JULIANA DE ANTONIO

**Polimorfismos genéticos e o câncer de cavidade oral e laringe:
contribuição do álcool e fumo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Gilka Jorge Figaro
Gattás

São Paulo

2019

JULIANA DE ANTONIO

**Polimorfismos genéticos e o câncer de cavidade oral e laringe:
contribuição do álcool e fumo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Gilka Jorge Figaro
Gattás

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

De Antonio, Juliana
Polimorfismos genéticos e o câncer de cavidade
oral e laringe : contribuição do álcool e fumo /
Juliana De Antonio. -- São Paulo, 2019.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.
Orientadora: Gilka Jorge Figaro Gattas.

Descritores: 1.Polimorfismo genético 2.Genes de
metabolização do álcool 3.Genes de dependência do
álcool e do tabaco 4.Câncer de cavidade oral 5.Câncer
de laringe 6.Consumo de bebidas alcoólicas 7.Uso de
tabaco 8.Risco

USP/FM/DBD-376/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À minha mãe Deva, ao meu pai Aléssio
e meu irmão Paulo,
pelos vínculos genéticos e de amor que nos tornam fortes e unidos.

Ao Joca, por todo amor, humor, paciência e incentivo
e pelo privilégio de estar ao seu lado
todos os dias.

AGRADECIMENTOS

A Deus sempre, por tudo o que sou, por tudo que tenho, e por ter permitido que eu chegasse até aqui.

À Profa. Dra. Gilka Jorge Figaro Gattás, Livre Docente do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), a quem agradeço pela orientação, pela oportunidade, por todos os ensinamentos e pelo estímulo constante para meu crescimento profissional. Inteligência marcante e Cientista exemplar.

À Dra. Fernanda de Toledo Gonçalves, Pesquisadora Científica do LIM 40, por toda ajuda, pelas sugestões e discussões tão significativas em todas as etapas desta pesquisa, mas acima de tudo pela sua amizade, confiança e irmandade desde que ingressei no “Lab”. A você o meu mais profundo reconhecimento e gratidão.

Ao Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis - São Paulo, em especial ao Dr. Otávio Alberto Curioni pelo trabalho conjunto que desenvolvemos nesses últimos anos e a Dra. Mariana Rizzo pela coordenação na coleta do material biológico e elaboração do banco de dados.

Aos pacientes do Hospital Heliópolis que aceitaram participar do estudo e foram essenciais para a sua realização.

Às amigas e pesquisadoras Isabela Firigato e Mariana Rocha Silva pela inestimável ajuda durante a execução deste trabalho, por todos os incentivos e pelos divertidos momentos de convivência.

Aos colegas, funcionários e ex-funcionários do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho da FMUSP, em especial ao Valtair, Fátima, Liliane, Dirce, Dona Antônia, Estela e Priscila, pela adorável convivência, pelos cafezinhos e pela imprescindível colaboração demonstrada todos esses anos.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, em especial ao secretário Thiago Rezende pelas orientações constantes ao longo do meu doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido ao Projeto de Pesquisa Regular (Processo: 2014/16092-4).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao LIM 40 do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho pelo apoio financeiro concedido para a realização de parte experimental da pesquisa.

À Dra Tatiane Furuya e à Dra Rossana Lopez pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao serviço de Biblioteca e Documentação da FMUSP.

A todos aqueles, que direta ou indiretamente, colaboraram para minha formação científica e aos amigos e familiares, que de forma tão significativa tornaram possível a realização deste trabalho.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com a seguinte norma em vigor no momento desta publicação:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

SUMÁRIO

Lista de siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Câncer de cavidade oral e laringe	3
2.1.1 Histologia e anatomia	3
2.1.2 Incidência e mortalidade	5
2.1.3 Sinais e sintomas	7
2.1.4 Diagnóstico e estadiamento TNM	7
2.1.5 Tratamento e sobrevida	8
2.1.6 Fatores de risco	10
2.2 Mecanismo específico da carcinogênese mediada pelo álcool	12
2.2.1 O acetaldeído como carcinógeno	12
2.2.2 Polimorfismos funcionais nos genes codificadores das enzimas de metabolização do álcool (ADH e CYP2E1) e acetaldeído (ALDH)	15
2.3 Sistema de reforço e recompensa e a dependência do álcool e tabaco	21
2.3.1 Polimorfismos dos genes <i>OPRM1</i> , <i>DRD2</i> , <i>SLC6A4</i> , <i>CHRNA3</i> e <i>CHRNA5</i> ...21	
3 OBJETIVOS	27
4 MÉTODOS	28
4.1 Casuística	28

4.1.1 Seleção dos casos	28
4.1.2 Seleção dos controles	29
4.2 Questionário	29
4.3 Hábitos de beber e fumar e os padrões de consumo do álcool e do tabaco	30
4.4 Coleta do sangue periférico e obtenção do DNA genômico	30
4.5 Pesquisa dos polimorfismos genéticos	31
4.6 Análises estatísticas	34
4.6.1 Verificação do tamanho amostral	34
4.6.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg	34
4.6.3 Modelos genéticos avaliados	34
4.6.4 Associações dos polimorfismos genéticos com o câncer de cavidade oral e de laringe.....	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Características das neoplasias de cavidade oral e laringe	36
5.2 Descrição das características sociodemográficas, dos hábitos de beber e fumar e dos padrões de consumo do álcool (g/dia) e do tabaco (maços/ano) da população de estudo.....	36
5.3 Análise dos polimorfismos genéticos	42
6 DISCUSSÃO	49
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
8 CONCLUSÕES	66
9 ANEXOS	68
10 REFERÊNCIAS	85

LISTA DE SIGLAS

ADH: enzima álcool desidrogenase
ADH1B: álcool desidrogenase 1B classe I polipeptídeo β
ADH1C: álcool desidrogenase 1C classe I polipeptídeo γ
AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
Ala: alanina
ALDH: enzima aldeído desidrogenase
ALDH2: aldeído desidrogenase família 2
Arg: arginina
Asn: asparagina
Asp: ácido aspártico
CEC: carcinoma de células escamosas ou espinocelular
CHRNA3: receptor colinérgico nicotínico subunidade $\alpha 3$
CHRNA5: receptor colinérgico nicotínico subunidade $\alpha 5$
CYP2E1: citocromo P450 família 2 subfamília E polipeptídeo 1
Cys: cisteína
DNA: ácido desoxirribonucleico
DRD2: receptor de dopamina 2
Gln: glutamina
Glu: glutamato
His: histamina
5-HT: serotonina
Ile: isoleucina
Lys: lisina
INCA: Instituto Nacional do Câncer
nAChR: receptores colinérgicos nicotínicos
NCI: *National Cancer Institute*
OPRM1: receptor μ -opióide 1
ROS: espécies reativas de oxigênio
SLC6A4/5-HTT: transportador de serotonina
SNP: polimorfismo de base única
Val: valina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativas do número de casos novos de câncer de cavidade oral e laringe e das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes no Brasil e nas regiões brasileiras, segundo o sexo em 2018	6
Tabela 2 - Nomenclatura para os três alelos do gene <i>ADH1B</i>	16
Tabela 3 - Nomenclatura para os dois alelos do gene <i>ADH1C</i>	17
Tabela 4 - Relação dos polimorfismos genéticos analisados pela tecnologia da PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR), incluindo a transição nucleotídica e de aminoácidos e as sequências contexto dos ensaios TaqMan®	33
Tabela 5 - Características clínicas, tratamento e evolução dos pacientes com CEC de cavidade oral ou de laringe	39
Tabela 6 - Distribuição dos pacientes com CEC de cavidade oral ou de laringe e dos controles segundo as variáveis sociodemográficas sexo, idade, cor da pele e escolaridade	40
Tabela 7 - Resultados das análises univariadas dos hábitos de beber e fumar e dos padrões de consumo do álcool (g/dia) e do tabaco (maços/ano) entre os pacientes com CEC de cavidade oral ou de laringe e os controles	41
Tabela 8 - Distribuição das frequências genotípicas e dos alelos polimórficos, além dos resultados do Equilíbrio Hardy-Weimberg (EHW) das variantes genéticas avaliadas para o grupo controle (N=448)	43
Tabela 9 - Resultados das análises univariadas dos cinco polimorfismos das enzimas de metabolização do álcool - <i>ADH1B</i> , <i>ADH1C</i> e <i>CYP2E1</i> - com o risco de CEC de cavidade oral e laringe	44

Tabela 10 - Resultados da análise de regressão logística dos cinco polimorfismos das enzimas de metabolização do álcool - *ADH1B*, *ADH1C* e *CYP2E1* - com o risco de CEC de cavidade oral e laringe 45

Tabela 11 - Resultados das análises univariadas dos quatro polimorfismos em genes associados com a dependência do álcool e tabaco - *OPRM1*, *DRD2* e *SLC6A4* - e dos dois polimorfismos em genes associados exclusivamente com a dependência do tabaco - *CHRNA3* e *CHRNA5* - com o risco de CEC de cavidade oral e laringe 47

Tabela 12 - Resultados da análise de regressão logística dos quatro polimorfismos em genes associados com a dependência do álcool e tabaco - *OPRM1*, *DRD2* e *SLC6A4* - e dos dois polimorfismos em genes associados exclusivamente com a dependência do tabaco - *CHRNA3* e *CHRNA5* - com o risco de CEC de cavidade oral e laringe 48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia da cavidade oral	3
Figura 2 - Anatomia da laringe	4
Figura 3 - Metabolismo do etanol e seu papel na carcinogênese	13
Figura 4 - Representação esquemática da enzima aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) codificada pelos genótipos homozigoto selvagem (<i>ALDH2*1/*1</i>), heterozigoto (<i>ALDH2*1/*2</i>) e homozigoto mutado (<i>ALDH2*2/*2</i>)	20

RESUMO

De Antonio J. *Polimorfismos genéticos e o câncer de cavidade oral e laringe: contribuição do álcool e fumo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: Os principais fatores de risco relacionados ao carcinoma de células escamosas (CEC) da cavidade oral e da laringe são o tabagismo e o etilismo, existindo um efeito sinérgico entre esses fatores e uma relação diretamente proporcional com a quantidade e tempo de exposição. Embora muitos indivíduos estejam expostos à essas substâncias, somente uma parcela desenvolve o câncer, sugerindo que diferenças genéticas individuais influenciam a carcinogênese. Genes responsáveis pela codificação de enzimas que metabolizam o álcool (*ADH1B*, *ADH1C*, *CYP2E1*) e de moléculas envolvidas no sistema de reforço e recompensa do consumo de álcool e tabaco (*OPRM1*, *DRD2*, *SLC6A4*, *CHRNA5* e *CHRNA3*) exibem polimorfismos genéticos que parecem modular a suscetibilidade individual ao câncer. O presente estudo selecionou 11 polimorfismos genéticos presentes nesses genes (*ADH1B**2, *ADH1B**3, *ADH1C**1, *ADH1C**2, *CYP2E1* c2, *OPRM1* Asn40Asp, *OPRM1* Ala6Val, *DRD2* Glu713Lys, *SLC6A4* (indel), *CHRNA5* Asp398Asn e *CHRNA3*) e avaliou a contribuição deles no risco do câncer de cavidade oral e de laringe. Alguns fatores individuais como os hábitos de beber e fumar e os padrões de consumo do álcool e do tabaco também foram considerados nas análises de risco. **MÉTODOS:** As variantes genéticas foram genotipadas em 384 pacientes com câncer (235 pacientes com CEC de cavidade oral e 149 pacientes com CEC de laringe) e em 448 indivíduos sem histórico de neoplasias, selecionados no Hospital Heliópolis, São Paulo - Brasil. As análises de associação foram realizadas para dois modelos genéticos (genótipos e dominante). **RESULTADOS:** A variante alélica *ADH1B**2 em heterozigose (*ADH1B**1/*2) foi associada a um risco menor de desenvolvimento tanto do carcinoma de cavidade oral (OR = 0,36; IC 95% 0,19 - 0,70) quanto do carcinoma de laringe (OR = 0,33; IC 95% 0,15 - 0,73). Esse efeito potencialmente protetor também foi mantido no modelo genético dominante para ambos os tumores (p <0,05). Por outro lado, os pacientes com genótipo heterozigoto para os polimorfismos *OPRM1* (Asn40Asp, alelo G) e *OPRM1* (Ala6Val, alelo T) apresentaram riscos 1,73 e 1,89 vezes maiores de desenvolver o câncer de laringe quando comparado

aos indivíduos com genótipo homozigoto selvagem. Riscos semelhantes também permaneceram para o modelo genético dominante. Quanto ao hábito de beber, somente os pacientes que se declararam bebedores atuais apresentaram risco de desenvolver o CEC de cavidade oral (OR = 1,83; IC 95% 1,20 - 2,79) quando comparados aos indivíduos que nunca beberam, enquanto a ingestão pesada de bebidas alcoólicas (≥ 50 g/dia) elevou o risco tanto para o carcinoma de cavidade oral (OR = 2,58; IC 95% 1,68 - 3,93) quanto para o de laringe (OR = 2,08; IC 95% 1,27 - 3,43). Já o hábito de fumar aumentou em quase oito vezes o risco de desenvolver ambas as neoplasias entre os pacientes que declararam ser fumantes atuais quando comparados aos indivíduos que nunca fumaram, enquanto aqueles que se declararam ex-fumantes apresentaram riscos menores de desenvolver o CEC de cavidade oral (OR = 2,72; IC 95% 1,41 - 5,25) e de laringe (OR = 4,17; IC 95% 1,86 - 9,34). Verificou-se também aumento progressivo no risco de ambos os cânceres em decorrência da carga tabágica (maços-ano) consumida. Para o CEC de cavidade oral, os riscos foram duas (até 20 maços-ano; $p = 0,022$), seis (21 - 40 maços-ano; $p < 0,001$) e nove (> 40 maços-ano; $p < 0,001$) vezes maior para os pacientes quando comparado aos indivíduos que nunca fumaram, enquanto para o CEC de laringe observamos riscos sete (21 - 40 maços-ano; $p < 0,001$) e 11 (> 40 maços-ano; $p < 0,001$) vezes maior. CONCLUSÕES: Os resultados obtidos parecem sugerir uma contribuição dos polimorfismos genéticos associados com a metabolização do álcool (*ADH1B*2*) e com o consumo abusivo e dependente do álcool e tabaco (*OPRM1* Asn40Asp e *OPRM1* Ala6Val) no risco dos carcinomas de cavidade oral e da laringe. Além disso, ratificamos a contribuição e a importância de fatores de riscos conhecidos, como o fumo e o consumo excessivo de bebidas alcoólicas no desenvolvimento dessas neoplasias.

Descritores: Polimorfismo genético; Genes de metabolização do álcool; Genes de dependência do álcool e do tabaco; Câncer de cavidade oral; Câncer de laringe; Consumo de bebidas alcoólicas; Uso de tabaco; Risco.

ABSTRACT

De Antonio J. *Genetic polymorphisms and oral cavity and larynx cancer: contribution of alcohol and tobacco* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

INTRODUCTION: The main risk factors related to squamous cell carcinoma (SCC) of the oral cavity and larynx are smoking and alcoholism, and there is a synergistic effect between these factors and a directly proportional relationship with the amount and time of exposure. Although many individuals are exposed to these substances, only one parcel develops cancer, suggesting that individual genetic differences influence carcinogenesis. Genes responsible for coding enzymes that metabolized alcohol (*ADH1B*, *ADH1C*, *CYP2E1*) and molecules involved in the system of reinforcement and reward of alcohol and tobacco consumption (*OPRM1*, *DRD2*, *SLC6A4*, *CHRNA5*, *CHRNA3*) have genetic polymorphisms that appear to modulate individual susceptibility to cancer. The present study selected 11 genetic polymorphisms present in these genes (*ADH1B**2, *ADH1B**3, *ADH1C**1, *ADH1C**2, *CYP2E1* c2, *OPRM1* Asn40Asp, *OPRM1* Ala6Val, *DRD2* Glu713Lys, *SLC6A4* (indel), *CHRNA5* Asp398Asn and *CHRNA3*) and evaluated their contributions to the risk of oral cavity and larynx cancer. **METHODS:** Genetic variants were genotyped in 384 cancer patients (235 patients diagnosed with oral cavity SCC and 149 patients diagnosed with larynx SCC) and 448 individuals without cancer diagnosis, selected at Hospital Heliópolis, São Paulo - Brazil. Genetic association analyses were investigated for two genetic models (genotype and dominant). **RESULTS:** The *ADH1B**2 allelic variant in heterozygosis (*ADH1B**1/*2) was associated with a decreased risk of oral cavity (OR = 0.36; 95% CI 0.19 - 0.70) and larynx (OR = 0.33; 95% CI 0.15 - 0.73) carcinomas. This potentially protective effect was also maintained in the dominant genetic model for both tumors (p <0.05). Differently, patients with heterozygous genotypes for *OPRM1* (Asn40Asp, allele G) and *OPRM1* (Ala6Val, allele T) polymorphisms had risk 1.73 and 1.89 times higher of developing larynx cancer than individuals with wild homozygous genotypes. Similar risks also remained for the dominant genetic model. Regarding alcohol drinking status, only current drinkers had a significantly higher risk of oral cavity tumors (OR = 1.83, 95% CI 1.20 - 2.79) when compared to controls who never drank, while the heavy alcohol intake (≥ 50 g/day)

increased the risk for both oral cavity (OR = 2.58; 95% CI 1.68 - 3.93) and larynx (OR = 2.08; 95% CI 1.27 - 3.43) carcinoma. Smoking status increased the risk of developing both cancers by almost eight times among current smokers compared to controls who never smoked, while former smokers had lower risk of developing oral cavity SCC (OR = 2.72; 95% CI 1.41 - 5.25) and larynx SCC (OR = 4.17; 95% CI 1.86 - 9.34). There was also a progressive increase in the risk of both cancers due to the smoking consumption (packs-year). The risk of oral cavity carcinoma was two (until 20 packs-year; $p = 0.022$), six (21 - 40 packs-year; $p < 0.001$) and nine (> 40 packs-year; $p < 0.001$) times higher for patients than for controls who never smoked, while for larynx cancer, we found risks seven (21 - 40 packs-year; $p < 0.001$) and 11 (> 40 packs-year; $p < 0.001$) times higher. CONCLUSIONS: The results seem to suggest a contribution of the genetic polymorphisms associated with alcohol metabolism (*ADH1B**2) and alcohol and tobacco dependence (*OPRM1* Asn40Asp and *OPRM1* Ala6Val) in the risk of oral cavity and larynx carcinomas. In addition, we confirm the contribution and importance of known risk factors, such as smoking and excessive alcohol consumption in the development of these neoplasms.

Descriptors: Polymorphism, Genetic; Genes of alcohol metabolism; Genes of alcohol and tobacco dependence; Oral cavity cancer; Larynx cancer; Alcohol drinking; Tobacco use; Risk.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço têm origem, em sua maior parte, nas mucosas das vias aerodigestivas superiores, principalmente da cavidade oral, laringe e faringe. Este grupo de neoplasias é mais frequente em homens do que em mulheres e o diagnóstico, em regra, ocorre numa fase avançada da doença quando o tratamento é extenso, mutilador e doloroso para os pacientes, e as chances de cura são pequenas (Chi et al., 2015; Tamaki et al., 2018).

Este é o sexto tipo de câncer mais frequente no mundo, com incidência estimada de 500.000 novos casos e cerca de 300.000 óbitos por ano. Existe uma distribuição desigual da doença entre as regiões do globo, com maior incidência na Índia, Brasil, França, Espanha e no sul do continente Africano, com taxas de mortalidade que acompanham essa mesma distribuição (Simard et al., 2014). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima para o biênio de 2018-2019 mais de 14.000 novos casos para o câncer de cavidade oral e mais de 7.000 novos casos para os tumores de laringe.

O consumo excessivo de bebidas alcoólicas e o fumo são os principais fatores de risco na gênese desses tumores. Os estudos sustentam que o uso combinado e abusivo dessas substâncias aumenta substancialmente o risco dos cânceres de cavidade oral e de laringe em 64% e 89%, respectivamente (Hashibe et al., 2009; Tamaki et al., 2018). Outros fatores de risco incluem aspectos ambientais, hábitos de vida, dieta, infecções pelo papilomavírus humano (HPV), além de variações genéticas na população (Chi et al., 2015; Tamaki et al., 2018).

