmetionina; SAH: S- adenosilhomocisteína; dUMP: Deoxiuridina monofosfato; dTMP: Timidina monofosfato.

A enzima Metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR) catalisa a conversão do 5,10 metileno tetrahydrofolato para 5-metil tetrahydrofolato (5-MTHFR), a principal forma circulante de folato, que atua como doador de grupos metil para a remetilação da homocisteína (Hcy) para metionina. Esta reação de remetilação é catalisada pela enzima Metionina sintase (MTR), que requer a vitamina B₁₂ (metilcobalamina) como cofator, e resulta na formação de SAM. A enzima metionina sintase redutase (MTRR) é responsável pela manutenção do estado ativo da enzima MTR. Após a metilação da Hcy, a metionina formada é condensada com o trifosfato de adenosina (ATP), resultando

na S-adenosilmetionina (SAM). Em seguida, por uma reação de desmetilação, forma-se a S-adenosil-homocisteína (SAH), com posterior hidrólise para liberar adenosina e Hcy, completando o ciclo⁴⁸.

A metilação da Hcy serve para repor os estoques de SAM quando a metionina estiver em baixos níveis. A enzima Betaína-homocisteína metiltransferase (BHMT) catalisa a conversão da Hcy para metionina em uma via alternativa de remetilação, na qual o aminoácido betaína atua como doador de grupos metil para esta reação⁴⁹⁻⁵¹. Quando a via de remetilação da Hcy catalisada pela enzima MTR, dependente de folato, encontra-se alterada por fatores genéticos ou ambientais, a enzima BHMT desenvolve papel crucial na homeostase da Hcy⁵².

Participando também desse metabolismo, a enzima Cistationina β-sintase (CBS), dependente de vitamina B₆, desenvolve papel crucial no metabolismo do folato, convertendo a Hcy em cistationina na chamada via de transsulfuração^{53,54}.

Durante o ciclo da regeneração de metionina, após a doação do grupo metil (5-metil -THF) à homocisteína, o THF é recuperado. O THF poderá ser utilizado, por outra via, diretamente, para a síntese de timidilato sintase (TS) que converte deoxiuridina monofosfato (dUMP) à timidina monofosfato (dTMP), utilizando o 10-formil-THF para a síntese de DNA. Nesta reação, o 5,10 metileno-THF é o substrato da timidilato⁵⁵.

A enzima Metileno tetrahydrofolato desidrogenase 1 (MTHFD1) catalisa a oxidação do 5,10-metileno-THF a 5,10-metilil-THF, que é, então, convertido para 10-formil-THF (Stevens et al., 2007). Estas três reações estão envolvidas na interconversão de derivados do carbono-1 do THF, que são substratos para a síntese de metionina, timidilato e purinas⁵⁶.

Além dessas enzimas, a enzima carreadora de folato reduzido 1 (RFC1), localizada na membrana das células da mucosa intestinal, participa do processo de absorção do folato, realizando o transporte do 5-MTHF para o interior de uma variedade de células, constituindo um importante determinante das concentrações de folato disponíveis dentro das células⁴⁸.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DO FOLATO E O CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Polimorfismo MTHFR C677T

Este polimorfismo está associado à redução da atividade enzimática, limitando a conversão de 5,10 metileno tetrahydrofolato para 5-MTHFR, a forma de folato requerida para as reações de metilação do DNA⁵⁷. Um estudo *in vitro* mostrou que o genótipo heterozigoto 677CT foi associado com redução de 40% da atividade enzimática, enquanto o genótipo homozigoto polimórfico 677TT foi associado com uma redução de 70% da atividade enzimática⁵⁸.

Além disso, o genótipo homocigoto polimórfico foi associado com níveis baixos de folato e níveis mais altos de homocisteína no plasma⁵⁹⁻⁶¹ e, conseqüentemente, a diminuição de folato plasmático pode ocasionar hipometilação do DNA e câncer⁶².

De acordo com nosso conhecimento, há oito estudos que avaliaram a associação desse polimorfismo em câncer de cabeça e pescoço³⁷⁻⁴⁴. Desses, somente o estudo de Reljic et al.⁴¹, Vairaktaris et al.⁴⁰ e Solomon et al.⁴³ confirmaram associação do polimorfismo *MTHFR* C677T com o risco de câncer de cabeça e pescoço (Quadro 1).

Reljic et al.⁴¹, em seu estudo caso-controle, avaliaram 81 pacientes com câncer de cabeça e pescoço e 102 indivíduos sem história de câncer em uma população croata e encontraram que o genótipo 677TT diminui o risco dessa doença. Por outro lado, o estudo de Vairaktaris et al.⁴⁰ em 110 indivíduos com câncer de cavidade oral e 102 indivíduos sem história de neoplasia, realizado em indivíduos alemães e gregos, mostrou que o genótipo 677CT foi associado com um aumento de risco para esse tipo de câncer. O estudo de Solomon et al.⁴³ avaliou 126 indivíduos etilistas (33 etilistas crônicos importantes, 56 etilistas moderados e 37 etilistas sociais) com câncer oral e mostrou que o genótipo 677TT foi associado com o grupo de indivíduos etilistas crônicos importantes e também com o grupo de indivíduos com hábito etilista moderado, em menor proporção.

Polimorfismo *MTHFR* A1298C

Esta variante também foi associada *in vitro* com diminuição da atividade enzimática, porém em menor

proporção em relação ao polimorfismo *MTHFR* C677T⁶³. A exata relevância biológica desse polimorfismo ainda não está clara e os resultados são inconsistentes^{62,64,65}.

Dados sobre o risco de câncer de cabeça e pescoço relacionados ao polimorfismo *MTHFR* A1298C são contraditórios. O estudo caso-controle de Suzuki et al.⁴², realizado no Japão, em 237 pacientes com câncer de cabeça e pescoço e 711 indivíduos sem história de neoplasia e o estudo de Kruzina et al.⁴⁴ em 131 poloneses com câncer de laringe e 250 poloneses sem história de câncer não encontraram associação desta variante com o risco de carcinoma de cabeça e pescoço.

No entanto, o estudo de Neumann et al.³⁹, realizado no Texas em 537 pacientes com câncer de cabeça e pescoço e 545 indivíduos controle, mostrou que indivíduos com genótipos 1298AC ou 1298CC apresentam uma redução de 35% no risco de câncer de cabeça e pescoço. Entretanto, o estudo mostrou aumento de risco de HNSCC para indivíduos com os três alelos polimórficos (*MTHFR* 677T, *MTHFR* 1298C e *MTHFR* 1793A) em relação àqueles que apresentam apenas um ou dois alelos polimórficos.

Polimorfismo *MTR* A2756G

De acordo com nosso conhecimento, não há estudos *in vitro* que avaliaram a atividade da enzima MTR na presença do polimorfismo *MTR* A2756G. Dados sobre alterações nos níveis de Hcy e folato são contraditórios⁶⁶⁻⁷¹. Alguns autores mostraram que indivíduos com genótipo homocigoto polimórfico (*MTR* 2756GG) apresentam níveis baixos de Hcy e níveis altos de folato⁶⁸⁻⁷¹. Entretanto, o estudo de Li et al.⁶⁶ mostrou que, na presença dessa variante,

Quadro 1. Estudos do polimorfismo *MTHFR* C677T em câncer de cabeça e pescoço.

Ano	Autores	Local de estudo	Casuística
2002	Weistein et al.	Caribe	341 pacientes com câncer Oral e de faringe 521 indivíduos controles
2004	Kureshi et al.	Paquistão	50 pacientes com câncer de cabeça e pescoço 54 indivíduos controles
2005	Neumann et al.	Texas	537 pacientes com câncer de cabeça e pescoço 545 indivíduos controles
2006	Reljic et al.*	Croácia	81 pacientes com câncer de cabeça e pescoço 102 indivíduos controle
2006	Vairaktaris et al.*	Alemanha/Grécia	110 pacientes com câncer oral 120 indivíduos controle
2007	Suzuki et al.	Japão	237 pacientes com câncer de cabeça e pescoço 711 indivíduos controles
2007	Hisuing et al.	Estados Unidos	278 pacientes com câncer de cabeça e pescoço 1.623 indivíduos controles
2008	Solomon et al.*	Índia	126 pacientes com câncer oral (33 etilistas crônicos importantes, 56 etilistas moderados e 37 etilistas sociais)
2010	Kruzina et al.	Polônia	131 pacientes com câncer de laringe 250 indivíduos controles