O fumo é um dos mais potentes agentes cancerígenos que o indivíduo introduz voluntariamente no organismo. No tabaco e na fumaça que dele se desprende podem ser identificadas mais de 4.000 substâncias tóxicas, das quais pelo menos 50 são carcinogênicas, entre elas os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e as nitrosaminas. Em relação ao álcool, dois dos possíveis mecanismos pelos quais seu consumo pode aumentar o risco de câncer incluem: a ação genotóxica do seu principal metabólito - o acetaldeído - e o aumento da solubilidade e permeabilidade da membrana celular para agentes carcinógenos como aqueles presentes no cigarro. Esses compostos tóxicos podem se ligar covalentemente às macromoléculas (proteínas, DNA e RNA) e desencadear eventos promotores da carcinogênese, quais sejam: formação de adutos de proteína e de DNA, erros nos sistemas de replicação, transcrição e reparo do DNA, quebras

cromossômicas e trocas entre cromátides irmãs (Brooks; Zakhari, 2014; Heymann et al., 2018).

Embora muitos indivíduos estejam expostos ao álcool e tabaco, somente uma parcela desenvolve o câncer, sugerindo que diferenças genéticas individuais influenciam a carcinogênese. Os genes responsáveis pela codificação de enzimas que metabolizam o álcool e de moléculas envolvidas no sistema de reforço e recompensa do consumo de álcool e tabaco exibem polimorfismos genéticos capazes de alterar, reduzir ou inibir as funções da proteína que codificam e de modificar a suscetibilidade individual ao câncer (Seitz; Stickel, 2007; Olfson; Bierut, 2012). Entre as variantes alélicas mais frequentemente estudadas estão aquelas presentes nos genes que codificam as enzimas álcool desidrogenase (*ADH1B*, *ADH1C*) e citocromo P450 (*CYP2E1*), o receptor μ -opióide (*OPRM1*), o receptor de dopamina (*DRD2*), os receptores colinérgicos nicotínicos (*CHRNA3*, *CHRNA5*) e o transportador de serotonina (*SLC6A4*).

A identificação de polimorfismos genéticos e dos mecanismos moleculares envolvidos constitui-se para a medicina como possibilidade de caracterização da suscetibilidade individual a diversas doenças, inclusive o câncer, podendo no futuro conduzir a novas perspectivas para a prevenção e o diagnóstico precoce, bem como para o aconselhamento genético e a terapia personalizada. A partir desse conhecimento e com o aconselhamento e acompanhamento apropriados, o paciente poderá fazer as modificações ambientais necessárias (parar de beber e fumar, emagrecer, fazer exercício, entre outras) para evitar o aparecimento das doenças. Além disso, o conhecimento de um número maior de polimorfismos e de sua associação com fatores do ambiente e determinadas patologias em uma amostra representativa de pacientes comparada com um grupo referência permitirá uma análise mais apropriada da contribuição desses polimorfismos na população brasileira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer de cavidade oral e laringe

2.1.1 Histologia e anatomia

O tipo histológico mais comum (90 a 95%) é o carcinoma de células escamosas ou espinocelular (CEC), que se origina nas células que recobrem a mucosa da cavidade oral e da laringe (Chi et al., 2015; Tamaki et al., 2018).

A cavidade oral é um local distinto da região da cabeça e pescoço que possui anatomia funcional complexa em relação à fala, deglutição e projeção facial. Localiza-se no terço inferior da face e limita-se anterior e lateralmente pelos lábios e bochechas, posteriormente pelo istmo da garganta (fauces), e superior e inferiormente pelo palato e assoalho, onde encontramos fixada a língua. Anatomicamente, a cavidade oral é composta pelos lábios, língua oral (2/3 anteriores da língua), mucosa bucal (revestimento dos lábios e bochechas), assoalho da boca, gengiva mandibular e maxilar, trígono retromolar e palato duro (Figura 1). Os seus anexos principais incluem glândulas salivares submandibulares e sublinguais e estruturas ósseas de suporte, como a mandíbula e a maxila.

Figura 1 - Anatomia da cavidade oral. Adaptado do *National Cancer Institute* (NCI)

Embora a orofaringe seja frequentemente confundida como uma extensão contínua da cavidade oral, é importante separar as duas porque as etiologias, o manejo e os resultados dos cânceres que surgem nesses dois locais são diferentes (Deschler et al., 2014; Chi et al., 2015). O câncer de cavidade oral representa 40% de todos os tumores que acometem a cabeça e pescoço e, em geral, a língua, os lábios (especialmente o inferior) e o assoalho são os sítios mais prevalentes de origem das lesões neoplásicas (INCA).

A laringe é órgão do sistema respiratório situado no plano mediano e anterior ao pescoço e se estende da faringe à traqueia. Esse órgão em formato de pirâmide funciona como uma válvula protetora que impede a passagem de ar durante a deglutição e ao mesmo tempo impossibilita que substâncias e partículas de alimentos penetrem na via respiratória. Além da via aerífera, a laringe é o principal órgão da fonação, razão pela qual é também chamada de caixa de som. A laringe é dividida em três áreas diferentes: supraglote (área superior da laringe acima das cordas vocais, incluindo a epiglote), glote (parte média da laringe que contém as cordas vocais) e subglote (área inferior da laringe entre as cordas vocais e a traqueia) (Tamaki et al., 2018 - Figura 2). O câncer de laringe representa 25% dos tumores malignos que acometem a cabeça e pescoço e 2% de todas as doenças malignas. Aproximadamente 2/3 dos tumores surgem na corda vocal verdadeira, localizada na glote, e 1/3 acomete a laringe supraglótica (INCA).

Figura 2 - Anatomia da laringe. Adaptado do *National Cancer Institute* (NCI)

2.1.2 Incidência e mortalidade

Estudos publicados em 2018 indicam que no mundo todo o câncer de cavidade oral representou 354.864 novos casos, com mais de dois terços deles ocorrendo em homens (246.420 casos). Este carcinoma foi o 13º mais frequente entre os homens (5,8 casos/100 mil) e o 21º entre as mulheres (2,3 casos/100 mil). Para o câncer de laringe foram estimados 154.977 novos casos em homens (3,6 casos/100 mil) e 22.445 em mulheres (0,5 casos/100mil), ocupando a 16ª e 28ª posições entre todos os cânceres malignos, respectivamente (Bray et al., 2018).

Em relação a mortalidade, 177.384 óbitos foram atribuídos ao câncer de cavidade oral, sendo 119.693 em homens e 57.691 em mulheres. Esses valores corresponderam a 1,9% do total de mortes no mundo em 2018, das quais 77% ocorreram em países menos desenvolvidos. Já o câncer de laringe foi responsável por 94.771 mortes (1% das mortes por câncer), das quais 81.806 ocorreram em homens (Bray et al., 2018).

No Brasil, para o biênio 2018-2019, estimam-se 11.200 novos casos de câncer de cavidade oral em homens e 3.500 em mulheres. O risco estimado é de 10,86 novos casos a cada 100 mil homens e de 3,28 para cada 100 mil mulheres, ocupando a 5ª e 12ª posição, respectivamente, entre todos os cânceres. Na distribuição por região geográfica, o câncer de cavidade oral é o quarto mais frequente entre os homens na Região Sudeste (13,77/100mil), e o 11º entre as mulheres na Região Nordeste (3,12/100mil – Tabela 1). Já para o câncer de laringe são esperados 7.670 casos novos, sendo 6.390 entre os homens e 1.280 entre as mulheres. O risco estimado é de 6,17 casos a cada 100 mil homens e de 1,2 casos a cada 100 mil mulheres, ocupando a 8ª e 16ª posição, respectivamente, entre todos os cânceres. Na distribuição por região geográfica, o câncer de laringe é o sexto mais frequente entre os homens na Região Nordeste (5,49/100 mil), e o 15º entre as mulheres na Região Norte (0,78/100 mil – Tabela 1) (INCA - Estimativa 2018).

Em 2015, no Brasil, foram registrados 4.672 óbitos por câncer de cavidade oral em homens e 1.226 em mulheres. Para o câncer de laringe, foram registrados 3.809 óbitos entre os homens e 574 entre as mulheres (INCA - Estimativa 2018).

Tabela 1 - Estimativas do número de casos novos de câncer de cavidade oral e laringe e das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes no Brasil e nas regiões brasileiras, segundo o sexo em 2018

	Regiões Brasileiras ^a	Casos	Taxa Bruta			Regiões Brasileiras ^a	Casos	Taxa Bruta
CAVIDADE ORAL	Brasil (5º)	11.220	10,86	Homens	Mulheres	Brasil (12º)	3.500	3,28
	Norte (6º)	330	3,59			Norte (12º)	170	1,78
	Nordeste (5º)	1.890	6,72			Nordeste (11º)	920	3,12
	Centro Oeste (5º)	780	9,72			Centro Oeste (12º)	250	2,96
	Sudeste (4º)	5.920	13,77			Sudeste (13º)	1.620	3,64
	Sul (6º)	2.280	15,40			Sul (15º)	540	3,59
LARINGE	Brasil (8º)	6.390	6,17	Homens	Mulheres	Brasil (16º)	1.280	1,20
	Norte (10º)	240	2,52			Norte (15º)	100	0,78
	Nordeste (6º)	1.550	5,49			Nordeste (16º)	220	0,80
	Centro Oeste (9º)	410	5,19			Centro Oeste (16º)	110	1,45
	Sudeste (8º)	2.620	6,08			Sudeste (16º)	660	1,47
	Sul (7º)	1.570	10,57			Sul (16º)	190	1,30

^a posição que o câncer de cavidade oral e laringe ocupam entre todos os cânceres (exceto pele não melanoma) no Brasil e em cada região brasileira, segundo o sexo (INCA - Estimativa 2018).

2.1.3 Sinais e sintomas

Os cânceres de cavidade oral e laringe apresentam sinais e sintomas que variam de acordo com a localização e grau de desenvolvimento da doença. Nos estágios iniciais, os sinais clínicos do câncer oral e laringe são frequentemente assintomáticos e incluem feridas ou aftas que não cicatrizam por mais de 15 dias, manchas irremovíveis de coloração branca ou vermelha nos lábios e mucosa oral (leucoplasias e eritroplasias), irritação e sensação de que algo está preso na garganta, rouquidão persistente ou alteração na voz. Já em estágios avançados, os cânceres são geralmente grandes, exofíticos ou profundamente ulcerados, apresentam endurecimento, sangram facilmente com ligeira provocação e metastatizam para linfonodos regionais. Nesta fase, os sintomas recorrentes englobam: dor significativa, dormência na língua ou outra área da boca, soltura dos dentes, dificuldade para usar próteses, nódulos no pescoço, disfagia, odinofagia, disartria, perda de peso, cansaço, mau hálito persistente, dispneia, dores ósseas e fraturas causadas por metástases ósseas (NCI; Chi et al., 2015; Tamaki et al., 2018).

Os cânceres de boca e laringe podem ser diagnosticados nas fases iniciais da doença, desde que o paciente tenha o hábito de realizar o autoexame da boca e pescoço e/ou buscar por ajuda médica se dois ou mais sintomas forem percebidos paralelamente e perdurarem por mais de 2 semanas. O diagnóstico precoce é fundamental para o sucesso na redução do número de casos, prognóstico favorável e eficácia dos tratamentos. No entanto, 60 a 70% dos casos são diagnosticados tardiamente e em fase avançada da doença, quando o tratamento é extenso, mutilador e doloroso para os pacientes, e as chances de cura são pequenas. Algumas razões determinantes para este quadro incluem: o fato da doença ser geralmente assintomática nos estágios iniciais, de pacientes negligenciarem os primeiros sintomas - muitas vezes confundíveis com enfermidades passageiras que não despertam grandes preocupações -, o difícil acesso aos serviços públicos de saúde e de profissionais inaptos a identificar a doença no primeiro contato com o paciente.

2.1.4 Diagnóstico e estadiamento TNM

O estadiamento clínico ou estágio do câncer, isto é, a extensão da doença e a identificação dos órgãos por ela envolvidos é estabelecido a partir dos dados do exame físico, exames de imagens e biópsia do tumor. É parte fundamental do diagnóstico porque

auxilia na escolha do melhor tratamento a ser iniciado. Já o estadiamento patológico baseia-se nos achados cirúrgicos e no exame anatomopatológico da peça operatória, sendo um importante indicativo do prognóstico da doença, da previsão de complicações e da resposta ao tratamento. O estadiamento patológico pode ou não coincidir com o estadiamento clínico e não é aplicável a todos os tumores (INCA).

O sistema de estadiamento utilizado para os cânceres de boca e laringe é o Sistema de Classificação TNM preconizado pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC, 2010a,b). Este sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M). As categorias TNM recebem graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente. Além das graduações numéricas, as categorias T e N podem ser subclassificadas em graduações alfabéticas (a, b, c). Tanto as graduações numéricas como as alfabéticas expressam o nível de evolução do tumor e dos linfonodos comprometidos e o símbolo “X” é utilizado quando uma categoria não pode ser devidamente avaliada. As definições das categorias N e M para todas as localizações e sub-localizações anatômicas da laringe são as mesmas dos tumores de cavidade oral. Já a categoria T é diferente, uma vez que sua classificação é dependente do subsítio de origem da lesão e de sua extensão.

As categorias T, N e M são então agrupadas em combinações pré-estabelecidas que determinam os estágios do tumor, quais sejam: estágio I (T1 N0 M0), estágio II (T2 N0 M0), estágio III (T3 N0 M0 / T1-3 N1 M0) e estágio IV (T4 N0-1 M0 / T1-4 N2-3 M0 / T1-4 N1-3 M1). Por vezes, os estágios são subclassificados em A, B e C, para expressar o nível de evolução da doença. Outros fatores que devem ser considerados no estadiamento são o grau de diferenciação histológico, o tipo celular, a localização do tumor e marcadores tumorais.

2.1.5 Tratamento e sobrevida

Após o diagnóstico da doença, o médico discutirá com o paciente as opções de tratamento, que dependerão da localização e tamanho do tumor, do seu estadiamento, da eficácia terapêutica, dos possíveis efeitos colaterais, bem como das condições de saúde, qualidade e expectativa de vida do paciente.

Os tratamentos oncológicos para os cânceres de cavidade oral e laringe incluem a cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia, que podem ser utilizados de forma isolada ou combinada. Os tumores precoces (estágio I e II) de cavidade oral e laringe são altamente curáveis por cirurgia e/ou radioterapia porque as lesões ainda estão limitadas ao local de origem. O tipo de cirurgia varia de acordo com a extensão do tumor e com as características anatômicas do local em que ele se encontra. As cirurgias costumam ser mais conservadoras nessas fases, e envolvem a remoção do tumor, sem haver necessidade de retirar todo o órgão no qual está instalado. Em algumas localizações, como no caso das pregas vocais, o procedimento radioterápico é menos mutilante e prejudica menos a fala do que o cirúrgico. Já para os estágios III e IV, em que há invasão do câncer para as estruturas vizinhas ou órgãos distantes, a radioterapia associada a quimioterapia ou a imunoterapia é o tratamento de escolha. A cirurgia é utilizada apenas em casos selecionados, em que o resultado estético e funcional seja aceitável, além dos casos de lesões da cavidade oral e daqueles tumores que não foram erradicados com as outras terapias. Nos cânceres muito avançados, principalmente aqueles em estágio IV, o tratamento se restringe a promover o mínimo de sintomas, o máximo de sobrevida e a melhor qualidade de vida ao paciente sendo a cura altamente improvável (Chi et al., 2015; Steuer et al., 2017; Gill et al., 2018; Tamaki et al., 2018).

A taxa de sobrevida relativa de 5 anos para os cânceres de cavidade oral e de laringe são, respectivamente, 65% e 61%, mas o prognóstico depende em grande parte de quão precocemente o câncer é diagnosticado, do local específico e estadiamento do tumor, além de fatores sociodemográficos e comportamentais como a idade, etnia, nível educacional, tabagismo e etilismo (NCI; Conway et al., 2008; McDonald et al., 2014). Pacientes com tumores iniciais (estágio I) no assoalho oral e língua têm 75% e 85% de chance de cura quando comparados aos pacientes com tumores mais avançados (estágio IV), que apresentam 15% e 26%, respectivamente (INCA). Já para os tumores de laringe localizados, regionais ou a distância as taxas de sobrevida em 5 anos são de 77,5%, 45,6% e 33,5%, respectivamente (NCI).

Os tumores de boca e laringe são caracterizados também pela alta taxa de recidiva e de segundo tumor primário, sendo a recidiva loco regional frequente em até 40% dos pacientes e a metástase a distância em até 30%. Pelo menos 50% dos pacientes com a doença localmente avançada (estágio III ou IV) apresentam a recidiva loco regional ou a distância, normalmente em até dois anos após o tratamento inicial (Argiris et al., 2008). A sobrevida média dos pacientes com recidiva, sem condições cirúrgicas, ou com

metástase a distância, é em média de quatro a cinco meses, sendo semelhante à daqueles pacientes que não receberam qualquer tipo de tratamento (Kowalski; Carvalho, 2000; Amar et al., 2005; Marur; Forastiere, 2008).

2.1.6 Fatores de risco

O consumo excessivo de bebidas alcoólicas e o fumo são os principais fatores de risco associados com o desenvolvimento dos tumores da cavidade oral e laringe. Segundo a Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (SBCCP) a associação dos hábitos de beber e fumar multiplica em até 20 vezes a chance de uma pessoa saudável desenvolver algum tipo de carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço. Estudos epidemiológicos demonstram que pelo menos 65% dos cânceres de cavidade oral são atribuíveis ao álcool e ao fumo e que os tabagistas têm 10 vezes mais chances de desenvolver câncer de laringe, aumentando para 43 se também forem etilistas (INCA). No entanto, 5% dos tumores de laringe ocorrem em não bebedores e não fumantes (Tamaki et al., 2018).

A associação entre o álcool e tabaco é uma questão de saúde pública cada vez maior. Entre 80 e 95% dos alcoólatras fumam, uma proporção três vezes maior do que na população em geral. Estudos epidemiológicos parecem indicar que em torno de 10% a 12% da população mundial, com maior incidência entre os homens, é dependente do álcool e que 2 bilhões de pessoas (1/3 da população mundial adulta) são fumantes (OMS, 2013, 2014). No Brasil, o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD, 2012) concluiu que 11,7 milhões (6% da população) são dependentes e/ou fazem uso abusivo do álcool e 19,4 milhões de brasileiros (17% da população) são fumantes. Nos últimos anos, o consumo abusivo de bebidas alcoólicas tem crescido na população brasileira tanto entre os homens (de 16,1 para 25,3%) como entre as mulheres (de 8,1 para 10,2%). Já o percentual de fumantes em nosso país diminuiu, provavelmente como reflexo das políticas públicas de controle do tabagismo, como a lei antifumo, a restrição à publicidade e a política tributária. O hábito de fumar passou de 20,2 para 12,8% entre os homens e de 13,0 para 8,3% entre as mulheres (Brasil - Ministério da Saúde, 2007, 2016). Embora a frequência do hábito de fumar esteja em declínio na nossa população, a maior fração de câncer, em geral, é atribuível ao fumo. Em um estudo com a população brasileira, a fração atribuível ao tabaco para o câncer de cavidade oral e laringe foi de 95,0% e 80,2%, respectivamente (Azevedo e Silva et al., 2016)

O padrão de consumo alcoólico e de tabaco pode influenciar no risco relacionado ao abuso e a dependência dessas substâncias e, conseqüentemente, na suscetibilidade às doenças como o câncer. Para o álcool, o *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA) estabeleceu como fator de risco o consumo semanal superior a 14 doses para homens e de 7 doses para mulheres. Uma dose contém 14 gramas de álcool puro e a quantidade de álcool corresponde a multiplicação do volume de bebida ingerida por sua concentração. Em relação as neoplasias, muitos estudos prospectivos e de caso-controle mostram um risco 2 a 3 vezes maior de câncer de cavidade oral, laringe, faringe e esôfago em pessoas que consomem 50 g de álcool por dia comparado àquelas que não bebem (Talamini et al., 2002; Boeing, 2002; Corrao et al., 2004; Pöschl; Seitz, 2004; Boffetta et al., 2006; Baan et al., 2007; Bagnardi et al., 2015). Além disso, a qualidade das bebidas alcoólicas pode ter impacto sobre a saúde e mortalidade do consumidor, por exemplo, quando as bebidas artesanais ou as produzidas ilegalmente estão contaminadas com metanol ou chumbo.