* Estudos que encontraram associação com o polimorfismo e o risco de câncer de cabeça e pescoço

há níveis altos de Hcy, enquanto Ma et al.⁶⁷ demonstraram que esse polimorfismo não altera os níveis de Hcy.

Em relação à metilação do DNA, estudos confirmaram que os genótipos *MTR* 2756AG ou GG levam à diminuição da formação de SAM e, conseqüentemente, hipometilação do DNA⁷². Além disso, estudos relatam a relação entre o genótipo *MTR* 2756GG e hipometilação do DNA em câncer de colorretal, mama, pulmão e câncer cervical⁷²⁻⁷⁵.

Em câncer de cabeça e pescoço, este polimorfismo mostrou associação com a doença em três estudos. Zhang et al.⁷⁵, em estudo caso-controle realizado no Texas, avaliaram 721 pacientes com câncer de cabeça e pescoço e 1.234 indivíduos sem história de neoplasia e observaram que os genótipos *MTR* 2756AG ou GG aumentam o risco dessa doença. O estudo de Kruzina et al.⁴⁴, em 131 pacientes poloneses com câncer de laringe e 250 indivíduos controle, também encontrou associação desses genótipos (*MTR* 2756GG ou AG) com este tipo de tumor. No estudo do nosso grupo, realizado com 236 pacientes brasileiros com câncer de cabeça e pescoço e 469 indivíduos controles, o genótipo *MTR* 2756GG e alelo *MTR* 2756G foram associados com um risco aumentado de HNSCC⁴⁵. Por outro lado, o estudo de Suzuki et al.⁴², realizado no Japão, em 237 pacientes com câncer de cabeça e pescoço e 711 indivíduos controles, não mostrou associação desse polimorfismo com o câncer de cabeça e pescoço.

Polimorfismo *MTRR* A66G

Estudos mostram que essa variante gera uma enzima com baixa afinidade pela enzima *MTR*⁷⁶. Quanto ao nível de Hcy plasmática, o estudo de Gaughan et al.⁷⁷ confirmou que indivíduos com o genótipo *MTRR* 66GG apresentam níveis baixos de Hcy quando comparados com o genótipo *MTRR* 66AA. No entanto, este efeito não foi observado por outros estudos^{78,79}.

Poucos estudos têm investigado a associação entre *MTRR* A66G e o risco de câncer de cabeça e pescoço. Suzuki et al.⁴² confirmaram que essa variante não está associada com o risco de câncer de cabeça e pescoço, porém, eles encontraram interação entre o consumo de álcool e o polimorfismo *MTRR* A66G em uma população japonesa. Zhang et al.⁷⁵ mostraram que indivíduos com o genótipo homocigoto selvagem (*MTRR* 66AA) possuem risco diminuído de câncer de cabeça e pescoço, confirmando que o alelo A é um alelo protetor.

Polimorfismo *RFC1* A80G

O gene *RFC1* está envolvido no transporte intracelular de folato. Ele é responsável pela absorção e transporte de 5-MTHFR para o interior de uma variedade de células. O polimorfismo *RFC1* A80G pode estar envolvido na carcinogênese por alterar as concentrações de Hcy e folato

plasmático, que estão associadas com metilação e reparo do DNA. Entretanto, o exato mecanismo biológico desse polimorfismo ainda não está esclarecido^{48,80-83}.

Somente o estudo do nosso grupo de pesquisa avaliou a variante *RFC1* A80G no risco de câncer de cabeça e pescoço e foi confirmado que os genótipos *RFC1* 80AG ou 80AA foram associados com aumento de risco desse tipo de tumor, principalmente em indivíduos do gênero masculino, com idade superior a 50 anos e fumantes⁸⁴.

Outros polimorfismos do metabolismo do folato

O efeito do polimorfismo *MTHFD1* G1958A foi avaliado em câncer de cabeça e pescoço em apenas um estudo e não mostrou associação com risco da doença⁴⁴. Os polimorfismos *CBS* 844ins68, *BHMT* G742A, *SHMT* C1420T, *TC2* A67G e *TC2* C776G, também envolvidos no metabolismo do folato, ainda não foram estudados em câncer de cabeça e pescoço, porém, dois deles estão associados a outros tipos de câncer⁸⁵⁻⁸⁹.

CONCLUSÕES

Os polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR*A2756G, *MTRR*A66G e *RFC1* A80G parecem modular o risco de câncer de cabeça e pescoço. Entretanto, devido aos achados contraditórios, estudos em diferentes populações são necessários para o esclarecimento do papel desses polimorfismos na etiologia do câncer de cabeça e pescoço.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chen YJ, Chang JT, Liao CT, Wang HM, Yen TC, Chiu CC, et al. Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. *Cancer Sci*. 2008;99(8):1507-14.
2. Marcu LG and Yeoh. A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009;135(10):1303-14.
3. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp>
4. Lothaire P, de Azambuja E, Dequanter D, Lalami Y, Sotiriou C, Andry G, et al. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck*. 2006;28(3):256-69.
5. Ragin CCR, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on a human papillomavirus. *J Den Res*. 2007;86(2):104-14.
6. Salzwimmer M. Best supportive care in HNSCC. *Wien Med Wochenschr*. 2008;158(9-10):278-82.
7. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Stinchcomb DG, Howlader N, Horner MJ, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004. Bethesda, MD: National Cancer Institute 2006.
8. Licitra L, Locati LD, Bossi P. Optimizing approaches to head and neck cancer. Metastatic head and neck cancer: new options. *Ann Oncol*. 2008;19(7):200-3.
9. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74-108.
10. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2007;356(19):1944-56.

11. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol.* 2008;26(4):612-9.
12. 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(10):777-89.
13. Rubin, H. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis.* 2001;22(12):1903-30.
14. Choi S, Myers JN. Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Implications for Therapy. *J Dent Res.* 2008; 87(1):14-32.
15. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* 2006;7(2):149-56.
16. Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell.* 2006;124(4):823-35.
17. Abnet CC, Qiao Y-L, Dawsey SM, Dong Z-W, Taylor PR, Mark SD. Tooth loss is associated with increased risk of total death and death from upper gastrointestinal cancer, heart disease, and stroke in a Chinese population-based cohort. *Int J Epidemiol.* 2005;34(2):467-74.
18. Pavia M, Pileggi C, Nobile CG, Angelillo IF. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(5):1126-34.
19. Marchioni DML, Fisberg RM, Góis Filho JF, Kowalski LP, Carvalho MB, Abrahão M, et al. Dietary patterns and risk of oral cancer: a case-control study in São Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pública.* 2007;41(1):19-26.
20. Garavello W, Lucenteforte E, Bosetti C, Talamini R, Levi F, Tavani A, Franceschi S, Negri E, La Vecchia C. Diet diversity and the risk of laryngeal cancer: A case-control study from Italy and Switzerland. *Oral Oncol.* 2009;45(1):85-9.
21. Prado RP, dos Santos BF, Pinto CLS, Assis KRC, Salvadori DMF, Ladeira MSP. Influence of diet on oxidative DNA damage, uracil misincorporation and DNA repair capability. *Mutagenesis.* 2010;25(5):483-7.
22. Suzuki T, Wakai K, Matsuo K, Hirose K, Ito H, Kuriki K, et al. Effect of dietary antioxidants and risk of oral, pharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma according to smoking and drinking habits. *Cancer Sci.* 2006;97(8):760-7.
23. Xu WH, Shrubsole MJ, Xiang YB, Cai Q, Zhao GM, Ruan ZX, et al. Dietary folate intake, MTHFR genetic polymorphisms, and the risk of endometrial cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(2):281-7.
24. Sapkota A, Hsu CC, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, et al. Dietary risk factors for squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in central and eastern Europe. *Cancer Causes Control.* 2008;19(10):1161-70.
25. Garcia-Crespo D, Knock E, Jabado N, Rozen R. Intestinal neoplasia induced by low dietary folate is associated with altered tumor expression profiles and decreased apoptosis in mouse normal intestine. *J Nutr.* 2009;139(3):488-94.
26. Linhart HG, Troen A, Bell GW, Cantu E, Chao W, Moran E, et al. Folate Deficiency induces genomic uracil misincorporation and hypomethylation but does not increase DNA point mutations. *Gastroenterology.* 2009;136(1):227-35.e3.
27. Duthie SJ. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(1):101-9.
28. Bailey LB. Folate, methyl-related nutrients, alcohol, and the MTHFR 677C-T polymorphism affect cancer risk: intake recommendation. *Am Soc Nutr Sci.* 2003;133(11 Suppl 1):3748S-53S.
29. Charasson V, Hillaire-Buys D, Solassol I, Laurand-Quancard A, Pinguet F, Morvan VL, et al. Involvement of gene polymorphisms of the folate pathway enzymes in gene expression and anticancer drug sensitivity using the NCI-60 panel as a model. *Eur J Cancer.* 2009;45(13):2391-401.
30. DAlessio AC, Szyf M. Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem Cell Biol.* 2006;84(4):463-76.