Já o tabagismo causa dependência física primeiramente devido a nicotina, a substância psicoativa presente nos derivados do tabaco. Além da dependência física, temos a dependência comportamental que se caracteriza pela rotina associada ao uso do tabaco criada pelo fumante e a dependência psicológica caracterizada pela necessidade de acender um cigarro com o intuito de aliviar tensões tais como angústia, ansiedade, tristeza, medo, estresse, ou até mesmo momentos de depressão (INCA). A avaliação do grau de dependência física pode ser feita através do teste de Fagerström, que consiste em um questionário de seis perguntas com uma pontuação específica para cada resposta. Ao final do teste, soma-se a pontuação das respostas (de zero a dez pontos) e classifica-se o nível de dependência da nicotina, que vai de muito baixo (0 a 2 pontos) a muito elevado (8 a 10 pontos). Em relações as neoplasias de cavidade oral e de laringe, o risco de ocorrência aumenta sobremaneira quanto maior o tempo e a intensidade de consumo em maços-ano (Garcia et al., 2010; Ferreira Antunes et al., 2013; Toporcov et al., 2015; Huang et al., 2017, Kfoury et al., 2018). O consumo em maços-ano possibilita uma estimativa da carga tabágica total e é calculado multiplicando-se o número de maços fumados ao dia (cada maço contém 20 cigarros) pelo número de anos que o indivíduo fumou.

Considerando-se que o álcool e fumo são fatores de risco para os cânceres de cavidade oral e laringe, pacientes com consumo abusivo ou dependente de ambas as drogas deveriam ser mais propensos ao desenvolvimento da doença. Nesse sentido,

polimorfismos genéticos em enzimas de metabolização do álcool, bem como em genes candidatos a dependência do álcool e do tabaco poderiam ser indicativos do risco de doenças relacionadas ao consumo abusivo dessas substâncias, como os cânceres de cavidade oral e de laringe.

2.2 Mecanismo específico da carcinogênese mediada pelo álcool

2.2.1 O acetaldeído como carcinógeno

O etanol ou álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) é uma molécula orgânica pequena (massa molar de $46,07 \text{ g mol}^{-1}$), com absorção menor (20%) e relativamente lenta pelo estômago e absorção maior (80%) e mais rápida pela porção proximal do intestino delgado. Por ser hidrossolúvel acessa rapidamente a corrente sanguínea de onde é distribuído por difusão simples, dependendo da concentração de água, para a maioria dos órgãos e sistemas, incluindo as glândulas salivares e as mucosas do trato gastrointestinal superior. Após absorção, 80 a 90% do etanol é metabolizado por oxidação enzimática majoritariamente no fígado na proporção aproximada de 7g por hora, enquanto 2 a 10% é eliminado de forma inalterada pelos pulmões, rins, suor e saliva (Homann et al., 1997; Crabb et al., 2004).

O álcool é metabolizado a acetaldeído pela ação das enzimas álcool desidrogenase (ADH), citocromo P4502E1 (CYP2E1) e em menor extensão pela catalase (Figura 3). Além do acetaldeído, as reações mediadas pela ADH e CYP2E1 geram, respectivamente, a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e espécies reativas de oxigênio (ROS). A enzima aldeído desidrogenase (ALDH), por sua vez, converte o acetaldeído em acetato, que pode posteriormente ser metabolizado em gás carbônico e água (Seitz; Becker, 2007). A velocidade no metabolismo do etanol e de seu principal metabólito pelas enzimas ADH e ALDH pode ser crítica na determinação de sua toxicidade. No entanto, quando em atividade máxima no fígado essas enzimas contribuem de forma igual no controle da taxa de oxidação do álcool e acetaldeído (Crabb et al., 2004).

Embora o principal órgão para a oxidação do etanol seja o fígado, há muitas evidências de que ocorre oxidação significativa de etanol e produção de acetaldeído localmente na saliva, suco gástrico e no cólon, via ADHs das mucosas e de microorganismos como bactérias e leveduras. No entanto, quando comparada ao fígado,

a capacidade dos microorganismos orais e gastrointestinais, bem como das ALDHs das mucosas para metabolizar o acetaldeído em acetato é bastante limitada (Homann et al., 2001; Figuero Ruiz et al., 2004; Seitz; Becker, 2007). Isso resulta, após a ingestão de bebidas alcoólicas, em concentrações locais notavelmente altas de acetaldeído em todo o trato gastrointestinal (Salaspuro et al., 2006). Homann et al. (1997) detectaram concentrações significativas de acetaldeído (18 a 143µM) na saliva de voluntários saudáveis após a ingestão de uma dose moderada de álcool (0,5 g/kg de peso corporal). Essas mesmas concentrações foram consideravelmente reduzidas (30-50%) após o uso de antisséptico bucal, enfatizando o papel da microflora oral na produção de acetaldeído salivar.

Figura 3 - Metabolismo do etanol e seu papel na carcinogênese. O etanol é oxidado pelas enzimas ADH, CYP2E1 e catalase em acetaldeído, que é então convertido a acetato pela enzima ALDH. A indução da CYP2E1 via etanol, além de produzir o acetaldeído e as espécies reativas de oxigênio (ROS), promove a conversão de pró-carcinógenos ambientais presentes nas bebidas alcoólicas, no tabaco e demais produtos em cancerígenos finais. O metabolismo mediado pelas enzimas ADH e ALDH resulta na síntese da nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e acetaldeído. O NADH é reoxidado em NAD⁺ nas mitocôndrias, o que pode aumentar ainda mais a geração de ROS. Acetaldeído e ROS podem se ligar a macromoléculas (DNA, RNA e proteínas) e formar compostos estáveis conhecidos como adutos. Adaptado de Seitz e Stickel (2007).

Existem fortes evidências de que o etanol puro não age diretamente como carcinógeno em humanos, mas sim como um co-carcinógeno ou um agente promotor de câncer (Pöschl; Seitz, 2004; IARC, 2010; Praud et al., 2016). Os principais mecanismos mediados pelo álcool no desenvolvimento do câncer incluem: ação genotóxica do acetaldeído; aumento da solubilidade e permeabilidade da membrana celular para agentes carcinógenos como os presentes no cigarro; indução da enzima CYP2E1 e estresse oxidativo com transformação de pró-carcinógenos em carcinógenos; alteração no metabolismo do ácido retinóico; distúrbios do sistema imune e do estado nutricional e alterações nas glândulas salivares (Wight; Ogden, 1998; Wang, 2005; Albano, 2006; Seitz; Stickel, 2007; Seitz; Mueller, 2015). Existem ainda muitas dúvidas sobre o quanto cada um desses mecanismos pode contribuir na carcinogênese, uma vez que eles se inter-relacionam. No entanto, a associação entre consumo abusivo e dependente de álcool e o risco de câncer nas vias aerodigestivas superiores parece ser particularmente proeminente em alguns indivíduos que têm uma capacidade geneticamente aumentada de produzir o acetaldeído ou uma capacidade deficiente de eliminá-lo (Salaspuro, 2003; Seitz; Stickel, 2010; Yu et al., 2010).

O acetaldeído é considerado um metabólito altamente tóxico, mutagênico e carcinogênico em animais (Feron et al., 1982; Woutersen et al., 1986) e em humanos (IARC, 1999; Seitz; Stickel, 2010; Heymann et al., 2018). A natureza eletrofílica desse metabólito permite que ele se ligue covalentemente a macromoléculas (proteínas e DNA) e desencadeie eventos promotores da carcinogênese que incluem: formação de adutos de proteína e de DNA, erros nos sistemas de replicação, transcrição e reparo do DNA, quebras cromossômicas e trocas entre cromátides irmãs (Seitz; Stickel, 2010; Yu et al., 2010; Balbo; Brooks, 2015; Heymann et al., 2018). Os adutos de DNA, por exemplo, podem induzir erros de replicação e mutações em proto-oncogenes ou em genes supressores de tumor, enquanto os adutos de proteína podem alterar a estrutura e a função de enzimas importantes envolvidas nos mecanismos antioxidantes e de reparo do DNA (Seitz; Stickel, 2007; Heymann et al., 2018).

Além dos efeitos nocivos ao material genético e as proteínas, a toxicidade do acetaldeído parece também inibir o consumo abusivo e dependente do álcool. Altas concentrações desse metabólito têm sido associadas a reações adversas que incluem vasodilatação periférica, sudorese, rubor facial (*flushing*), náusea, vômito, cefaléia e taquicardia (Setshedi et al., 2010; Li et al., 2011). Em princípio, essas reações desencorajam o consumo do álcool e são muito semelhantes às aquelas experimentadas por

alcoólatras que consomem álcool depois de tomar o medicamento dissulfiram (Edenberg, 2007). O dissulfiram foi a primeira intervenção farmacológica aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da dependência de álcool. Esse medicamento é um inibidor irreversível e inespecífico das enzimas ALDH que decompõem o álcool no estágio de acetaldeído. Ao inibir a ALDH, ocorre acúmulo de acetaldeído no organismo, levando àquelas reações adversas.

Dessa forma, o acetaldeído apresenta um papel dual, ou seja, ao mesmo tempo que altas concentrações desse metabólito aumentam as chances de dano ao material genético, seu acúmulo também parece inibir o consumo abusivo e dependente do álcool tornando os indivíduos menos suscetíveis a ação desse carcinógeno (Seitz; Becker, 2007; Edenberg; McClintick, 2018)

2.2.2 Polimorfismos funcionais nos genes codificadores das enzimas de metabolização do álcool (ADH e CYP2E1) e acetaldeído (ALDH)

O acúmulo de acetaldeído via consumo de álcool é governado, em parte, por fatores genéticos. Polimorfismos funcionais nos genes codificadores das enzimas ADH, CYP2E1 e ALDH alteram a atividade enzimática e influenciam na síntese e no metabolismo do acetaldeído. As principais variantes alélicas associadas com os efeitos genotóxicos desse metabólito são *ADH1B*2*, *ADH1B*3*, *ADH1C*1*, *CYP2E1 c2* e *ALDH2*2* e serão discutidas a seguir.

ADH1B

O gene *ADH1B* (álcool desidrogenase 1B, classe I, polipeptídeo β) apresenta três diferentes alelos para a região codificadora da subunidade β da enzima ADH. O *ADH1B*1*, alelo selvagem, codifica a subunidade $\beta1$ que tem o aminoácido arginina (Arg) nas posições 48 e 370 da proteína. As subunidades polimórficas $\beta2$ e $\beta3$ são codificadas, respectivamente, pelas variantes *ADH1B*2* e *ADH1B*3*. A variante *ADH1B*2* (rs1229984) é caracterizada por uma mutação no éxon 3 na posição G⁸²⁵⁴>A resultando na substituição do aminoácido arginina por histamina (His) na posição 48 da proteína. Já a variante *ADH1B*3* (rs2066702) é identificada por uma troca de nucleotídeo no éxon 9 na posição C¹⁸⁵⁵⁶>T e substituição do aminoácido arginina por cisteína (Cys)

na posição 370 da proteína (Edenberg, 2007). A tabela 2 sintetiza a nomenclatura encontrada na literatura para os três diferentes alelos do gene *ADH1B*.

Tabela 2 - Nomenclatura para os três alelos do gene *ADH1B*

Alelos <i>ADH1B</i>	Sinônimo	Subunidade proteica
<i>ADH1B*1</i> ; <i>ADH1B</i> (Arg48/Arg370)	<i>ADH2*1</i>	β1-ADH, ADH2*1
<i>ADH1B*2</i> ; <i>ADH1B</i> (His48/Arg370)	<i>ADH2*2</i>	β2-ADH, ADH2*2
<i>ADH1B*3</i> ; <i>ADH1B</i> (Arg48/Cys370)	<i>ADH2*3</i>	β3-ADH, ADH2*3

A enzima codificada pelo alelo polimórfico *ADH1B*2* é 40 vezes mais ativa que a enzima expressa pelo alelo selvagem *ADH1B*1* (Setshedi et al., 2010; Wu et al., 2013). Os indivíduos portadores do alelo polimórfico *ADH1B*2* convertem mais eficientemente o etanol em acetaldeído, o que resulta em concentrações mais elevadas desse metabólito na corrente sanguínea (Seitz; Becker, 2007). A toxicidade do acetaldeído idealmente leva a um condicionamento negativo, no qual os indivíduos se abstêm do álcool para evitar os efeitos desagradáveis provocados pelo seu acúmulo (Whitfield, 2002; Seitz; Becker, 2007; Setshedi et al., 2010; Li et al., 2011). Assim, a diminuição da exposição local ao etanol e acetaldeído e, por conseguinte, a atenuação dos principais mecanismos carcinogênicos mediados por essas substâncias parecem diminuir o risco de tumores de cabeça e pescoço em indivíduos com genótipos *ADH1B*1/*2* e *ADH1B*2/*2* (Hashibe et al., 2006, 2008; Marichalar-Mendia et al., 2011; Bediaga et al., 2015).

Em adição, estudos têm demonstrado que o alelo *ADH1B*2* é menos frequente em indivíduos dependentes de álcool do que nos controles, sugerindo também uma proteção contra a doença (Li et al., 2011; Bierut et al., 2012). Em um estudo de metanálise com 2.298 indivíduos dependentes de álcool e 3.334 não dependentes, o alelo *ADH1B*2* foi significativamente associado a um menor risco de dependência (OR = 0,34) e a um menor número de doses consumidas ($p = 3.24 \times 10^{-13}$) em um período de 24 horas (Bierut et al., 2012). Esses resultados são semelhantes à de outros autores que observaram que

indivíduos com o alelo *ADH1B*2* tem um risco 76% menor de serem dependentes quando comparados com indivíduos com genótipo *ADH1B*1/*1* (Li et al., 2011).

O alelo selvagem *ADH1B*1* é frequentemente encontrado nas populações caucasianas e afro-americanas, enquanto o alelo polimórfico *ADH1B*2* é predominante em 70% das populações chinesas, japonesas e coreanas (Edenberg; McClintick, 2018). O alelo polimórfico *ADH1B*3*, também considerado como protetor contra a dependência alcoólica, ocorre em 9-28% da população afro-americana (Edenberg, 2007; Ramchandani, 2013).

ADH1C

O gene *ADH1C* (álcool desidrogenase 1C, classe I, polipeptídeo γ) apresenta dois diferentes alelos para a região codificadora da subunidade gama (γ) da enzima ADH. O alelo *ADH1C*1* (rs698) que codifica a subunidade $\gamma 1$ apresenta o aminoácido arginina (Arg) na posição 272 e aminoácido isoleucina (Ile) na posição 350 da cadeia proteica, enquanto a subunidade $\gamma 2$ codificada pelo alelo *ADH1C*2* (rs1693482) é caracterizada nas posições 272 e 350, respectivamente, pelos aminoácidos glutamina (Gln) e valina (Val) (Hurley; Edenberg, 2012). A tabela 3 sintetiza a nomenclatura encontrada na literatura para os dois diferentes alelos do gene *ADH1C*.

Tabela 3 - Nomenclatura para os dois alelos do gene *ADH1C*

Alelos <i>ADH1C</i>	Sinônimo	Subunidade proteica
<i>ADH1C*1</i> ; <i>ADH1C</i> (Arg272/Ile350)	<i>ADH1C*1</i>	$\gamma 1$ -ADH, ADH1C*1
<i>ADH1C*2</i> ; <i>ADH1C</i> (Gln272/Val350)	<i>ADH1C*2</i>	$\gamma 2$ -ADH, ADH1C*2

A enzima ADH1C*1 apresenta taxa de metabolização 2,5 vezes maior que a enzima ADH1C*2, mas os efeitos fisiológicos associados com o consumo de álcool são modestos em comparação com os da enzima ADH1B*2 (Seitz; Becker, 2007; Celorrio et al., 2012). A conversão mais eficiente do etanol a acetaldeído pela enzima ADH1C*1 é considerada por alguns autores como um fator de proteção ao alcoolismo, enquanto por

outros como fator de risco a cânceres relacionados ao álcool (Olshan et al., 2001). Os riscos de câncer na cavidade oral em consumidores excessivos de álcool (≥ 8 doses diárias) foram 7 e 40 vezes maiores em indivíduos heterozigotos (*ADH1C*1/*2*) e homozigotos (*ADH1C*1/*1*), respectivamente, quando comparados a abstêmios com genótipo *ADH1C*1/*1* (Harty et al., 1997). Indivíduos com genótipo *ADH1C*1* homozigoto e com consumo excessivo de álcool (100g/dia) apresentaram um risco 6 vezes maior de desenvolver câncer de laringe quando comparados a indivíduos homozigotos ou heterozigotos para o alelo *ADH1C*2* e com o mesmo padrão de consumo alcoólico (Coutelle et al., 1997). O alelo *ADH1C*1* e o genótipo *ADH1C*1/*1* foram significativamente mais frequentes em pacientes com cânceres de cabeça e pescoço, esôfago, fígado e mama do que em pacientes com doenças relacionadas ao álcool, mas sem câncer (Homann et al., 2006; Coutelle et al., 2004). Porém, em outros estudos o polimorfismo *ADH1C*1* não foi associado ao risco de câncer de cabeça e pescoço (Brennan et al., 2004), de cavidade oral e faringe (Sturgis et al., 2001), de laringe (Risch et al., 2003) e de esôfago (Wu et al., 2013).

Os polimorfismos *ADH1C*1* e o *ADH1C*2* apresentam frequências similares (52% e 48%) em caucasianos, embora o *ADH1C*1* predomine em 95% das populações asiáticas e africanas (Crabb et al., 2004). Foi observado também que a variante *ADH1C*2* é encontrada em aproximadamente 25% dos caucasianos com ascendência judaica (Ramchandani, 2013).

CYP2E1

O gene *CYP2E1* (Citocromo P450, família 2, subfamília E, polipeptídeo 1) localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q26.3), composto por 9 éxons e 18.754 pares de bases (Jiang et al., 2013) é responsável pela produção da enzima que caracteriza a segunda via de metabolização do álcool. Em humanos e animais, a produção da *CYP2E1* hepática pode ser aumentada de 10-20 vezes após o consumo crônico de etanol (Seitz; Stickel, 2007). A indução da *CYP2E1* via etanol, além de produzir o acetaldeído e as espécies reativas de oxigênio (ROS), promove a conversão de pró-carcinógenos ambientais presentes nas bebidas alcoólicas, no tabaco e demais produtos em cancerígenos finais (Seitz; Wang, 2013; Linhart et al., 2014).

Os polimorfismos rs2031920 (C¹⁰⁵³>T) e o rs3813867 (G¹²⁹³>C) reconhecidos, respectivamente, pelas enzimas de restrição *RsaI* e *PstI*, determinam o mesmo alelo

*CYP2E1*5B* ou *c2* (Celorrio et al., 2012). Este alelo está associado com uma maior atividade de transcrição, níveis de proteína e atividade enzimática em relação ao alelo selvagem *c1* (Hayashi et al., 1991).

A associação desse polimorfismo com a dependência alcoólica e com diferentes neoplasias tem proporcionado resultados conflitantes. Alguns estudos relataram o alelo polimórfico *c2* como um fator de risco para o alcoolismo (Hayashi et al., 1991; Sun et al., 2002; Konishi et al., 2003), enquanto outros não obtiveram essa associação (Pastorelli et al., 2001; Vidal et al., 2004, Cichoz-Lach et al., 2010). A presença da variante alélica *c2* também tem sido relacionada tanto a uma redução quanto a um aumento no risco de cânceres do trato aerodigestivo superior em diferentes populações (Bouchardy et al., 2000; Gattás et al., 2006; Olivieri et al., 2009; Ruwali et al., 2009; Zhuo et al., 2016; Zhang et al., 2018). Entretanto, outros estudos não encontraram associação significativa entre esses tumores e o polimorfismo (Boccia et al., 2008; Buch et al., 2008; IARC, 2012).

Em geral, o alelo *c2* é menos frequente que o alelo *c1*, sendo mais comum entre asiáticos (20-25%) que em caucasianos (<10%) (Iwahashi et al., 1995; Hildesheim et al., 1997). No Brasil, a variante alélica *c2* é rara, sendo mais frequente em indivíduos de pele branca do que em indivíduos de pele não branca (Gattás; Soares-Vieira, 2000; Nishimoto et al., 2000; Burim et al., 2004; Rossini et al., 2006).

ALDH2

A enzima homotetramérica ALDH2 (aldeído desidrogenase família 2) é codificada por dois alelos principais, *ALDH2*1* e *ALDH2*2*, sendo que o alelo selvagem, o *ALDH2*1*, codifica a forma ativa da enzima. A enzima não funcional, *ALDH2*2*, é caracterizada pela substituição do nucleotídeo na posição G⁴²⁴²¹>A (rs671) e pela transição do aminoácido glutamato (Glu) para lisina (Lys) na posição 504 da cadeia polipeptídica (Edenberg, 2007). Os homozigotos para o alelo polimórfico *ALDH2*2* são incapazes de metabolizar o acetaldeído, enquanto os heterozigotos têm uma atividade extremamente baixa para a enzima (Figura 4). Essas pessoas acumulam acetaldeído e, conseqüentemente, apresentam baixa tolerância ao álcool e menor risco de estabelecer a dependência alcoólica (Seitz; Stickel, 2007; Edenberg, 2007). As concentrações plasmáticas deste metabólito, após o consumo de álcool por homozigotos e heterozigotos para a *ALDH2*2* foram, respectivamente, 19 e 6 vezes maiores em comparação com a concentração dos homozigotos *ALDH2*1* (Mizoi et al., 1994; Wu et al., 2013).

Figura 4 - Representação esquemática da enzima aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) codificada pelos genótipos homozigoto selvagem (*ALDH2*1/*1*), heterozigoto (*ALDH2*1/*2*) e homozigoto mutado (*ALDH2*2/*2*). A subunidade ALDH2 ativa é derivada do alelo *ALDH2*1*, enquanto a subunidade inativa ALDH2 é derivada do alelo *ALDH2*2* (adaptado de Yu et al., 2010).

Estudos epidemiológicos também têm demonstrado que o risco de câncer associado ao trato aerodigestivo superior é significativamente elevado em pessoas com baixa atividade para a enzima ALDH2, com risco relativo de 11 vezes para cânceres de orofaringe e de laringe e de 12,5 vezes para câncer de esôfago (Yokoyama et al., 1998; Yokoyama; Omori, 2005; Seitz et al., 2004; Hashibe et al., 2006; Wu et al., 2013). Além disso, essas pessoas têm um risco 50 vezes maior do que as pessoas sem o alelo *ALDH2*2* de desenvolver, simultaneamente, um segundo tumor em outro local do esôfago (Seitz; Becker, 2007). Esses resultados parecem ser consistentes com o efeito funcional da variante alélica *ALDH2*2* que reduz a eliminação do acetaldeído tóxico, proporcionando uma maior frequência na formação de adutos de acetaldeído e de quebras cromossômicas (Seitz; Stickel, 2007). Matsuda et al. (2006) observaram que os níveis de adutos de DNA derivados do acetaldeído foram significativamente maiores em pacientes alcoólatras heterozigotos para *ALDH2*2* em comparação com os pacientes homozigotos *ALDH2*1*. Além disso, os micronúcleos (Ishikawa et al., 2003) e as trocas entre cromátides irmãs (Morimoto; Takeshita, 1996) foram significativamente mais frequentes nos linfócitos de consumidores habituais de álcool com o alelo polimórfico *ALDH2*2* do que em linfócitos de consumidores com a ALDH2 totalmente ativa.

O alelo *ALDH2*2* é frequente em 40% nas populações chinesas, japonesas e coreanas, mas é raro em caucasianos, negros e ameríndios (Yu et al., 2010).

2.3 Sistema de reforço e recompensa e a dependência do álcool e tabaco

O reforço ou recompensa refere-se aos processos fisiológicos pelos quais um dado comportamento, como o consumo de droga, torna-se habitual. O sistema dopaminérgico possui três tratos de grande interesse para o entendimento da neurobiologia da dependência química, sendo o trato mesolímbico-mesocortical que reúne a Área Tegmental Ventral (ATV), o núcleo accumbens (NAc) e o Córtex Pré-Frontal, a principal via relacionada à recompensa. As drogas de abuso, direta (cocaína e anfetamina) ou indiretamente (álcool, nicotina e opiáceos), atuam no circuito de recompensa estimulando os neurônios dopaminérgicos e aumentando a produção, liberação ou inibição da recaptação da dopamina, que parece ser o principal neurotransmissor da via de recompensa (Silva et al., 2010).

A nicotina, potente alcaloide presente nas folhas do tabaco e que leva a sua dependência, estimula o sistema de recompensa de maneira indireta. Ela é capaz de se ligar aos receptores nicotínicos (sistema colinérgico) e estimular a liberação do neurotransmissor glutamato, que por sua vez, estimula a liberação da dopamina no sistema de recompensa. Outra ação da nicotina está na inibição do sistema GABA, que ao contrário do glutamato (excitatório), é capaz de inibir todos os outros sistemas do cérebro, inclusive o da recompensa. Estando o sistema GABA bloqueado pela nicotina, a sensação de bem-estar e euforia proporcionada pelo consumo de cigarros torna-se ainda mais intensa, duradoura e causadora da dependência.

O álcool por sua ação nos sistemas glutamato (excitatório), GABA (inibitório), opióide (prazer e analgesia) e da serotonina (humor e controle dos impulsos) parece interferir indiretamente no sistema de recompensa. Ao inibir o sistema glutamato e estimular o GABA, produz uma sensação de relaxamento, modulada pelo sistema de recompensa. Sua ação sobre a serotonina também produz uma sensação de euforia e de bem-estar, preditivos que levam os indivíduos a desejarem novas experiências com a substância (Standaert; Galanter, 2009).

2.3.1 Polimorfismos dos genes *OPRM1*, *DRD2*, *SLC6A4*, *CHRNA3* e *CHRNA5*

OPRM1

O sistema opióide endógeno desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da dependência do álcool e de outras drogas (Dackis; O'brien, 2005). O consumo de álcool

aumenta a atividade opióide ao promover a liberação dos peptídeos endógenos, principalmente β -endorfinas, na fenda sináptica. Os neurônios gabaérgicos, inibidores dos neurônios dopaminérgicos, podem ser inibidos por encefalinas endógenas, que se ligam principalmente a receptores μ -opióides e estimulam a liberação da dopamina na área tegumentar ventral e núcleo accumbens (Mague; Blendy, 2010; Miranda et al., 2010; Setiawan et al., 2012). A liberação aguda de dopamina está envolvida nos efeitos compensatórios e de reforço do álcool, da nicotina e de outras substâncias que causam dependência (Dackis; O'brien, 2005).

O gene receptor μ -opióide 1 (*OPRM1*), localizado no braço longo do cromossomo 6 (q24-25) tem recebido especial atenção como um dos genes candidatos para o risco ao alcoolismo e tabagismo (Miranda et al., 2010; Mague; Blendy, 2010). Importantes polimorfismos de base única (SNPs) foram identificados neste gene, em particular, o A¹¹⁸>G (rs1799971) que resulta na transição do aminoácido asparagina (Asn) para o ácido aspártico (Asp) na posição 40 da cadeia proteica. Esse SNP está localizado na região codificadora do sítio de glicosilação do receptor e por consequência trata-se de uma mutação funcional (Setiawan et al., 2012). De acordo com Bond et al. (1998), o receptor contendo o resíduo polimórfico Asp (denominado de alelo G) tem três vezes mais afinidade pela β -endorfina que o receptor contendo o resíduo Asn (denominado de alelo A). Esses achados, entretanto, não foram replicados por estudos posteriores (Befort et al., 2001; Beyer et al., 2004). Ramchandani et al. (2011) também não constataram diferenças na ligação da β -endorfina ao alelo G em comparação ao alelo A. Por outro lado, Zhang et al. (2005) observaram uma redução funcional do receptor μ -opióide em indivíduos portadores do alelo G, caracterizada pela diminuição da expressão tanto do RNA mensageiro como da proteína.

Estudos prévios de associação entre o SNP A¹¹⁸>G, o alcoolismo e tabagismo têm produzido resultados conflitantes. Bart et al. (2005) constataram que adultos portadores do alelo G apresentaram maior prevalência de dependência alcoólica (23,1%) do que os controles não alcoólicos (13,5%) e que o risco atribuível ao genótipo foi de 11,1%, enquanto Du e Wan (2009) relataram como fator de risco ao alcoolismo a presença do genótipo AA. Esse polimorfismo tem sido associado tanto como fator de risco ao alcoolismo (Bart et al., 2005; Miranda et al., 2010) e tabagismo (Vink et al., 2004; Sullivan et al., 2004) bem como um fator de proteção (Town et al., 1999; Du; Wan, 2009). Outros estudos, porém, não relataram qualquer contribuição significativa do alelo G na dependência alcoólica e da nicotina (Bergen et al., 1997; Kim et al., 2004; Loh et al.,

2004; Zhang H et al., 2006; Zhang L et al., 2006). O alelo G é comum em caucasianos (15-30%) e asiáticos (40-50%), com menor prevalência em afro-americanos e hispânicos (1-3%) (Mague; Blendy, 2010). No Brasil, a frequência desse alelo foi explorada em apenas um estudo, tendo sido descrita em 16% de uma amostra populacional de 200 indivíduos, onde somente 10 indivíduos (5%) eram homozigotos para o alelo G (Daher et al., 2013).

Outro polimorfismo do gene *OPRM1* é o SNP C¹⁷>T (rs1799972) que corresponde a substituição do aminoácido alanina (Ala) pelo aminoácido valina (Val) no domínio extracelular do receptor (Knapman; Connor, 2015). Crystal et al. (2012) relataram uma associação entre o genótipo homozigoto mutado (TT) e o risco de uso de álcool, cocaína e tabaco em mulheres afro-americanas. Outros estudos demonstraram uma maior frequência, embora não significativa, do alelo polimórfico T em indivíduos com abuso de substâncias (Berrettini et al., 1997; Rommelspacher et al., 2001; Compton et al., 2003; Crowley et al., 2003). O alelo T é mais frequente entre os afro-americanos e as populações do norte da Índia (20%) do que nas populações caucasianas e do leste asiático (<1%) (Knapman; Connor, 2015).

DRD2

Outro gene estudado está envolvido com as funções da dopamina que são mediadas por dois grupos de receptores, os da família D1 (DRD1 e DRD5) e os da família D2 (DRD2, DRD3 e DRD4). Polimorfismos no gene que codifica o receptor de dopamina 2 (*DRD2*) têm sido relacionados ao alcoolismo e tabagismo (Suraj Singh et al., 2013), em especial, o SNP *TaqIA* (rs1800497, C³²⁸⁰⁶>T) que resulta na transição do aminoácido glutamato (Glu) para o aminoácido lisina (Lys) na posição 713 da cadeia proteica (Wang F et al., 2013). O alelo selvagem é designado por A2 (citosina) e polimórfico por A1 (timina).

O alelo A1 pode influenciar a atividade ou a regulação do sistema dopaminérgico, uma vez que a presença desse alelo tem sido associada a menor expressão do receptor e por consequência a diminuição da ligação com a dopamina (Wang F et al., 2013). O consumo abusivo de álcool e tabaco aumenta a liberação e neurotransmissão de dopamina no cérebro, sugerindo que os indivíduos portadores do alelo A1 apresentam um excesso de dopamina intracelular após os estímulos provocados por essas substâncias (Bowirrat; Oscar-Berman, 2005). Portanto, as pessoas que possuem o alelo A1 parecem tornar-se

mais suscetíveis à dependência do álcool e do tabaco (Prasad et al., 2010). Indivíduos com a presença do alelo polimórfico *AI* foram quase duas vezes mais propensos a dependência de nicotina quando comparado aos indivíduos homozigotos selvagens (Voisey et al., 2012). Blum et al. (1990) foram os primeiros a investigar e constatar uma associação positiva entre o polimorfismo *AI* e o alcoolismo. No Brasil, Bau et al. (2000) também identificaram uma maior prevalência do alelo *AI* em indivíduos com dependência alcoólica em relação aos controles. Resultados semelhantes (Noble, 2000; Wang F et al., 2013, Suraj Singh et al., 2013) e também contraditórios (Buckland, 2001; Ball, 2004; Vasconcelos et al., 2015) foram relatados por estudos subsequentes.

O alelo *AI* é frequente em 19% dos europeus, 38% dos asiáticos e 28% dos afro-americanos (Wang F et al., 2013). No Brasil, a variante alélica foi descrita em 24% de uma amostra populacional de 229 indivíduos, sendo que 4,8% eram homozigotos para o alelo *AI* (Bau et al., 2000).

SLC6A4* ou *5-HTT

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é outro neurotransmissor importante para o sistema nervoso central e periférico e está implicada no consumo de álcool e fumo, no controle do humor, do sono, do apetite e de uma variedade de características pessoais e comportamentais (Ducci; Goldman, 2012). Estudos genéticos têm evidenciado uma associação entre o gene transportador de serotonina (*SLC6A4/5-HTT*) e a dependência de álcool e tabaco (van der Zwaluw et al., 2010; Mingione et al., 2012). A ação da 5-HT é controlada pelo seu transportador 5-HTT, que age regulando a magnitude e a duração da neurotransmissão serotoninérgica, fundamentalmente pela recaptação da 5-HT nas fendas sinápticas (van der Zwaluw et al., 2010).

O polimorfismo *5-HTTLPR* caracterizado pela inserção/deleção de 44pb na região promotora do gene transportador de 5-HT apresenta-se sobre duas formas alélicas: uma longa (*L*) de 528pb e uma curta (*S*) de 484pb. A variante *S* está associada a reduções na expressão do transportador 5-HTT e na eficiência de recaptação da serotonina na fenda sináptica, enquanto a variante *L* está relacionada a uma transcrição 2 a 3 vezes mais eficiente do gene *5-HTT* (Lesch et al., 1996; van der Zwaluw et al., 2010). Em uma meta-análise envolvendo 3.489 indivíduos dependentes de álcool e 2.325 controles, Feinn et al. (2005) demonstraram que os indivíduos portadores do alelo *S* têm um risco acrescido de 18% para o diagnóstico de dependência alcoólica. Para os casos em que os dependentes

são homozigotos para o alelo *S* o risco aumenta para 39%. Outros estudos têm correlacionado a presença do alelo *S* com um maior consumo de bebidas alcoólicas (Thompson et al., 2000; Matsushita et al., 2001; Herman et al., 2003; van der Zwaluw et al., 2010), enquanto outros não encontraram essa associação (Hopfer et al., 2005; Gacek et al., 2008). Em uma amostra brasileira, Abdo et al. (2012) não associaram o polimorfismo com o desenvolvimento de carcinoma oral e com o hábito de fumar e/ou beber.

O alelo *S* é frequente em 40% dos europeus, 27% dos afro-americanos e em 78% dos chineses (Kranzler et al., 2002; Chu et al., 2009). No Brasil, em um estudo caso-controle de pacientes afetados por transtorno bipolar e esquizofrenia a frequência genotípica *SS* foi descrita em 16% dos controles de uma amostra populacional de 184 indivíduos (Mendes de Oliveira et al., 1998).

CHRNA3* e *CHRNA5

Os fumantes são expostos continuamente a mais de 4 mil substâncias tóxicas, dentre elas a nicotina, principal responsável pela tolerância e dependência do tabaco. Um cigarro apresenta 800 mg de tabaco, dos quais 9 a 17 mg são de nicotina (NIDA). A ação da nicotina, que é absorvida pelos tecidos e chega rapidamente ao cérebro, se faz por meio de receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR) que modulam a liberação de uma série de neurotransmissores e neuroreguladores, como a dopamina, acetilcolina, serotonina, β -endorfina, GABA, glutamato, epinefrina e norepinefrina. O mais importante, e mais estudado é a dopamina, pois há uma grande liberação desse neurotransmissor no núcleo accumbens produzindo uma forte sensação de prazer e euforia, fazendo com que o indivíduo continue fumando (Picciotto et al., 2000; Wen et al., 2016). Polimorfismos funcionais nos genes que codificam as subunidades α e β dos nAChR são fortes candidatos ao risco de dependência da nicotina e, conseqüentemente, de neoplasias relacionadas ao fumo.

Os genes *CHRNA5/CHRNA3/CHRNA4* são responsáveis pela codificação de três das doze subunidades dos nAChR e parecem estar envolvidos em diferentes comportamentos associados ao consumo de tabaco como início do uso, quantidade, persistência e dependência da nicotina além de doenças relacionadas ao tabagismo como as neoplasias de pulmão e de cabeça e pescoço (Munafò et al., 2012; Stephens et al., 2013; Anantharaman et al., 2014; Lee et al., 2018).

Importantes polimorfismos foram identificados neste *cluster* gênico, em particular, o SNP *CHRNA5* (rs16969968) caracterizado pela substituição G¹¹⁹²>A (Asp398Asn) e codificação de uma proteína (subunidade $\alpha 5$) com menor afinidade pela nicotina (Bierut et al., 2008; Stephens et al., 2013). A presença do alelo polimórfico A (Asn) tem sido relacionada ao uso precoce, a sensação prazerosa e maior consumo do tabaco e também um risco maior de câncer da cavidade oral e laringe (Lips et al., 2010; Chen et al., 2011; Fowler; Kenny, 2014). A frequência dessa variante alélica é maior em descendentes europeus (37%) quando comparado com afro-americanos (10%) e parece estar ausente nos africanos, sendo o risco maior de dependência nos indivíduos homozigotos (Bierut et al., 2008; Doyle et al., 2014).

O outro polimorfismo *CHRNA3* (rs578776), caracterizado pela transição C⁵⁴⁶>T na posição 3'UTR do gene tem sido associado de forma contraditória com a dependência, o padrão de consumo do tabaco e o risco de neoplasias (Stevens et al., 2008; Anantharaman et al., 2014). De acordo com Stephens et al. (2013), o alelo polimórfico T está associado ao início tardio do tabagismo, resultando em uma diminuição do risco de dependência na vida adulta. A variante alélica T também foi significativamente associada a um risco 16% menor de câncer oral (Anantharaman et al., 2014).

3 OBJETIVOS

A presente investigação teve como objetivo avaliar a contribuição de 11 polimorfismos genéticos associados com a metabolização do álcool e dependência do álcool e tabaco no risco de câncer de cavidade oral e laringe pela comparação dos mesmos com um grupo de pacientes sem diagnóstico de neoplasias. Assim, os objetivos específicos foram:

1. Avaliar a contribuição de cinco polimorfismos genéticos que codificam enzimas de metabolização do álcool, quais sejam: *ADH1B**2 (rs 1229984), *ADH1B**3 (rs 2066702), *ADH1C**1 (rs698), *ADH1C**2 (rs 1693482) e *CYP2E1* c2 (rs 3813867).

2. Avaliar a contribuição de quatro polimorfismos genéticos associados com a dependência do álcool e tabaco, quais sejam: *OPRM1* Asn40Asp (rs 1799971), *OPRM1* Ala6Val (rs 1799972), *DRD2* Glu713Lys (rs 1800497) e *SLC6A4* (indel/44pb).

3. Avaliar a contribuição de dois polimorfismos genéticos associados exclusivamente com a dependência do tabaco, quais sejam: *CHRNA5* Asp398Asn (rs 16969968) e *CHRNA3* (rs 578776).

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

O presente estudo caso-controle de base hospitalar está vinculado ao Projeto de Pesquisa Regular FAPESP (Processo: 2014/16092-4) intitulado “Os Polimorfismos Genéticos podem contribuir na prevenção e tratamento do câncer de cabeça e pescoço?”, sob coordenação da Profa. Dra. Gilka Jorge Figaro Gattás. Um total de 1.067 indivíduos (619 casos e 448 controles) foi selecionado para o estudo entre outubro de 2000 e julho de 2011. Todos os participantes pertenciam a diferentes clínicas do Hospital Heliópolis, São Paulo-SP.

Os exames clínicos e anatomopatológicos foram realizados no Hospital Heliópolis sob supervisão do Dr. Otávio Alberto Curioni e as análises dos polimorfismos genéticos no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP, sob coordenação da Profa. Dra. Gilka Jorge Figaro Gattás.

A presente pesquisa foi desenvolvida como parte dos requisitos de Defesa de Doutorado do Departamento de Patologia, área de concentração Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP.

4.1.1 Seleção dos casos

Foram considerados casos elegíveis 384 pacientes maiores de 18 anos de idade, moradores na região metropolitana da cidade de São Paulo e com diagnóstico histopatológico confirmado de carcinoma de células escamosas (CEC) da cavidade oral ou laringe admitidos no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis - São Paulo, no período de 2000 a 2011. Parte dos casos recrutados (62%) são também pacientes voluntários das pesquisas realizadas pelo consórcio GENCAPO (Genoma do Câncer de Cabeça e Pescoço), financiado pela FAPESP (Processo: 02/01520-3).

O grupo com câncer de cavidade oral compreendeu 235 pacientes, dos quais 204 eram do sexo masculino (86,8%) e 31 do sexo feminino (13,2%), com idades entre 24 e 85 anos e média (desvio padrão) igual a 55,1 (10,3). Já o grupo com câncer de laringe foi

composto de 149 pacientes, sendo 133 homens (89,3%) e 16 mulheres (10,7%), com idades entre 31 e 76 anos e média (desvio padrão) igual a 58 (9,2).

4.1.2 Seleção dos controles

O grupo controle foi composto de 448 indivíduos sem história de câncer (377 homens e 71 mulheres), pareados aos casos dentro de uma mesma faixa etária (± 5 anos) e admitidos nas diferentes clínicas do mesmo hospital e no mesmo período dos casos avaliados. Quanto à clínica a que pertenciam, 21,07% dos indivíduos estavam internados na enfermaria de cirurgia geral, 20,21% na cirurgia vascular, 11,82% na neurocirurgia, 6,45% na neurologia e 40,45% em outras enfermarias (clínica médica, gastroenterologia, ortopedia, endocrinologia, dermatologia e emergência).