31. Tuck-Muller CM, Narayan A, Tsien F, Smeets DF, Sawyer J, Fiala ES, et al. DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet.* 2000;89(1-2):121-8.
32. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002;3(6):415-28.
33. Ehrlich M. Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *J Cell Biochem.* 2003;88(5):899-910.
34. Sciandrello G, Caradonna F, Mauro M, Barbata G. Arsenic-induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammalian cells. *Carcinogenesis.* 2004;25(3):413-7.
35. Johanning GL, Heimbürger DC, Piyathilake CJ. DNA methylation and diet in cancer. *J Nutr.* 2002;132(12):3814S-18S.
36. Kane, MA. The role of folates in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Detect Prev.* 2005;29(1):46-53.
37. Weinstein SJ, Gridley G, Harty LC, Diehl SR, Brown LM, Winn DM, et al. Folate intake, serum homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T genotype are not associated with oral cancer risk in Puerto Rico. *J Nutr.* 2002;132(4):762-7.
38. Kureshi N, Ghaffar S, Siddiqui S, Salahuddin I, Frossard PM. Head and neck cancer susceptibility: a genetic marker in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2004;66(5):241-5.
39. Neumann AS, Lyons HJ, Shen H, Liu Z, Shi Q, Sturgis EM, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. *Int J Cancer.* 2005;115(1):131-6.
40. Vairaktaris E, Yapijakis C, Kessler P, Vylliotis A, Ries J, Wilfang J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and minor increase of risk for oral cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006;132(4):219-22.
41. Reljic A, Simundic AM, Topic E, Nikolac N, Justinic D, Stefanovic M. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and cancer risk: the Croatian case-control study. *Clin Biochem.* 2007;40(13-14):981-5.
42. Suzuki T, Matsuo K, Hasegawa Y, Hiraki A, Wakai K, Hirose K, et al. One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of head and neck squamous cell carcinoma: case-control study. *Cancer Sci.* 2007;98(9):1439-46.
43. Solomon PR, Selvam GS, Shanmugam G. Polymorphism in ADH and MTHFR genes in oral squamous cell carcinoma of Indians. *Oral Dis.* 2008;14(7):633-9.
44. Kruszyna E, Lianeri M, Rydzanicz M, Gajicka M, Szyfter K, Jagodziński PP. Polymorphic variants of folate metabolism genes and the risk of laryngeal cancer. *Mol Biol Rep.* 2010;37(1):241-7.
45. Galbiatti ALS, Ruiz MT, Biselli-Chicote PM, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino-Bertelli EC, Goloni-Bertollo EM. 5-Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase gene polymorphism (MTR) and risk of head and neck cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(5):445-50.
46. Scheer JB, Mackey AD and Gregory JF. Activities of hepatic cytosolic and mitochondrial forms of serine hydroxymethyltransferase and hepatic glycine concentration are affected by vitamin B-6 intake in rats. *J Nutr.* 2005;135(2):233-8.
47. Niclot S, Pruvot Q, Besson C, Savoy D, Macintyre E, Salles G, et al. Implication of the folate-methionine metabolism pathways in susceptibility to follicular lymphomas. *Blood.* 2006;108(1):278-85.
48. Finkelstein JD, Martin JJ. Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32(4):385-9.
49. Morin I, Platt R, Weisberg I, Sabbaghian N, Wu Q, Garrow TA, Rozen R. Common variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and risk for spina bifida. *Am J Med Genet.* 2003;119A(2):172-6.
50. Mason JB, Choi SW. Effects of alcohol on folate metabolism: implications for Carcinogenesis. *Alcohol.* 2005;35(3):235-41.