4.2 Questionário

Todos os pacientes com câncer e todos os indivíduos controles responderam individualmente a um questionário padronizado com dados demográficos (nome, idade, sexo, endereço, profissão, etnia e outros), dados pessoais e familiares (parentesco, história familiar e pessoal de doenças, tratamentos prévios e outros), hábitos de beber e fumar e dados sobre o padrão de consumo (Anexo A).

Os casos foram seguidos prospectivamente segundo as diretrizes do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis. No prontuário dos pacientes foram obtidos os dados clínicos e anatomopatológicos (estado clínico geral, sítio da lesão, estadiamento da doença, características do tratamento empregado, recorrência da doença, presença de segundo tumor primário e informações sobre o óbito). Os indivíduos foram classificados segundo o estadiamento do tumor de acordo com o critério da AJCC/UICC - Classificação de Tumores Malignos (7ª Edição - 2010), que considera o tamanho do tumor, linfonodos comprometidos e a presença de metástase a distância.

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa das respectivas instituições envolvidas, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado pelos participantes (Anexos B e C).

4.3 Hábitos de beber e fumar e os padrões de consumo do álcool e do tabaco

Os hábitos de beber e fumar foram classificados no momento da entrevista em três categorias. Os indivíduos que em tempo algum beberam e/ou fumaram foram classificados como nunca beberam e/ou nunca fumaram. Já os indivíduos que pararam de beber e/ou fumar pelo menos 12 meses antes da entrevista foram classificados como ex-bebedores e/ou ex-fumantes, e aqueles que ainda bebiam e/ou fumavam foram classificados como bebedores atuais e/ou fumantes atuais. Após a classificação, dados sobre o consumo (idade de início, tempo de uso e de abstinência, tipo de substância utilizada e quantidades) foram obtidos daqueles que declararam ser ou ter sido bebedores e/ou fumantes. Sempre que possível, esses dados foram confirmados por meio de documentação em seus registros médicos.

O padrão de consumo do álcool foi calculado em gramas de etanol ingerida por dia (g/dia), considerando o teor alcoólico de 5% para a cerveja, 12% para o vinho, 30% para os licores e 41% para as bebidas destiladas. Os indivíduos com consumo de 1 a 12,5 g/dia foram considerados consumidores leves, os com ingestão de 12,6 a 49,9 g/dia como consumidores moderados e aqueles com consumo diário de álcool igual ou superior a 50g foram classificados como consumidores pesados (Rezende et al., 2019). Para o tabaco o padrão de consumo foi expresso em maços/ano, que é calculado multiplicando-se o número de maços fumados ao dia (cada maço contém 20 cigarros) pelo número de anos que o indivíduo fumou. Em seguida, o consumo do tabaco foi categorizado em até 20 maços/ano, de 21 a 40 maços/ano e mais que 40 maços/ano (Marchioni et al. 2011).

4.4 Coleta do sangue periférico e obtenção do DNA genômico

As amostras de sangue periférico (5 mL) dos pacientes e dos controles foram coletadas durante as consultas de acompanhamento ambulatorial, após a assinatura do TCLE. O material foi coletado em tubo contendo o anticoagulante EDTA, foi processado por centrifugação refrigerada para obtenção do *pellet* leucocitário e armazenado a -20°C para posterior extração de DNA.

A extração do DNA genômico foi realizada pelo processo de *Salting-out*, de acordo com o protocolo de Miller et al. (1988). Para padronização e avaliação da concentração e pureza do DNA disponível para o estudo, uma alíquota das 832 amostras foi submetida à leitura em espectrofotômetro (*NanoDrop 2000, Thermo Scientific*), no

comprimento de onda de 260nm (A260nm) e 280nm (A280nm - Sambrook et al., 1989). A amostra de DNA foi considerada com pureza aceitável quando a razão A260nm/A280nm foi entre 1,8 e 2,0. Após esse procedimento, uma fração de todas as amostras de DNA selecionadas foi diluída a uma concentração padrão de 20ng/μL, identificada e transferida para freezer a -80°C para posterior análise dos polimorfismos genéticos.

4.5 Pesquisa dos polimorfismos genéticos

Os polimorfismos genéticos analisados nesse estudo foram selecionados após uma busca criteriosa na literatura. Foram escolhidas variantes já validadas e bem documentadas, com descrição de potencial alteração funcional em genes relacionados com a metabolização do álcool e com o consumo abusivo e dependente de bebidas alcoólicas e do tabaco, além de dados de associação prévia com o câncer de cavidade oral e de laringe ou com outros tipos de neoplasias correlacionadas a esses fatores de risco.

Os polimorfismos *ADH1B**2 (rs 1229984), *ADH1B**3 (rs 2066702), *ADH1C**1 (rs698), *ADH1C**2 (rs 1693482), *CYP2E1* c2 (rs 3813867), *OPRM1* Asn40Asp (rs 1799971), *OPRM1* Ala6Val (rs 1799972), *DRD2* Glu713Lys (rs 1800497), *CHRNA5* Asp398Asn (rs 16969968) e *CHRNA3* (rs 578776) foram analisados pela técnica da PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR), com sondas marcadas com corantes fluorescentes (sistema *TaqMan*® - sondas VIC/FAM) na plataforma de instrumentação *StepOnePlus*™ (*Applied Biosystems*). Foram utilizados ensaios comercialmente disponíveis e validados para os polimorfismos investigados (Tabela 4).

Para cada reação foi utilizado 5,0μL de *TaqMan Universal Master Mix* (*Life Technologies, EUA*), 0,5μL de ensaio contendo as sondas e *primers* (concentração 20X) ou 0,25μL (concentração 40X), 1μL de DNA e água para um volume final de 10μL. A reação foi então submetida ao protocolo de ciclos, seguindo as orientações do fabricante, descrito a seguir: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, seguido de uma extensão final de 3 minutos a 60°C. Em todos os casos foram incluídos controles positivos para os genótipos e negativos para garantir a ausência de contaminação das reações

Essa metodologia tem como princípio a ação exonuclease da *Taq DNA polimerase*, contendo *primers* que flanqueiam a região estudada e uma sonda para cada alelo, sendo uma marcada com um fluorocromo VIC e a outra marcada com um

fluorocromo FAM. As sondas possuem um reporter fluorescente 5' e um *quencher* 3', que absorve a fluorescência emitida pelo reporter. Após a desnaturação, as sondas e os *primers* anelam-se aos seus alvos. Durante o passo de polimerização, a *Taq DNA polimerase* cliva e separa fisicamente a sonda reporter do quencher, resultando na liberação do sinal fluorescente que é detectado pelo equipamento. Dessa forma, os resultados são avaliados quanto a presença ou ausência da amplificação de cada alelo e são plotados em um gráfico que os classifica em *clusters* dos diferentes genótipos.

Já a análise do polimorfismo *5-HTTLPR* representado pela inserção/deleção de 44pb no gene *SLC6A4* foi realizada de acordo com o protocolo de van der Zwaluw et al. (2010). Para a amplificação do fragmento de interesse foram utilizados os *primers*: 5' - GGC GTT GCC GCT CTG AAT GC - 3' e 5' - GAG GGA CTG AGC TGG ACA ACC AC - 3'. A reação de amplificação incluiu: 2 minutos a 92°C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 57,5°C e 1 minuto a 72°C, sendo finalizada a 72°C por 5 minutos. O produto de PCR foi identificado em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo e visualizado em luz UV. A variante longa (*L* - inserção de 44pb) e a variante curta (*S* - deleção de 44pb) foram identificadas, respectivamente, por um fragmento de 528pb e 484pb.

Tabela 4 - Relação dos polimorfismos genéticos analisados pela tecnologia da PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR), incluindo a transição nucleotídica e de aminoácidos e as sequências contexto dos ensaios TaqMan®

POLIMORFISMOS GENÉTICOS	TRANSIÇÃO	SEQUÊNCIA CONTEXTO [VIC/FAM]	ENSAIO TAQMAN®
<i>ADH1B</i> *2	G→A Arg48His	GCCACTAACCACGTGGTCATCTGTG[C/T]GACAGATTCCTACAGCCACCATCTA	C___2688467_20
<i>ADH1B</i> *3	C→T Arg370Cys	TTGCCTCAAAACGTCAGGACGGTAC[A/G]GATACTGCAATAGGAAAGAAGAGAC	C__11941896_20
<i>ADH1C</i> *1	A→G Ile350Val	TCATTTATTTTTTCAAAAGGTAAAA[C/T]ATTGTATTATAATGCATCCAGTGAA	C__26457410_10
<i>ADH1C</i> *2	G→A Arg272Gln	CACGGATCATACCATGGTGTCAAGC[C/T]GACCGATGACTTCAAACGAAAAATC	C__2688502_10
<i>CYP2E1</i> c2	G→C	AACGCCCCCTTCTTGGTTCAGGAGAG[G/C]TGCAGTGTTAGGTGCAGCACAAACCA	C___2431875_10
<i>OPRM1</i>	A→G Asn40Asp	GGTCAACTTGTCCTCACTTAGATGGC[A/G]ACCTGTCCGACCCATGCGGTCCGAA	C___8950074_1_
<i>OPRM1</i>	C→T Ala6Val	GTCAGTACCATGGACAGCAGCGCTG[C/T]CCCCACGAACGCCAGCAATTGCACT	C___8950075_20
<i>DRD2</i>	C→T Glu713Lys	CACAGCCATCCTCAAAGTGCTGGTC[A/G]AGGCAGGCGCCCAGCTGGACGTCCA	C___7486676_10
<i>CHRNA5</i>	G→A Asp398Asn	TAGAAACACATTGGAAGCTGCGCTC[A/G]ATTCTATTGCTACATTACAAGACA	C__26000428_20
<i>CHRNA3</i>	C→T	TGAATAACTAGGCATGATTTCTCAT[A/G]GTATAATTTAGAAGTATGCAAGAGA	C_____721253_10

4.6 Análises estatísticas

4.6.1 Verificação do tamanho amostral

Para o cálculo amostral no estudo caso-controle, foi utilizado um software disponibilizado pelo Laboratório de Epidemiologia e Estatística (Lee) criado junto a Faculdade de Medicina da USP (<http://www.lee.dante.br>). Entre os polimorfismos avaliados no presente estudo, o alelo polimórfico *CYP2E1* c2 (rs3813867) é o que apresenta a menor frequência (6%) na população brasileira. O tamanho amostral foi calculado considerando essa frequência, número de dois controles por caso, nível de significância de 5% e poder do teste de 80%. O número final da amostra de casos (n=131) e de controles (n=262) estimado foi menor do que o utilizado na nossa casuística e, portanto, adequado para as análises estatísticas do estudo.

4.6.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências alélicas e genotípicas foram calculadas por contagem de alelos e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi avaliado por meio do teste de qui-quadrado (χ^2), comparando se as frequências genotípicas/alélicas observadas diferiram dos valores esperados de acordo com o EHW. O EHW foi testado na amostra controle, considerando-se como significantes valores de $p < 0,05$.

4.6.3 Modelos genéticos avaliados

As análises foram realizadas tendo como base dois modelos genéticos descritos na literatura para estudos de associação, a saber: (1) Modelo de Genótipos, no qual comparamos entre os grupos estudados as frequências dos homozigotos selvagens, heterozigotos e homozigotos mutados e (2) Modelo Dominante, no qual comparamos as frequências dos homozigotos selvagens e dos heterozigotos + homozigotos mutados entre os grupos estudados. Este último permite avaliar se o alelo polimórfico possui efeito dominante e se somente uma cópia é suficiente para a manifestação do fenótipo avaliado (Lewis; Knight, 2012).

4.6.4 Associações dos polimorfismos genéticos com o câncer de cavidade oral e de laringe

As análises foram realizadas no programa SPSS - *Statistical Package for Social Sciences* (v18.0). O teste de χ^2 foi utilizado para verificar se houve diferença na distribuição das frequências genotípicas/alélicas entre casos e controles. Para calcular o risco dos polimorfismos que foram associados nas análises univariadas, foram estimados valores de *Odds ratio* (OR, razão de chances) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) utilizando a regressão logística multivariada, ajustada para as variáveis sociodemográficas (sexo, idade, cor da pele e escolaridade) e os hábitos de beber e fumar (nunca beberam e/ou nunca fumaram, ex-bebedores e/ou ex-fumantes e bebedores atuais e/ou fumantes atuais). O genótipo homozigoto selvagem foi considerado como referência nas análises utilizando os Modelos de Genótipos e Dominante. Valores de $OR > 1$ indicam risco aumentado em apresentar o fenótipo e valores $OR < 1$ indicam proteção em relação ao fenótipo avaliado.

5 RESULTADOS

5.1 Características das neoplasias de cavidade oral e laringe

As características clínicas, tipo de tratamento e a evolução dos pacientes com CEC de cavidade oral (235) ou de laringe (149) estão descritas na Tabela 5.

Em relação a cavidade oral, a maior parte dos pacientes tiveram a língua como o sítio de origem do tumor, seguido do assoalho e lábio inferior. Já para a laringe, 65,1% e 34,9% dos pacientes tiveram a glote e a supraglote, respectivamente, como locais de origem das lesões neoplásicas. Como esperado, o diagnóstico da maioria dos CEC de cavidade oral (70%) e de laringe (62,4%) foi realizado em estágio avançado da doença (III e IV). A cirurgia exclusiva ou associada à radioterapia com ou sem quimioterapia foram igualmente as principais modalidades curativas adotadas, enquanto 12% (28/235) e 5,3% (8/149) dos pacientes com CEC de cavidade oral e laringe, respectivamente, foram tratados sem intenção curativa, ou seja, tratamento de suporte e/ou paliativo.

Quanto ao controle clínico da doença, 87 (42%) pacientes com câncer de cavidade oral e 54 (38%) pacientes com câncer de laringe apresentaram recorrência após tratamento curativo. Dos pacientes com CEC de cavidade oral, 21 apresentaram segundo tumor primário e 15 metástase a distância, enquanto para a laringe foram observados 13 e 10 casos, respectivamente. Em relação a evolução dos pacientes, verificou-se que 52,8% (124) dos pacientes tiveram o tumor de cavidade oral como causa de óbito (MOCA) e que 35,3% (83) estavam vivos sem o câncer (VSD). Já para o CEC de laringe, observamos que 74 (49,6%) pacientes morreram em decorrência do câncer e que 59 (39,6%) estavam vivos sem a doença. Entre aqueles que morreram pelo câncer de cavidade oral ou de laringe, 95 e 55 pacientes, respectivamente, apresentavam doença avançada ao diagnóstico (dados não mostrados).

5.2 Descrição das características sociodemográficas, dos hábitos de beber e fumar e dos padrões de consumo do álcool (g/dia) e do tabaco (maços/ano) da população de estudo

As prevalências de cada categoria para as variáveis sociodemográficas sexo, idade, cor da pele e escolaridade entre os pacientes com CEC de cavidade oral ou laringe e os controles estão descritas na tabela 6.

A maior parte dos pacientes se declarou como sendo da cor de pele branca fato esse que influenciou no risco tanto do câncer de cavidade oral (OR = 1,50) quanto no de laringe (OR = 1,82). A menor chance de desenvolver o CEC de cavidade oral (OR = 0,38) foi verificada entre os indivíduos que apresentaram maior nível de escolaridade (≥ 11 anos). Já os pacientes com idade superior a 50 anos apresentaram um risco quase duas vezes maior de desenvolver o CEC de laringe do que aqueles indivíduos com idade igual ou inferior a 50.

A análise univariada para verificar a associação isolada do álcool e do fumo revelou diferença significativa quando comparados os grupos. As informações sobre os hábitos de beber e fumar e os padrões de consumo do álcool (g/dia) e do tabaco (maços/ano) tanto dos pacientes quanto dos indivíduos controles encontram-se descritas na tabela 7.

Para o CEC de cavidade oral, embora a maior parte dos pacientes (80%) tenha relatado o hábito de beber em algum momento de suas vidas, somente aqueles que se declararam bebedores atuais (58,5%) apresentaram um risco quase duas vezes maior de desenvolver o câncer quando comparados aos controles que nunca beberam (24%). Já para o CEC de laringe, o hábito de beber não contribuiu no risco da doença uma vez que as frequência daqueles que nunca beberam, dos ex-bebedores e bebedores atuais foram praticamente iguais entre os pacientes (20,1%, 37,6% e 42,3%) e os indivíduos controles (24%, 34,8% e 41,2% - Tabela 7).

Tanto para a cavidade oral quanto para a laringe, verificamos que o principal fator de risco foi o fato de o indivíduo ter sido ou ser fumante (Tabela 7). As chances de desenvolver o CEC de cavidade oral foram quase três vezes maiores entre os ex-fumantes (17%) e quase oito vezes maiores entre os fumantes atuais (77%) quando comparados aos indivíduos que nunca fumaram (26,7%). Para a laringe, o hábito de fumar aumentou em quatro e quase oito vezes o risco de desenvolver a neoplasia entre os ex-fumantes (35/149) e fumantes atuais (106/149), respectivamente.

Em relação aos padrões de consumo, observamos que o risco foi maior em decorrência da quantidade e tempo de uso do álcool (g/dia) e do tabaco (maços/ano). A ingestão pesada de bebidas alcoólicas (≥ 50 g/dia) elevou em 2,5 vezes o risco de desenvolver o CEC de cavidade oral e em duas vezes o risco para o CEC de laringe. Quanto ao tabaco, observamos que as chances de desenvolver o CEC de cavidade oral foram duas, seis e nove vezes maiores para os pacientes com consumo de até 20 maços/ano (13,2%), entre 21 e 40 maços/ano (28,2%) e superior a 40 maços/ano (52,6%),

respectivamente. Já para o CEC de laringe, verificamos riscos sete e 11 vezes maiores, respectivamente, para os pacientes que consumiram entre 21 e 40 maços/ano (47/149) e mais que 40 maços/ano (84/149), enquanto para aqueles com consumo de até 20 maços/ano (10/149) não foi observado risco.

Tabela 5 - Características clínicas, tratamento e evolução dos pacientes com CEC de cavidade oral ou de laringe

Características clínicas	Cavidade oral (235)		Laringe (149)	
	N	%	N	%
Sítio de origem				
Língua	85	36,2	-	-
Assoalho	73	31,1	-	-
Lábio inferior	24	10,2	-	-
Outros	53	22,5	-	-
Glote	-	-	97	65,1
Supraglote	-	-	52	34,9
Subglote	-	-	0	0
Estágio clínico (TNM)				
I	14	6	16	10,7
II	56	24	40	26,9
III	63	27	45	30,2
IV	101	43	48	32,2
Tratamento				
Cirurgia	91	38,9	56	37,6
Radioterapia/Quimio	27	11,5	32	21,5
Cirurgia+Radioterapia/Quimio	88	37,6	53	35,6
Paliativo	28	12	8	5,3
Recorrência				
Sim	87	42	54	38
Não	119	58	87	62
2º Tumor primário				
Sim	21	9	13	8,7
Não	214	91	136	91,3
Metástase a distância				
Sim	15	6,4	10	6,7
Não	220	93,6	139	93,4
Evolução da doença				
VSD	83	35,3	59	39,6
VCD	18	7,6	8	5,4
MOAS	10	4,3	8	5,4
MOCA	124	52,8	74	49,6

VSD = vivo sem câncer; VCD = vivo com câncer; MOAS = morto por outra causa que não o câncer; MOCA = morto pelo câncer

Tabela 6 - Distribuição dos pacientes com CEC de cavidade oral ou de laringe e dos controles segundo as variáveis sociodemográficas sexo, idade, cor da pele e escolaridade

Variáveis	Categorias	Cavidade Oral		Laringe		Controles
		N (%)	OR* (IC 95%)	N (%)	OR* (IC 95%)	N (%)
Sexo	Feminino	31 (13,2)	1	16 (10,7)	1	71 (15,8)
	Masculino	204 (86,8)	1,24 (0,79 - 1,95)	133 (89,3)	1,57 (0,88 - 2,80)	377 (84,2)
	Total	235 (100)		149 (100)		448 (100)
Idade	≤ 50 anos	87 (37,0)	1	39 (26,2)	1	184 (41,2)
	> 50 anos	148 (63,0)	1,19 (0,86 - 1,65)	110 (73,8)	1,97 (1,31 - 2,98)	263 (58,8)
	Total	235 (100)		149 (100)		447 (100)
Cor da pele	Não branca	75 (32,2)	1	42 (28,2)	1	184 (41,6)
	Branca	158 (67,8)	1,50 (1,07 - 2,08)	107 (71,8)	1,82 (1,21 - 2,73)	258 (58,4)
	Total	233 (100)		149 (100)		442 (100)
Escolaridade	0 - < 8 anos	160 (68,1)	1	96 (64,4)	1	262 (61,5)
	8 - < 11 anos	61 (26,0)	0,96 (0,66 - 1,39)	38 (25,5)	1,00 (0,64 - 1,55)	104 (24,4)
	≥ 11 anos	14 (6,0)	0,38 (0,21 - 0,71)	15 (10,1)	0,68 (0,37 - 1,26)	60 (14,1)
	Total	235 (100)		149 (100)		426 (100)

OR*: *Odds Ratio* não ajustado; IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

Tabela 7 - Resultados das análises univariadas dos hábitos de beber e fumar e dos padrões de consumo do álcool (g/dia) e do tabaco (maços/ano) entre os pacientes com CEC de cavidade oral ou de laringe e os controles

Variáveis	Categorias	Cavidade Oral		Laringe		Controles
		N (%)	OR* (IC 95%)	N (%)	OR* (IC 95%)	N (%)
Hábito de beber	nunca beberam	42 (18,0)	1	30 (20,1)	1	107 (24,0)
	ex-bebedores	55 (23,5)	0,98 (0,62 - 1,57)	56 (37,6)	1,28 (0,77 - 2,13)	155 (34,8)
	bebedores atuais	137 (58,5)	1,83 (1,20 - 2,79)	63 (42,3)	1,23 (0,75 - 2,02)	183 (41,2)
	Total	234 (100)		149 (100)		445 (100)
Consumo de álcool (g/dia)	0	42 (18)	1	30 (20,3)	1	107 (24,3)
	1 - 12,5 g/dia	19 (8,2)	0,63 (0,35 - 1,15)	13 (8,8)	0,60 (0,30 - 1,19)	77 (17,5)
	12,6 - 49,9 g/dia	28 (12,0)	0,62 (0,37 - 1,06)	22 (14,9)	0,69 (0,37 - 1,28)	114 (25,9)
	≥ 50 g/dia	144 (61,8)	2,58 (1,68 - 3,93)	83 (56,1)	2,08 (1,27 - 3,43)	142 (32,3)
	Total	233 (100)		148 (100)		440 (100)
Hábito de fumar	nunca fumaram	14 (6,0)	1	8 (5,4)	1	119 (26,7)
	ex-fumantes	40 (17,0)	2,72 (1,41 - 5,25)	35 (23,5)	4,17 (1,86 - 9,34)	124 (27,9)
	fumantes atuais	181 (77,0)	7,65 (4,25 - 13,80)	106 (71,1)	7,85 (3,69 - 16,7)	202 (45,4)
	Total	235 (100)		149 (100)		445 (100)
Consumo de tabaco (maços/ano)	0	14 (6,0)	1	8 (5,4)	1	119 (27,0)
	até 20 maços/ano	31 (13,2)	2,27 (1,16 - 4,50)	10 (6,7)	1,28 (0,47 - 3,31)	116 (26,3)
	21 - 40 maços/ano	66 (28,2)	5,90 (3,09 - 10,88)	47 (31,5)	7,36 (3,29 - 15,53)	95 (21,5)
	> 40 maços/ano	123 (52,6)	9,42 (5,06 - 16,94)	84 (56,4)	11,26 (5,38 - 23,5)	111 (25,2)
	Total	234 (100)		149 (100)		441 (100)

OR*: Odds Ratio não ajustado; IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

5.3 Análise dos polimorfismos genéticos

O equilíbrio de Hardy-Weimberg (Hardy, 1908) foi calculado para cada um dos 11 polimorfismos analisados na amostra controle (Tabela 8). Em todas as análises as frequências alélicas e a distribuição genotípica das variáveis estudadas estavam em equilíbrio, com exceção dos polimorfismos *OPRM1* Asn/Asp ($X^2= 5,23$, $p=0,022$), *OPRM1* Ala/Val ($X^2= 5,45$, $p=0,02$), *SLC6A4* ($X^2= 9,45$, $p=0,002$) e o *CHRNA5* ($X^2= 3,90$, $p=0,048$). Independente desses resultados, optamos por incluir os 11 polimorfismos genéticos nas nossas análises de associação com o risco das neoplasias.

Os resultados das análises univariadas e da regressão logística dos cinco polimorfismos das enzimas de metabolização do álcool - *ADH1B*, *ADH1C* e *CYP2E1* - com o risco de CEC de cavidade oral e laringe para os modelos genéticos avaliados estão descritos nas tabelas 9 e 10, respectivamente.

Na análise univariada, a presença do polimorfismo genético *ADH1B**2 foi associada com o menor risco de desenvolvimento do câncer de cavidade oral (OR= 0,41) e laringe (OR=0,37), uma vez que esse alelo foi mais frequente entre os indivíduos do grupo controle (7,7%) do que entre os pacientes com as neoplasias (3,4% - Tabela 9). Em modelo de regressão logística ajustado para as variáveis de confusão, observamos que o mesmo polimorfismo permaneceu como fator de proteção para ambos os cânceres. O grupo controle apresentou 64% e 67% menos chances de desenvolver CEC de cavidade oral e de laringe para os dois modelos genéticos avaliados (Tabela 10). Já a segunda variante do gene *ADH1B* (*ADH1B**3) não foi associada ao risco das neoplasias estudadas tanto no modelo de genótipos quanto no modelo dominante (Tabelas 9 e 10). Também não foi possível calcular o valor do risco associado ao genótipo homozigoto mutado (*ADH1B**3/*3) devido a ausência de indivíduos com esse genótipo.

As análises univariadas também revelaram associações significativas para os dois polimorfismos da enzima *ADH1C* (rs 698 e rs 1693482) e o CEC de laringe tanto para o modelo de genótipos (OR = 1,67 e OR = 1,69) quanto para o modelo dominante (OR = 1,50 e OR = 1,54 - Tabela 9), porém, quando ajustados em modelo de regressão logística essas significâncias foram perdidas (Tabela 10).

Já o alelo polimórfico *c2* da enzima de metabolização do álcool *CYP2E1* não foi associado com o risco das neoplasias estudadas (tabelas 9 e 10). A variante polimórfica foi frequente em 6% da nossa amostra, enquanto o genótipo homozigoto mutado (*c2/c2*)

foi ausente nos pacientes com câncer e presente apenas em dois indivíduos do grupo controle (0,4%).

Tabela 8 - Distribuição das frequências genótípicas e dos alelos polimórficos, além dos resultados do Equilíbrio Hardy-Weimberg (EHW) das variantes genéticas avaliadas para o grupo controle (N=448)

Polimorfismo	Genótipos	Controles		MAF (%)	EHW	
		N	(%)		χ^2	p
<i>ADH1B</i> (rs 1229984)	<i>ADH1B</i> *1/*1	384	85,7	7,7	2,426	0,119
	<i>ADH1B</i> *1/*2	59	13,2			
	<i>ADH1B</i> *2/*2	5	1,1			
<i>ADH1B</i> (rs 2066702)	<i>ADH1B</i> *1/*1	412	92	4,2	1,930	0,165
	<i>ADH1B</i> *1/*3	34	7,6			
	<i>ADH1B</i> *3/*3	2	0,4			
<i>ADH1C</i> (rs 698)	<i>ADH1C</i> *1/*1	251	56	25,3	0,657	0,418
	<i>ADH1C</i> *1/*2	161	36			
	<i>ADH1C</i> *2/*2	36	8			
<i>ADH1C</i> (rs 1693482)	<i>ADH1C</i> *1/*1	257	57,4	24,9	1,153	0,283
	<i>ADH1C</i> *1/*2	159	35,5			
	<i>ADH1C</i> *2/*2	32	7,1			
<i>CYP2E1</i> (rs 3813867)	<i>c1/c1</i>	395	88,2	6,1	0,065	0,798
	<i>c1/c2</i>	51	11,4			
	<i>c2/c2</i>	2	0,4			
<i>OPRM1</i> (rs 1799971)	AA (Asn/Asn)	340	75,9	13,6	5,231	0,022
	AG (Asn/Asp)	94	21			
	GG (Asp/Asp)	14	3,1			
<i>OPRM1</i> (rs 1799972)	CC (Ala/Ala)	402	89,7	5,6	5,456	0,020
	CT (Ala/Val)	42	9,4			
	TT (Val/Val)	4	0,9			
<i>DRD2</i> (rs 1800497)	CC (A2/A2)	231	51,6	28,2	0,004	0,948
	CT (A2/A1)	181	40,4			
	TT (A1/A1)	36	8			
<i>SLC6A4</i> (indel)	<i>LL</i>	162	37,7	41,6	9,446	0,002
	<i>LS</i>	178	41,4			
	<i>SS</i>	90	20,9			
<i>CHRNA3</i> (rs 578776)	CC	167	37,4	39,4	0,341	0,560
	CT	207	46,4			
	TT	72	16,1			
<i>CHRNA5</i> (rs 16969968)	GG (Asp/Asp)	246	55	27,1	3,903	0,048
	GA (Asp/Asn)	160	35,8			
	AA (Asn/Asn)	41	9,2			

Número de controles avaliados para o *SLC6A4* (N=430), *CHRNA3* (N=446) e *CHRNA5* (N=447); MAF: *Minor allele frequency* (frequência do alelo polimórfico); p<0,05.

Tabela 9 - Resultados das análises univariadas dos cinco polimorfismos das enzimas de metabolização do álcool - *ADH1B*, *ADH1C* e *CYP2E1* - com o risco de CEC de cavidade oral e laringe

Polimorfismo	Genótipos	Cavidade Oral		Laringe		Controles
		N (%)	OR* (IC 95%)	N (%)	OR* (IC 95%)	N (%)
<i>ADH1B</i> (rs 1229984)	<i>ADH1B</i> *1/*1	220 (93,6)	1	140 (94)	1	384 (85,7)
	<i>ADH1B</i> *1/*2	14 (6)	0,41 (0,23 - 0,74)	8 (5,3)	0,37 (0,18 - 0,80)	59 (13,2)
	<i>ADH1B</i> *2/*2	1 (0,4)	0,35 (0,04 - 2,54)	1 (0,7)	0,55 (0,06 - 4,01)	5 (1,1)
	*1/*2 + *2/*2	15 (6,4)	0,41 (0,23 - 0,73)	9 (6)	0,38 (0,19 - 0,78)	64 (14,3)
	Total	235 (100)		149 (100)		448 (100)
<i>ADH1B</i> (rs 2066702)	<i>ADH1B</i> *1/*1	225 (95,7)	1	142 (95,9)	1	412 (92)
	<i>ADH1B</i> *1/*3	10 (4,3)	0,54 (0,26 - 1,09)	6 (4,1)	0,51 (0,22 - 1,22)	34 (7,6)
	<i>ADH1B</i> *3/*3	0 (0)	NA	0 (0)	NA	2 (0,4)
	*1/*3 + *3/*3	10 (4,3)	0,51 (0,25 - 1,01)	6 (4,1)	0,48 (0,21 - 1,14)	36 (8)
	Total	235 (100)		149 (100)		448 (100)
<i>ADH1C</i> (rs 698)	<i>ADH1C</i> *1/*1	119 (50,6)	1	68 (45,9)	1	251 (56)
	<i>ADH1C</i> *1/*2	91 (38,7)	1,19 (0,84 - 1,67)	73 (49,3)	1,67 (1,14 - 2,47)	161 (36)
	<i>ADH1C</i> *2/*2	25 (10,6)	1,46 (0,84 - 2,54)	7 (4,7)	0,72 (0,29 - 1,67)	36 (8)
	*1/*2 + *2/*2	116 (49,4)	1,24 (0,94 - 1,77)	80 (54,1)	1,50 (1,03 - 2,16)	197 (44)
	Total	235 (100)		148 (100)		448 (100)
<i>ADH1C</i> (rs 1693482)	<i>ADH1C</i> *1/*1	120 (51,1)	1	69 (46,6)	1	257 (57,4)
	<i>ADH1C</i> *1/*2	91 (38,7)	1,23 (0,87 - 1,72)	72 (48,6)	1,69 (1,15 - 2,49)	159 (35,5)
	<i>ADH1C</i> *2/*2	24 (10,2)	1,61 (0,90 - 2,82)	7 (4,7)	0,81 (0,33 - 1,93)	32 (7,1)
	*1/*2 + *2/*2	115 (48,9)	1,29 (0,94 - 1,77)	79 (53,4)	1,54 (1,05 - 2,22)	191 (42,6)
	Total	235 (100)		148 (100)		448 (100)
<i>CYP2E1</i> (rs 3813867)	<i>c1/c1</i>	207 (88,1)	1	134 (89,9)	1	395 (88,2)
	<i>c1/c2</i>	28 (11,9)	1,05 (0,63 - 1,69)	15 (10,1)	0,87 (0,46 - 1,58)	51 (11,4)
	<i>c2/c2</i>	0 (0)	NA	0 (0)	NA	2 (0,4)
	<i>c1/c2</i> + <i>c2/c2</i>	28 (11,9)	1,01 (0,61 - 1,62)	15 (10,1)	0,83 (0,45 - 1,51)	53 (11,8)
	Total	235 (100)		149 (100)		448 (100)

OR*: Odds Ratio não ajustado; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; NA: não avaliável.

Tabela 10 - Resultados da análise de regressão logística dos cinco polimorfismos das enzimas de metabolização do álcool - *ADH1B*, *ADH1C* e *CYP2E1* - com o risco de CEC de cavidade oral e laringe

Polimorfismo	Genótipos	Cavidade Oral		Laringe		Controles
		N (%)	OR* (IC 95%)	N (%)	OR* (IC 95%)	N (%)
<i>ADH1B</i> (rs 1229984)	<i>ADH1B</i> *1/*1	220 (93,6)	1	140 (94)	1	384 (85,7)
	<i>ADH1B</i> *1/*2	14 (6)	0,36 (0,19 - 0,70)	8 (5,3)	0,33 (0,15 - 0,73)	59 (13,2)
	<i>ADH1B</i> *2/*2	1 (0,4)	0,19 (0,02 - 1,82)	1 (0,7)	0,41 (0,04 - 3,94)	5 (1,1)
	*1/*2 + *2/*2	15 (6,4)	0,35 (0,18 - 0,66)	9 (6)	0,33 (0,16 - 0,72)	64 (14,3)
	Total	235 (100)		149 (100)		448 (100)
<i>ADH1B</i> (rs 2066702)	<i>ADH1B</i> *1/*1	225 (95,7)	1	142 (95,9)	1	412 (92)
	<i>ADH1B</i> *1/*3	10 (4,3)	0,56 (0,26 - 1,22)	6 (4,1)	0,58 (0,23 - 1,48)	34 (7,6)
	<i>ADH1B</i> *3/*3	0 (0)	NA	0 (0)	NA	2 (0,4)
	*1/*3 + *3/*3	10 (4,3)	0,54 (0,25 - 1,18)	6 (4,1)	0,56 (0,22 - 1,42)	36 (8)
	Total	235 (100)		148 (100)		448 (100)
<i>ADH1C</i> (rs 698)	<i>ADH1C</i> *1/*1	119 (50,6)	1	68 (45,9)	1	251 (56)
	<i>ADH1C</i> *1/*2	91 (38,7)	1,06 (0,73 - 1,53)	73 (49,3)	1,44 (0,95 - 2,17)	161 (36)
	<i>ADH1C</i> *2/*2	25 (10,6)	1,81 (0,94 - 3,49)	7 (4,7)	0,98 (0,39 - 2,74)	36 (8)
	*1/*2 + *2/*2	116 (49,4)	1,16 (0,82 - 1,64)	80 (54,1)	1,38 (0,92 - 2,06)	197 (44)
	Total	235 (100)		148 (100)		448 (100)
<i>ADH1C</i> (rs 1693482)	<i>ADH1C</i> *1/*1	120 (51,1)	1	69 (46,6)	1	257 (57,4)
	<i>ADH1C</i> *1/*2	91 (38,7)	1,11 (0,76 - 1,60)	72 (48,6)	1,46 (0,97 - 2,21)	159 (35,5)
	<i>ADH1C</i> *2/*2	24 (10,2)	1,85 (0,96 - 3,56)	7 (4,7)	0,98 (0,39 - 2,48)	32 (7,1)
	*1/*2 + *2/*2	115 (48,9)	1,21 (0,85 - 1,71)	79 (53,4)	1,40 (0,93 - 2,09)	191 (42,6)
	Total	235 (100)		148 (100)		448 (100)
<i>CYP2E1</i> (rs 3813867)	<i>c1/c1</i>	207 (88,1)	1	134 (89,9)	1	395 (88,2)
	<i>c1/c2</i>	28 (11,9)	1,12 (0,65 - 1,94)	15 (10,1)	1,10 (0,56 - 2,17)	51 (11,4)
	<i>c2/c2</i>	0 (0)	NA	0 (0)	NA	2 (0,4)
	<i>c1/c2</i> + <i>c2/c2</i>	28 (11,9)	1,08 (0,63 - 1,86)	15 (10,1)	1,07 (0,55 - 2,09)	53 (11,8)
	Total	235 (100)		149 (100)		448 (100)

OR*: *Odds Ratio* ajustado para as covariáveis de confusão sexo, idade, cor da pele, escolaridade e os hábitos de beber e fumar; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; NA: não avaliável.

Nas tabelas 11 e 12 estão descritos, respectivamente, os resultados das análises univariadas e da regressão logística dos quatro polimorfismos em genes associados com a dependência do álcool e tabaco - *OPRM1*, *DRD2* e *SLC6A4* - e dos dois polimorfismos em genes associados exclusivamente com a dependência do tabaco - *CHRNA3* e *CHRNA5* - com o risco de CEC de cavidade oral e laringe.

Em relação aos genes de dependência do álcool e do tabaco, as análises univariadas revelaram diferenças significantes somente para o polimorfismo do gene *OPRM1* (alelo G, rs 1799971) e o câncer de laringe tanto para o modelo de genótipos (OR = 1,68) quanto para o modelo dominante (OR = 1,50 - Tabela 11). Já na análise de regressão logística as duas variantes genéticas do *OPRM1* (alelo G e alelo T) foram associadas com o risco de neoplasia para esse sítio em ambos os modelos genéticos (Tabela 12). As chances de desenvolver o CEC de laringe foram 1,73 e quase duas vezes maiores para os pacientes com genótipo heterozigoto para o alelo G e alelo T, respectivamente. Não foram encontradas associações significativas para as variantes dos genes *DRD2* e *SLC6A4* e as neoplasias no modelo de regressão logística (Tabela 12).