51. Ueland PM, Holm PI, Hustad S. A key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(10):1069-75.
52. Weisberg IS, Park E, Ballman KV, Berger P, Nunn M, Suh DS, et al. Investigations of a common genetic variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) in coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2003;167(2):205-14.
53. Haddad R, Mendes MA, Hoehr NF, Eberlin MN. Amino acid quantitation in aqueous matrices via trap and release membrane introduction mass spectrometry: homocysteine in human plasma. *Analyst.* 2001;126(8):1212-5.
54. Födinger M, Dierkes J, Skoupy S, Röhrer C, Hagen W, Puttinger H, et al. Effect of glutamate carboxypeptidase ii and reduced folate carrier polymorphisms on folate and total homocysteine concentrations in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(5):1314-9.
55. Baluz K, Carmo MGT, Rosas G. The role of folic acid on oncologic prevention and intervention: review. *Rev Bras Cancerol.* 2002;48(4):597-60.
56. Brody LC, Conley M, Cox C, Kirke PN, McKeever MP, Mills JL, et al. A polymorphism, R653Q, in the trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase/formyltetrahydrofolate synthetase is a maternal genetic risk factor for neural tube defects: report of the Birth Defects Research Group. *Am J Hum Genet.* 2002;71(5):1207-15.
57. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet.* 1996;5(12):1867-74.
58. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab.* 1998;64(3):169-72.
59. Molloy AM, Daly S, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D, et al. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997;349(9065):1591-3.
60. Girelli D, Friso S, Trabetti E, Olivieri O, Russo C, Pessotto R, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine, and folate in subjects from northern Italy with or without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease: evidence for an important genetic-environmental interaction. *Blood.* 1998;91(11):4158-63.
61. McNulty H, McKinley MC, Wilson B, McPartlin J, Strain JJ, Weir DG, et al. Impaired functioning of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase is dependent on riboflavin status: implications for riboflavin requirements. *Am J Clin Nutr.* 2002;76(2):436-41.
62. Friso S, Girelli D, Trabetti E, Olivieri O, Guarini P, Pignatti PF, et al. The MTHFR 1298A.C polymorphism and genomic DNA methylation in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005;14(4):938-43.
63. Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M, Kluijtmans LA, van der Put NM, et al. A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk. *J Mol Med.* 2001;79(9):522-8.
64. Chango A, Boisson F, Barbé F, Quilliot D, Drosch S, Pfister M, et al. The effect of 677C>T and 1298A>C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br J Nutr.* 2000;83(6):593-6.
65. Narayanan S, McConnell J, Little J, Sharp L, Piyathilake CJ, Powers H, et al. Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(9):1436-43.
66. Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Mol Genet.* 1996;5(12):1851-8.
67. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J, et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(9):825-9.
68. Harmon DL, Shields DC, Woodside JV, McMaster D, Yarnell JW, Young IS, et al. Methionine synthase D919G polymorphism significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Genet Epidemiol.* 1999;17(4):298-309.
69. Silaste ML, Rantala M, Sampi M, Alftan G, Aro A, Kesäniemi YA. Polymorphisms of key enzymes in homocysteine metabolism affect diet responsiveness of plasma homocysteine in healthy women. *J Nutr.* 2001;131(10):2643-7.
70. Chen J, Stampfer MJ, Ma J, Selhub J, Malinow MR, Hennekens CH, et al. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2001;154(3):667-72.
71. Dekou V, Gudnason V, Have E, Miller GJ, Stansbie D, Humphries SE. Gene environment and gene-gene interaction in the determination of plasma homocysteine levels in healthy middle-aged men. *Thromb Haemost.* 2001;85(1):67-74.
72. Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, et al. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res.* 2002;62(15):4519-24.
73. Fang JY, Xiao SD. Folic acid, polymorphism of methyl-group metabolism genes, and DNA methylation in relation to GI carcinogenesis. *J Gastroenterol.* 2003;38(9):821-9.
74. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(22):4632-42.
75. Zhang Z, Shi Q, Liu Z, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(5):1188-93.
76. Olteanu H, Munson T, Banerjee R. Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase. *Biochemistry.* 2002;41(45):13378-85.
77. Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S, McMaster D, Young IS, Yarnell JW, et al. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis.* 2001;157(2):451-6.
78. Geisel J, Zimbelmann I, Schorr H, Knapp JP, Bodis M, Hübner U, et al. Genetic defects as important factors for moderate hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39(8):698-704.
79. O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *Am J Med Genet.* 2002;107(2):151-5.
80. Eklof V, Van GB, Hultdin J, Johansson I, Hallmans G, Palmqvist R. The reduced folate carrier (RFC1) 80G > A and folate hydrolase 1 (FOLH1) 1561C > T polymorphisms and the risk of colorectal cancer: a nested case-referent study. *Scand J Clin Lab Invest.* 2008;68(5):393-401.
81. DeVos L, Chanson A, Liu Z, Ciappio ED, Parnell LD, Mason JB, et al. Associations between single nucleotide polymorphisms in folate uptake and metabolizing 497 genes with blood folate, homocysteine, and DNA uracil concentrations. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(4):1149-58.
82. Matherly LH, Hou Z, Deng Y. Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;26(1):111-28.
83. Stanisławska-Sachadyn A, Mitchell LE, Woodside JV, Buckley PT, Kealey C, Young IS, et al. The reduced folate carrier (SLC19A1) c.80G[A polymorphism is associated with red cell folate concentrations among women. *Ann Hum Genet.* 2009;73(Pt 5):484-91.
84. Galbiatti AL, Ruiz MT, Rezende Pinto D, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino-Bertelli EC, et al. A80G polymorphism of reduced folate carrier 1 (RFC1) gene and head and neck squamous cell carcinoma etiology in Brazilian population. *Mol Biol Rep.* 2011;38(2):1071-8.

-
85. Wang Y, Guo W, He Y, Chen Z, Wen D, Zhang X, et al. Association of MTHFR C677T and SHMT1 C1420T with susceptibility to ESCC and GCA in a high incident region of Northern China. *Cancer Causes Control*. 2007;18(2):143-52.
86. Jonge R, Tissing WJE, Hooijberg JH, Jansen G, Kaspers GJL, Lindemans J, et al. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009;113(10):2284-9.
87. Guerreiro CS, Carmona B, Gonçalves S, Carolino E, Fidalgo P, Brito M, et al. Risk of colorectal cancer associated with the C677T polymorphism in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in Portuguese patients depends on the intake of methyl-donor nutrients. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(5):1413-8.
88. Ott N, Geddert H, Sarbia M. Polymorphisms in methionine synthase (A2756G) and cystathionine -synthase (844ins68) and susceptibility to carcinomas of the upper gastrointestinal tract. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008;134(3):405-10.
89. Le Marchand L, Donlon T, Hankin JH, Kolonel LN, Wilkens LR, Seifried A. B-vitamin intake, metabolic genes, and colorectal cancer risk (United States). *Cancer Causes Control*. 2002;13(3):239-48.