As variantes alélicas *CHRNA3* (C→T) e *CHRNA5* (Asp398Asn) relacionadas exclusivamente com a dependência do tabaco também não contribuíram no risco do câncer de cavidade oral e laringe para os modelos genéticos avaliados (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11 - Resultados das análises univariadas dos quatro polimorfismos em genes associados com a dependência do álcool e tabaco - *OPRM1*, *DRD2* e *SLC6A4* - e dos dois polimorfismos em genes associados exclusivamente com a dependência do tabaco - *CHRNA3* e *CHRNA5* - com o risco de CEC de cavidade oral e laringe

Polimorfismo	Genótipos	Cavidade Oral		Laringe		Controles
		N (%)	OR* (IC 95%)	N (%)	OR* (IC 95%)	N (%)
<i>OPRM1</i> (rs 1799971)	AA (Asn/Asn)	187 (79,6)	1	101 (67,8)	1	340 (75,9)
	AG (Asn/Asp)	40 (17)	0,77 (0,51 - 1,18)	47 (31,5)	1,68 (1,08 - 2,55)	94 (21)
	GG (Asp/Asp)	8 (3,4)	1,04 (0,45 - 2,49)	1 (0,7)	0,24 (0,13 - 1,48)	14 (3,1)
	AG + GG (Asn/Asp + Asp/Asp)	48 (20,4)	0,81 (0,55 - 1,19)	48 (32,2)	1,50 (1,01 - 2,23)	108 (24,1)
	Total	235 (100)		149 (100)		448 (100)
<i>OPRM1</i> (rs 1799972)	CC (Ala/Ala)	207 (88,1)	1	127 (85,2)	1	402 (89,7)
	CT (Ala/Val)	25 (10,6)	1,16 (0,67 - 1,93)	21 (14,1)	1,58 (0,91 - 2,72)	42 (9,4)
	TT (Val/Val)	3 (1,3)	1,46 (0,36 - 5,46)	1 (0,7)	0,79 (0,09 - 4,82)	4 (0,9)
	CT + TT (Ala/Val + Val/Val)	28 (11,9)	1,18 (0,73 - 1,95)	22 (14,8)	1,51 (0,44 - 2,62)	46 (10,3)
	Total	235 (100)		149 (100)		448 (100)
<i>DRD2</i> (rs 1800497)	CC (A2/A2)	115 (48,9)	1	84 (56,4)	1	231 (51,6)
	CT (A2/A1)	104 (44,3)	1,15 (0,83 - 1,60)	51 (34,2)	0,77 (0,51 - 1,16)	181 (40,4)
	TT (A1/A1)	16 (6,8)	0,89 (0,47 - 1,66)	14 (9,4)	1,07 (0,55 - 2,02)	36 (8)
	CT + TT (A2/A1 + A1/A1)	120 (51,1)	1,11 (0,81 - 1,52)	65 (43,6)	0,82 (0,57 - 1,20)	217 (48,4)
	Total	235 (100)		149 (100)		448 (100)
<i>SLC6A4</i> (indel)	LL	84 (36,8)	1	52 (36,4)	1	162 (37,7)
	LS	92 (40,4)	0,99 (0,69 - 1,44)	65 (45,4)	1,14 (0,75 - 1,74)	178 (41,4)
	SS	52 (22,8)	1,11 (0,73 - 1,71)	26 (18,2)	0,90 (0,54 - 1,54)	90 (20,9)
	LS + SS	144 (63,2)	1,04 (0,75 - 1,45)	91 (63,6)	1,06 (0,71 - 1,57)	268 (62,3)
	Total	228 (100)		143 (100)		430 (100)
<i>CHRNA3</i> (rs 578776)	CC	84 (35,9)	1	62 (41,9)	1	167 (37,4)
	CT	122 (52,1)	1,17 (0,84 - 1,65)	65 (43,9)	0,84 (0,56 - 1,27)	207 (46,4)
	TT	28 (12)	0,77 (0,47 - 1,29)	21 (14,2)	0,78 (0,45 - 1,36)	72 (16,1)
	CT + TT	150 (64,1)	1,07 (0,77 - 1,49)	86 (58,1)	0,83 (0,57 - 1,21)	279 (62,5)
	Total	234 (100)		148 (100)		446 (100)
<i>CHRNA5</i> (rs 16969968)	GG (Asp/Asp)	118 (50,2)	1	69 (46,6)	1	246 (55)
	GA (Asp/Asn)	94 (40)	1,22 (0,87 - 1,72)	64 (43,2)	1,42 (0,97 - 2,09)	160 (35,8)
	AA (Asn/Asn)	23 (9,8)	1,17 (0,66 - 2,01)	15 (10,1)	1,30 (0,70 - 2,51)	41 (9,2)
	GA + AA (Asp/Asn + Asn/Asn)	117 (49,8)	1,21 (0,89 - 1,66)	79 (53,4)	1,40 (0,96 - 2,02)	201 (45)
	Total	235 (100)		148 (100)		447 (100)

OR*: Odds Ratio não ajustado; IC95%: intervalo de confiança de 95%.

Tabela 12 - Resultados da análise de regressão logística dos quatro polimorfismos em genes associados com a dependência do álcool e tabaco - *OPRM1*, *DRD2* e *SLC6A4* - e dos dois polimorfismos em genes associados exclusivamente com a dependência do tabaco - *CHRNA3* e *CHRNA5* - com o risco de CEC de cavidade oral e laringe

Polimorfismo	Genótipos	Cavidade Oral		Laringe		Controles
		N (%)	OR* (IC 95%)	N (%)	OR* (IC 95%)	N (%)
<i>OPRM1</i> (rs 1799971)	AA (Asn/Asn)	187 (79,6)	1	101 (67,8)	1	340 (75,9)
	AG (Asn/Asp)	40 (17)	0,78 (0,50 - 1,22)	47 (31,5)	1,73 (1,10 - 2,72)	94 (21)
	GG (Asp/Asp)	8 (3,4)	1,13 (0,42 - 3,04)	1 (0,7)	0,29 (0,04 - 2,32)	14 (3,1)
	AG + GG (Asn/Asp + Asp/Asp)	48 (20,4)	0,82 (0,54 - 1,25)	48 (32,2)	1,56 (1,00 - 2,42)	108 (24,1)
	Total	235 (100)		149 (100)		448 (100)
<i>OPRM1</i> (rs 1799972)	CC (Ala/Ala)	207 (88,1)	1	127 (85,2)	1	402 (89,7)
	CT (Ala/Val)	25 (10,6)	1,18 (0,67 - 2,10)	21 (14,1)	1,89 (1,02 - 3,53)	42 (9,4)
	TT (Val/Val)	3 (1,3)	1,93 (0,34 - 11,0)	1 (0,7)	1,26 (0,11 - 14,6)	4 (0,9)
	CT + TT (Ala/Val + Val/Val)	28 (11,9)	1,23 (0,71 - 2,14)	22 (14,8)	1,85 (1,01 - 3,40)	46 (10,3)
	Total	235 (100)		149 (100)		448 (100)
<i>DRD2</i> (rs 1800497)	CC (A2/A2)	115 (48,9)	1	84 (56,4)	1	231 (51,6)
	CT (A2/A1)	104 (44,3)	1,22 (0,85 - 1,76)	51 (34,2)	0,87 (0,57 - 1,34)	181 (40,4)
	TT (A1/A1)	16 (6,8)	1,04 (0,52 - 2,08)	14 (9,4)	1,53 (0,73 - 3,17)	36 (8)
	CT + TT (A2/A1 + A1/A1)	120 (51,1)	1,19 (0,84 - 1,69)	65 (43,6)	0,96 (0,64 - 1,44)	217 (48,4)
	Total	235 (100)		149 (100)		448 (100)
<i>SLC6A4</i> (indel)	LL	84 (36,8)	1	52 (36,4)	1	162 (37,7)
	LS	92 (40,4)	0,91 (0,61 - 1,36)	65 (45,4)	0,98 (0,62 - 1,56)	178 (41,4)
	SS	52 (22,8)	1,08 (0,67 - 1,73)	26 (18,2)	0,88 (0,49 - 1,58)	90 (20,9)
	LS + SS	144 (63,2)	0,97 (0,67 - 1,39)	91 (63,6)	0,95 (0,62 - 1,46)	268 (62,3)
	Total	228 (100)		143 (100)		430 (100)
<i>CHRNA3</i> (rs 578776)	CC	84 (35,9)	1	62 (41,9)	1	167 (37,4)
	CT	122 (52,1)	1,33 (0,91 - 1,95)	65 (43,9)	0,97 (0,63 - 1,51)	207 (46,4)
	TT	28 (12)	1,01 (0,58 - 1,77)	21 (14,2)	0,94 (0,51 - 1,75)	72 (16,1)
	CT + TT	150 (64,1)	1,26 (0,87 - 1,81)	86 (58,1)	0,96 (0,64 - 1,46)	279 (62,5)
	Total	234 (100)		148 (100)		446 (100)
<i>CHRNA5</i> (rs 16969968)	GG (Asp/Asp)	118 (50,2)	1	69 (46,6)	1	246 (55)
	GA (Asp/Asn)	94 (40)	1,26 (0,86 - 1,84)	64 (43,2)	1,32 (0,85 - 2,03)	160 (35,8)
	AA (Asn/Asn)	23 (9,8)	0,86 (0,46 - 1,58)	15 (10,1)	1,07 (0,53 - 2,14)	41 (9,2)
	GA + AA (Asp/Asn + Asn/Asn)	117 (49,8)	1,16 (0,82 - 1,66)	79 (53,4)	1,26 (0,84 - 1,90)	201 (45)
	Total	235 (100)		148 (100)		447 (100)

OR*: Odds Ratio ajustado para as covariáveis de confusão sexo, idade, cor da pele, escolaridade e os hábitos de beber e fumar; IC 95%: intervalo de confiança de 95%

6 DISCUSSÃO

No presente estudo caso-controle de base hospitalar as frequências genótípicas de polimorfismos dos genes de metabolização do álcool (*ADH1B*, *ADH1C* e *CYP2E1*) e dos genes associados com a dependência do álcool e tabaco (*OPRM1*, *DRD2*, *SLC6A4*, *CHRNA5* e *CHRNA3*) foram avaliadas em 384 pacientes com câncer (235 pacientes com CEC de cavidade oral e 149 pacientes com CEC de laringe) e em 448 indivíduos sem histórico de neoplasias. As frequências genótípicas observadas foram então comparadas entre os grupos para avaliar a associação dos polimorfismos com o risco de tumores da cavidade oral e laringe. Alguns fatores individuais como os hábitos de beber e fumar e os padrões de consumo do álcool e do tabaco também foram considerados nas análises de risco para o desenvolvimento das neoplasias.

Os resultados desta investigação mostraram que o genótipo *ADH1B**2 (rs 1229984) em heterozigose (*ADH1B**1/*2) foi mais frequente entre os controles do que entre os pacientes com neoplasias, conferindo proteção tanto para o desenvolvimento do CEC de cavidade oral quanto para o de laringe. Já a presença em heterozigose dos dois polimorfismos do *OPRM1* (rs 1799971 e rs 1799972) elevou o risco somente para o CEC de laringe.

Quanto aos hábitos, observamos que o principal fator de risco para os tumores de cavidade oral e de laringe foi o fato de o indivíduo ser ou ter sido fumante, com riscos crescentes da menor para a maior carga tabágica (maços/ano) consumida. Em relação ao álcool, somente os pacientes que se declararam bebedores atuais apresentaram risco de desenvolver o CEC de cavidade oral, enquanto a ingestão pesada de bebidas alcoólicas (≥ 50 g/dia) elevou o risco para ambas as neoplasias avaliadas.

Características clínicas dos tumores de cavidade oral e laringe

Os cânceres de cavidade oral e de laringe têm alta incidência em nosso país e, sobretudo, são diagnosticados tardiamente, quando pouco ou quase nada pode ser feito em termos de tratamento, impactando drasticamente as chances de sobrevida para o paciente. Em geral, a língua, o assoalho e o lábio inferior são as localizações mais comumente relatadas nos estudos de câncer de cavidade oral (INCA; Chi et al., 2015). Em concordância com literatura encontramos na língua a topografia mais frequente, com 36,2% dos casos, seguido do assoalho (31,1%) e lábio inferior (10,2%). Em relação a

laringe, aproximadamente 60% dos casos se iniciam na glote, 35% se desenvolvem na região da supraglote e o restante na subglote ou em mais de uma área (NCI; INCA). Nossos resultados são semelhantes a essas frequências, uma vez que 65,1% e 34,9% dos casos se iniciaram na glote e supraglote, respectivamente.

Este trabalho também identificou predominância de pacientes em estágio tardio (III ou IV) ao diagnóstico tanto para os tumores de cavidade oral (164 - 70%) quanto para os de laringe (93 - 62,4%). Esses resultados refletiram na evolução da doença uma vez que 76,6% e 74,3% dos pacientes que tiveram como causa de óbito o CEC de cavidade oral e laringe, respectivamente, apresentavam doença avançada (estágio III ou IV) ao diagnóstico. De fato, entre 60 a 70% dos casos são diagnosticados tardiamente e em fase avançada da doença, quando o tratamento frequentemente é extenso, mutilador e doloroso para os pacientes e as chances de cura são pequenas (Steuer et al., 2017). Algumas razões determinantes para este quadro incluem: o fato da doença ser geralmente assintomática nos estágios iniciais, de pacientes negligenciarem os primeiros sintomas - muitas vezes confundíveis com enfermidades passageiras que não despertam grandes preocupações -, o difícil acesso aos serviços públicos de saúde e de profissionais inaptos a identificar a doença no primeiro contato com o paciente (Carvalho et al., 2002).

Os tratamentos oncológicos para os cânceres de cavidade oral e laringe incluem a cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia, que podem ser utilizados de forma isolada ou combinada. O tipo de tratamento varia de acordo com a extensão do tumor e com as características anatômicas do local em que ele se encontra. Verificou-se em nosso estudo frequências semelhantes de pacientes com CEC de cavidade oral e de laringe submetidos exclusivamente à cirurgia (38,9% e 37,6%) e também daqueles submetidos à cirurgia associada à radioterapia adjuvante com ou sem quimioterapia (37,6% e 35,6%).

Contribuição das variáveis sociodemográficas, dos hábitos de beber e fumar e dos padrões de consumo do álcool e do tabaco no risco do câncer de cavidade oral e laringe

As variáveis sociodemográficas cor de pele branca, idade superior a 50 anos e menor nível de escolaridade foram associadas ao maior risco de desenvolver as neoplasias avaliadas. Esse perfil sociodemográfico parece ser o mesmo encontrado por vários autores em diferentes populações, inclusive na brasileira (Noce; Rebelo, 2008; Moyses et al., 2013; de Menezes et al., 2015; Ribeiro et al., 2015; Toporcov et al., 2015).

Os carcinomas na região da cabeça e pescoço acometem todas as etnias, mas são mais comum em negros e asiáticos (Vilar; Martins, 2012). Na nossa amostra, um maior risco de desenvolver tumores tanto na cavidade oral quanto na laringe foi observado nos indivíduos que declararam ser de cor de pele branca. Embora tenha sido observada diferença em relação à cor de pele, essa questão é um assunto controverso na população brasileira devido a sua intensa miscigenação. Segundo estudos brasileiros existe uma tendência ao “branqueamento” da nossa população nas autodeclarações de cor de pele, principalmente por duas considerações (Leite et al., 2011; Cardena et al., 2013). A primeira refere-se ao grande número de termos que os brasileiros utilizam para identificar as variações de cor da pele entre os extremos branco e negro. Já a segunda consideração refere-se à influência de outras variáveis sobre a autodeclaração da cor de pele, como a posição social, a percepção subjetiva da cor, escolaridade, sexo, idade dos entrevistados e variações regionais e culturais. Nossos resultados, portanto, devem ser vistos com cautela uma vez que existem discrepâncias entre a informação de autodeclaração da cor de pele e ancestralidade genética da população brasileira, resultando em dificuldades no uso desses dados em estudos epidemiológicos (Cardena et al., 2013).

Os nossos resultados também demonstraram uma maior incidência dos tumores em indivíduos com idade superior a 50 anos, embora essa variável tenha sido estatisticamente significativa apenas para a laringe. De fato, os estudos mostram que o processo carcinogênico desses tecidos é frequentemente lento sendo mais prevalente na faixa etária entre 50 a 70 anos (Moyses et al., 2013; Chi et al., 2015; Tamaki et al., 2018). No entanto, vale ressaltar que um número crescente de casos entre os jovens tem sido observado, especialmente para o câncer da cavidade oral e orofaringe em associação com a infecção pelo HPV (Marur et al., 2010; Panwar et al., 2017). Em relação ao gênero, a maior prevalência desses tumores é relatada em indivíduos do sexo masculino, provavelmente pela exposição maior e mais precoce aos principais agentes cancerígenos associados a esse tipo de doença (Anantharaman et al., 2011; Ferreira Antunes et al., 2013; Chi et al., 2015). Nossos achados são semelhantes com os da literatura, uma vez que 86,8% e 89,3% dos CEC de cavidade oral e laringe ocorreram em homens. Entretanto, nos últimos anos como o consumo de álcool e tabaco tornou-se mais frequentes entre as mulheres, os riscos para esses tipos de câncer também têm aumentado para o sexo feminino.

Quanto a escolaridade, observamos que os pacientes que declararam maior nível de escolaridade (≥ 11 anos) apresentaram 64% menos chances de desenvolver o câncer

oral. A escolaridade parece ser um dos indicadores sociais mais empregados nos estudos epidemiológicos e na associação com o câncer de cabeça e pescoço, com ênfase às regiões de lábio, cavidade oral, faringe e laringe (Boing; Antunes, 2011). A baixa escolaridade e o menor poder aquisitivo podem representar indicativos de difícil acesso aos serviços de saúde, má higienização e má alimentação, contribuindo assim no risco de desenvolver esses cânceres.

Em relação aos hábitos, os estudos epidemiológicos clássicos reconhecem o álcool e tabaco como os principais fatores de risco para os tumores malignos de cavidade oral e laringe. O risco relativo para consumidores abusivos e crônicos de bebidas alcoólicas aumenta de 2 a 6 vezes, enquanto para os fumantes pode variar de 5 a 25 vezes, dependendo da quantidade consumida, tempo de uso, gênero, etnia, além de variações genéticas na população (Vilar; Martins, 2012; INCA). Um fato muito importante a ser considerado na etiologia desses tumores é a magnitude do risco devido à interação entre o consumo de álcool e o tabaco, cujos efeitos adversos são maiores que a simples adição ou multiplicação dos efeitos individuais de beber e fumar (Hashibe et al., 2009; Szymanska et al., 2011; Ferreira Antunes et al., 2013). Estima-se que 61% das neoplasias de cavidade oral e 85% dos tumores de laringe são atribuídos ao uso combinado e abusivo dessas duas substâncias (Anantharaman et al., 2011).

Na nossa amostra, a maior parte dos pacientes com CEC de cavidade oral e laringe (80%) e dos controles (75%) relataram o consumo de álcool em algum momento de suas vidas. No entanto, somente os pacientes que no momento da entrevista declararam ainda consumir bebidas alcoólicas apresentaram um risco quase duas vezes maior de desenvolver o CEC de cavidade oral. Em relação ao tabaco, poucos indivíduos relataram nunca terem fumado, sendo que 94% dos pacientes com CEC de cavidade oral e de laringe e 73% dos controles declararam ser ou ter sido tabagistas. O fato do indivíduo ser fumante aumentou em quase oito vezes o risco de desenvolver neoplasias na boca e na laringe, resultados semelhantes a de outros estudos (Ferreira Antunes et al., 2013; Toporcov et al., 2015; Kfoury et al., 2018). Os pacientes que se declararam ex-fumantes apresentaram riscos menores de desenvolver câncer de cavidade oral (OR = 2,60) e de laringe (OR = 3,98) quando comparados àqueles que nunca fumaram. Em geral, parar o consumo de álcool e de tabaco diminui os riscos de câncer, embora possa levar anos para que os mesmos sejam semelhantes aos daqueles que nunca fumaram e beberam (Bosetti et al., 2006; Chi et al., 2015). Por exemplo, o risco de câncer de laringe em ex-fumantes continua maior comparado ao daqueles que nunca fumaram mesmo após 20 anos de

abstinência, enquanto para a cavidade oral os riscos se igualam. Já para o álcool essa relação se inverte, ou seja, após 20 anos de abstinência o risco permanece maior para o câncer oral e se assemelha ao daqueles que nunca beberam para os tumores de laringe (Marron et al., 2010).

Análises conduzidas no contexto de consórcios internacionais de estudos epidemiológicos de câncer com avaliação de um grande volume de dados, permitiram examinar com propriedade o efeito isolado do consumo de álcool entre não fumantes, bem como o efeito do tabagismo em não consumidores de álcool. Nessas análises, notou-se que o consumo de álcool tem impacto menor no risco dos tumores de cabeça e pescoço do que aquele induzido pelo tabagismo (Hashibe et al., 2007; Szymanska et al., 2011; Anantharaman et al., 2011; Toporcov et al., 2015). Em geral, estima-se que até 7% desses cânceres estão diretamente relacionados ao consumo exclusivo de bebidas alcoólicas, enquanto 24 a 29% são atribuídos ao consumo específico de tabaco (Hashibe et al., 2007; Anantharaman et al., 2011). No Brasil, Rezende et al. (2019) relataram que 27% de todos os casos de câncer incidentes em 2012 foram atribuíveis a fatores de risco relacionados ao estilo de vida, sendo 3,8% atribuídos (16.609 casos) ao consumo de álcool e 15,5% (67.011 casos) ao de tabaco. Em relação aos sítios tumorais, os autores também observaram que o consumo de tabaco foi o responsável pela maior parte dos casos de câncer de cavidade oral/faringe (49,1%) e dos casos de câncer de laringe (77,1%).

É importante destacar que existe uma relação dose-resposta entre o consumo de álcool e tabaco e o risco de câncer de cavidade oral e de laringe, ou seja, quanto maior a dose consumida e o tempo de exposição, maior será o risco de desenvolver essas neoplasias. De acordo com Rezende et al. (2019), o risco atribuível ao consumo de álcool para esses cânceres é classificado em: baixo com a ingestão de 1 a 12,5 g/dia de álcool (menos de 1 dose), moderado com a ingestão de 12,6 a 49,9 g/dia de álcool (1 a 3,6 doses) e alto com consumo diário superior a 50 g (acima de 3,6 doses). Baan et al. (2007) relataram que o consumo diário de 50 g de álcool aumenta de duas a três vezes o risco de tumores na cavidade oral e laringe, ao passo que, Garcia et al. (2010) observaram um risco quase cinco vezes maior para esses tumores com um consumo diário menor (>30g). Esses resultados são semelhantes aos do nosso estudo, uma vez que o consumo pesado de bebidas alcoólicas (≥ 50 g/dia) aumentou o risco em 2,5 vezes para o CEC de cavidade oral e em duas vezes para o CEC de laringe.

Quanto ao tabaco, os padrões de consumo avaliados contribuíram sobremaneira no risco das neoplasias estudadas. O aumento da carga tabágica (maços/ano) determinou

riscos crescentes que variaram de duas a nove vezes para o CEC de cavidade oral e de sete a 11 vezes para o CEC de laringe. Esses resultados são semelhantes a de outras pesquisas inclusive com a população brasileira (Garcia et al., 2010; Ferreira Antunes et al., 2013; Toporcov et al., 2015; Huang et al., 2017, Kfoury et al., 2018) e nos mostram que não há nível seguro para o consumo de tabaco.

No Brasil, um terço das mortes causadas por 20 tipos de câncer, incluindo o de cavidade oral e de laringe, poderia ser evitado com mudanças no estilo de vida. Tabagismo, consumo de álcool, excesso de peso, falta de atividade física e alimentação não saudável são fatores de risco associados a 114 mil casos (27% do total) e 63 mil mortes (34% do total) por câncer todo ano no país (Rezende et al., 2019). Segundo esses pesquisadores reduções plausíveis na exposição a esses fatores de risco, como de 10% no consumo pesado de álcool e de 30% na prevalência do consumo de tabaco, poderiam ter evitado 4,5% (19,731 casos) e 6,1% (11.480 mortes) de todos os casos e mortes por câncer, respectivamente.

À luz dos resultados encontrados no nosso estudo e na literatura, ressalta-se a importância dos serviços de saúde estarem preparados para identificar precocemente pessoas que fazem uso abusivo de álcool e de tabaco. Nesse sentido, é essencial que os profissionais de saúde abordem questões relacionadas ao consumo excessivo dessas substâncias e promovam práticas preventivas, educativas e terapêuticas a fim de se evitar a manutenção desse padrão de consumo e do desenvolvimento de doenças como o CEC de cavidade oral e de laringe.

Apesar da exposição combinada ao álcool e tabaco ser fundamentalmente responsável pela gênese dos carcinomas da cavidade oral e da laringe, a suscetibilidade genética individual também deve ser considerada um possível fator, podendo manifestar-se mediante falhas no sistema de reparo do DNA, alterações na resposta imunológica do hospedeiro ou por alterações na capacidade de metabolização dos carcinógenos presentes nessas substâncias, por exemplo. Polimorfismos em genes responsáveis pela metabolização do álcool e do tabaco poderiam influenciar a suscetibilidade individual ao câncer, uma vez que podem alterar a expressão e função enzimática, acarretando um aumento ou uma diminuição na ativação e eliminação de carcinógenos. A associação de alguns polimorfismos em genes que codificam as enzimas de metabolização do álcool com o risco de câncer na cavidade oral e na laringe foi objeto do nosso estudo e será discutida a seguir.

Polimorfismos genéticos e o risco de câncer de cavidade oral e laringe

Polimorfismos em enzimas de metabolização do álcool

Os efeitos genotóxicos do acetaldeído são governados, em parte, por polimorfismos presentes nos genes que codificam as enzimas envolvidas na metabolização do álcool - ADH, CYP2E1 e ALDH. O mecanismo pelo qual as variantes influenciam o consumo abusivo ou dependente de álcool e, conseqüentemente, o risco de alguns tipos de tumores como os de cavidade oral e de laringe, envolve a elevação local do nível de acetaldeído que é resultante ou de oxidação mais rápida do etanol pelas variantes mais ativas da ADH (*ADH1B*2*, *ADH1B*3*, *ADH1C*1*) e citocromo P4502E1 (*CYP2E1*c2*) ou de oxidação mais lenta do acetaldeído pela variante ALDH menos ativa.

Os resultados desta investigação mostraram que dos cinco polimorfismos genéticos relacionados com a rápida oxidação do álcool e conseqüente elevação do nível de acetaldeído, somente a variável *ADH1B*2* em heterozigose (*ADH1B*1/*2*) foi associada a um menor risco de desenvolvimento do CEC de cavidade oral e de laringe.

Na prática, os indivíduos portadores do alelo polimórfico *ADH1B*2* convertem mais eficientemente o etanol em acetaldeído, o que resulta em concentrações mais elevadas desse metabólito na corrente sanguínea (Seitz; Becker, 2007). A toxicidade desse metabólito pode levar a um condicionamento negativo, no qual os indivíduos se absterem do álcool para evitar os efeitos desagradáveis provocados pelo seu acúmulo, como rubor facial, sudorese, taquicardia, náuseas e vômitos (Whitfield, 2002; Seitz; Becker, 2007; Setshedi et al., 2010; Li et al., 2011). Assim, a menor exposição dos tecidos-alvos ao etanol e ao acetaldeído e, conseqüentemente, a atenuação dos seus principais mecanismos carcinogênicos parecem diminuir o risco de tumores de cabeça e pescoço em indivíduos portadores de pelo menos uma cópia do alelo polimórfico *ADH1B*2* (Hashibe et al., 2006, 2008; Garcia et al., 2010; Marichalar-Mendia et al., 2011; Bediaga et al., 2015; Zhang et al., 2015; Li et al., 2016). Em 2012, uma metanálise incluindo 11 estudos com populações asiáticas, europeias, norte americanas e latino americanas, relataram uma diminuição de 39% a 85% no risco de cânceres de cabeça e pescoço associada a variante alélica *ADH1B*2* (Chang et al., 2012). Esses riscos foram semelhantes aos observados na presente investigação, uma vez que os indivíduos com o genótipo *ADH1B*1/*2* apresentaram 64% e 67% menos chance de desenvolver o câncer de cavidade oral e de laringe, respectivamente. Além disso, estudos têm demonstrado que o alelo polimórfico *ADH1B*2* é menos frequente em indivíduos dependentes de álcool do que nos controles,

corroborando com a hipótese de que essa variante alélica também estaria associada à proteção contra a dependência alcoólica (Luczak et al., 2006; Li et al., 2011; Bierut et al., 2012).

Em contrapartida, o genótipo homozigoto selvagem *ADH1B**1/*1, que foi o mais frequente na nossa população de estudo, tem sido constantemente relacionado ao consumo abusivo de álcool e ao risco de desenvolver cânceres no trato aerodigestivo em diferentes populações (Yokoyama et al., 2001; Hashibe et al., 2006; Asakage et al., 2007; Hiraki et al., 2007). Em uma meta-análise com 8.539 casos e 15.713 controles os autores evidenciaram aumento de 18 vezes no risco de cânceres do trato aerodigestivo superior entre os consumidores de álcool com o genótipo *ADH1B**1/*1 quando comparado aos abstêmios com o genótipo *ADH1B**2/*2 (Guo et al., 2012). Riscos significativamente maiores de câncer de cavidade oral/orofaringe (OR=4,24) e de hipofaringe (OR=7,21) também foram observados em consumidores moderados a excessivos de álcool e com genótipo *ADH1B**1/*1 (Asakage et al., 2007). Porém, outros estudos não observaram associação entre o genótipo menos ativo da ADH e o risco de câncer de laringe, de esôfago, gástrico e coloretal (Risch et al., 2003; An et al., 2015).

A segunda variante do gene *ADH1B*, o alelo *ADH1B**3, também tem sido considerada como um fator protetor contra o consumo excessivo de álcool e a dependência alcoólica essencialmente em populações afro-americanas, mas a sua associação com o desenvolvimento de cânceres ainda é pouco explorada na literatura (Gelernter et al., 2014; Edenberg; McClintick, 2018). A enzima codificada pelo alelo polimórfico é mais ativa que a enzima expressa pelo genótipo *ADH1B**1/*1. Assim, indivíduos com genótipo heterozigoto (*ADH1B**1/*3) e homozigoto mutado (*ADH1B**3/*3) em princípio acumulam acetaldeído e, consequentemente, apresentam baixa tolerância ao álcool e menor risco de estabelecer a dependência alcoólica (Thomasson et al., 1995; Zaso et al., 2018). Na presente investigação, o genótipo *ADH1B**3/*3 foi ausente nos pacientes com câncer e presente em apenas dois indivíduos do grupo controle (0,5%). A não associação do alelo polimórfico *ADH1B**3 com o risco das neoplasias de cavidade oral e laringe pode ser atribuída a sua baixa frequência na nossa população de estudo, uma vez que ele é encontrado quase que exclusivamente em indivíduos de origem africana (Wall et al., 2016; Edenberg; McClintick, 2018).

O gene *ADH1C* apresenta duas variantes alélicas, o *ADH1C**1 (Ile350Val, rs698) e o *ADH1C**2 (Arg272Gln, rs1693482). De acordo com a literatura, esses polimorfismos são herdados como haplótipo de maneira que o Arg272 é encontrado em conjunto com o

Ile350, enquanto o Gln272 com Val350 (Edenberg; McClintick, 2018), embora em nossas análises 10 amostras (1,2%) das 832 genotipadas não obedeceram a essa regra de herança. Isto posto, a maioria dos estudos que avaliam essas variantes consideram apenas o *ADH1C*1* (rs698) em suas análises, uma vez que os resultados de associação desse SNP serão semelhantes aos do outro SNP (Edenberg; McClintick, 2018).

Nas nossas análises, a variante polimórfica *ADH1C*1* não contribuiu no risco dos carcinomas avaliados. Esses resultados refletem outros encontrados na literatura em relação ao risco de cânceres na região da cabeça e pescoço (Sturgis et al., 2001; Risch et al., 2003; Brennan et al., 2004; Wu et al., 2013). Associações positivas relatadas por outros estudos (Harty et al., 1997; Coutelle et al., 2004; Zintzaras et al., 2006; Li et al., 2012) devem ser vistas com cautela uma vez que a contribuição da enzima ADH1C na modulação do metabolismo do acetaldeído e na propensão ao consumo de álcool, independente da enzima ADH1B, é muito pequena. Além disso, como os *loci* gênicos *ADH1B* e *ADH1C* estão muito próximos, aproximadamente 14 kb de distância, é razoável também observar a herança haplotípica entre os polimorfismos desses *loci*. Assim sendo, a associação alélica pode aparecer não apenas com o polimorfismo genético relacionado à etiopatogenia da doença, mas também com polimorfismos relacionados na sua vizinhança (Edenberg; McClintick, 2018).

É importante ressaltar que a concentração do acetaldeído nos hepatócitos é dependente da razão entre sua síntese via enzimas ADHs e sua degradação pela ação da enzima ALDH. Assim, variantes alélicas *ADH* com alta atividade como a *ADH1B*2* geram grande quantidade de acetaldeído e variantes alélicas *ALDH* com baixa atividade, em especial a *ALDH2*2*, desaceleram sua degradação gerando um desequilíbrio nas concentrações desse metabólito. Em princípio, os indivíduos portadores dos alelos polimórficos *ADH1B*2* e *ALDH2*2* se abstêm do consumo de álcool e, por conseguinte, apresentam um menor risco de desenvolver neoplasias de cavidade oral e de laringe. O presente estudo, no entanto, não avaliou a variante *ALDH2*2* em razão da sua alta frequência em populações asiáticas e de sua incomum presença entre caucasianos e negros que são os indivíduos que compõem nossa amostra. Outras variações nos genes *ADH* e *ALDH* também podem afetar o risco de dependência e consumo abusivo de álcool; no entanto, seus efeitos são muito menores do que aqueles observados com os alelos *ADH1B*2* e *ALDH2*2*.

A enzima microsomal CYP2E1 é considerada a segunda maior via de metabolização do álcool, depois da enzima ADH, principalmente quando existe o

consumo crônico de bebidas alcoólicas. A variante alélica *c2* dessa enzima tem sido associada com uma maior atividade de transcrição, níveis de proteína e atividade enzimática em relação ao alelo selvagem *c1* (Hayashi et al., 1991). A indução da CYP2E1 via etanol, além de produzir o acetaldeído e as espécies reativas de oxigênio (ROS), promove a conversão de pró-carcinógenos como as nitrosaminas, afloxinas, vinilclorados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e hidrozaminas em cancerígenos finais, provavelmente modificando o risco de câncer (Seitz; Wang, 2013, Linhart et al., 2014).

Na presente investigação, a variante *c2* foi frequente em 6% da nossa amostra, enquanto o genótipo homozigoto mutado (*c2/c2*) foi ausente nos pacientes com câncer e presente apenas em dois indivíduos do grupo controle (0,5%). Essas frequências foram semelhantes as encontradas em outros estudos com a população brasileira (Colombo et al., 2004; Rossini et al., 2006; Gattás et al., 2006; Garcia et al., 2010). O alelo *c2* também não foi associado com o risco das neoplasias de cavidade oral e laringe, o que pode ser atribuído a sua baixa frequência na nossa população, uma vez que ele também é encontrado quase que exclusivamente em indivíduos de origem asiática.

Os dados da literatura quanto a associação dos principais polimorfismos do gene *CYP2E1* e as neoplasias de cabeça e pescoço também são inconclusivos. Em recente estudo de metanálise Zhang et al. (2018) relataram que o alelo *c2* não está associado ao risco de câncer de cabeça e pescoço em todos os modelos genéticos avaliados, enquanto em duas outras metanálises (Zhuo, et al., 2016; Yao et al., 2017) os autores observaram associação significativa para o modelo de genótipos, exclusivamente em populações asiáticas.

Não só diferenças individuais nos processos de ativação e eliminação de substâncias metabólicas, mas também no sistema de reparo do DNA podem alterar a condição herdada e influenciar o risco para o desenvolvimento de câncer de cavidade oral e laringe. O sistema de reparo do DNA dispõe de elaborados mecanismos que garantem a integridade do genoma e remove bases nucleotídicas inapropriadamente criadas ou alteradas por agentes mutagênicos como o acetaldeído, trocando-as por bases preexistentes, sendo também capazes de manter a integridade da dupla hélice que pode ter sido comprometida. O objetivo final desse sistema, composto por centenas de genes e proteínas diferentes é o de evitar a transmissão do dano genotóxico às células filhas após a replicação do material genético. No entanto, o DNA nuclear é altamente suscetível a carcinógenos, incluindo aqueles presentes no álcool e tabaco, de forma que variações nos genes que codificam diferentes enzimas de reparo podem propiciar a geração de células

transformadas que escapam dos processos homeostáticos normais, tornando-se capazes de proliferação sem controle. Consequentemente, tais diferenças funcionais também podem modular a suscetibilidade individual na carcinogênese oral e de laringe. Algumas das principais variações presentes em genes que codificam enzimas envolvidas em vias de reparo do DNA também estão sob investigação pelo nosso grupo de estudo.

Polimorfismos em genes de dependência do álcool e tabaco

Fatores genéticos, ambientais, culturais e psicológicos parecem modular o comportamento abusivo e dependente de substâncias como o álcool e o tabaco. Estima-se que os fatores genéticos representam 40 a 60% da variabilidade observada na dependência alcoólica e que a herdabilidade do alcoolismo, pelo menos em parte, é compartilhada com a do tabagismo, o que explicaria a forte associação entre os dois comportamentos (True et al., 1999; Rietschel; Treutlein, 2013). Os genes envolvidos no sistema de reforço e recompensa são frequentemente considerados como candidatos em estudos de associação com a dependência, particularmente nas vias dopaminérgicas que são conhecidas por desempenhar um papel determinante no comportamento abusivo de drogas. Polimorfismos presentes nesses genes parecem influenciar a síntese, a liberação e a ligação da dopamina aos seus receptores, uma vez que esta é o principal neurotransmissor envolvido neste sistema. Entre as variantes mais frequentemente estudadas destacam-se: *OPRM1* (rs 1799971), *OPRM1* (rs 1799972), *DRD2* (rs 1800497), *SLC6A4* (indel/44pb), *CHRNA3* (rs578776) e *CHRNA5* (rs16969968).

As variantes alélicas A118G (Asn/Asp - rs1799971) e o C17T (Ala/Val - rs1799972) do receptor μ -opióide (*OPRM1*) parecem contribuir no risco do consumo abusivo e dependente de drogas via aumento da ligação desse receptor com β -encefalinas endógenas e consequente liberação de dopamina na área tegumentar ventral e núcleo accumbens (Mague; Blendy, 2010; Miranda et al., 2010; Setiawan et al., 2012). A hipótese de que as pessoas que possuem o receptor contendo o resíduo polimórfico Asp (denominado de alelo G) são mais suscetíveis à dependência do álcool e do tabaco sobreveio do primeiro estudo funcional realizado por Bond et al. (1998), que demonstraram que o receptor codificado pelo alelo G tem três vezes mais afinidade pela β -endorfina que o receptor contendo alelo A. Nesse sentido, Bart et al. (2005) constataram que indivíduos portadores do alelo G apresentaram maior prevalência de dependência alcoólica (23,1%) do que os controles (13,5%) e que o risco atribuível ao genótipo foi de 11,1%. Porém,

outros estudos não relataram qualquer contribuição significativa do alelo polimórfico na dependência alcoólica e da nicotina (Bergen et al., 1997; Kim et al., 2004; Loh et al., 2004; Zhang H et al., 2006; Zhang L et al., 2006; Kong et al., 2017). Em relação ao SNP C17T, Crystal et al. (2012) relataram uma associação significativa entre o genótipo homozigoto mutado (TT) e o risco de uso de álcool, cocaína e tabaco em mulheres afro-americanas, enquanto outros trabalhos não demonstraram essa relação (Berrettini et al., 1997; Rommelspacher et al., 2001; Comptom et al., 2003; Crowley et al., 2003).

Entretanto, poucos estudos têm relacionado esses polimorfismos com o risco de desenvolvimento de tumores (Wang S et al., 2013; Cieślińska et al., 2015; Oh et al., 2016; Xu et al., 2017). Aparentemente, esse é o primeiro trabalho que relata a associação dessas duas variantes alélicas no risco de neoplasias na região da cabeça e pescoço. Nossos resultados mostraram que os pacientes com genótipo heterozigoto para o alelo G e para o alelo T apresentaram riscos 1,73 e 1,89 vezes maiores de desenvolver o câncer de laringe quando comparado aos indivíduos com genótipo homozigoto selvagem. Riscos semelhantes também permaneceram para o modelo genético dominante. Considerando que as presenças do alelo G e alelo T têm sido relacionadas por alguns estudos com o consumo abusivo e dependente do álcool e tabaco, pode-se, em tese, inferir que a maior frequência dessas variantes alélicas nos pacientes aumentou o risco para o câncer de laringe.

Contudo, esses resultados devem ser vistos com ponderação já que ambos os polimorfismos analisados não obedeceram ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na amostra avaliada, logo as associações encontradas podem não expressar a realidade. Em um estudo anterior com a população brasileira (Daher et al., 2013) o alelo G também não obedeceu ao equilíbrio, bem como apresentou frequências alélica e genotípica semelhantes as encontradas pelo nosso estudo. O EHW pressupõe que as frequências genotípicas e alélicas de uma amostra permanecem constantes de geração para geração e existe uma distribuição estável entre os homozigotos e os heterozigotos. O Equilíbrio é uma consequência do cruzamento aleatório dentro de uma população, na ausência de mutação, seleção natural e migração, em que os alelos maternos e paternos são herdados independentemente (Lunetta, 2008). Desvios no EHW podem ser decorrentes de vários fatores, como erros de genotipagem, casamento não aleatório, seleção natural, estratificação populacional ou acaso (Lewis; Knight, 2012). Além disso, devemos considerar a heterogeneidade genética presente na população brasileira, que apresenta grande miscigenação e pode ser também uma possível explicação para os desvios.

Em relação aos polimorfismos nos genes que codificam os receptores de dopamina, o SNP *TaqIA* (alelo *A1*, rs1800497) localizado no gene do receptor *DRD2* parece ser o mais estudado no que concerne à dependência de drogas, como o álcool e o tabaco. Indivíduos com pelo menos um alelo *A1* parecem ter até 40% menos receptores *DRD2* em relação aos indivíduos com genótipo homozigoto selvagem (*A2/A2*) e, por consequência, um excesso de dopamina intracelular após os estímulos do álcool e tabaco, potencializando a sensação de prazer e euforia (Noble et al., 2000; Bowirrat; Oscar-Berman, 2005). Assim, surgiu a hipótese de que as pessoas que possuem o alelo *A1* são mais suscetíveis à dependência do álcool e do tabaco (Prasad et al., 2010).

Em 1990, Blum et al. foram os primeiros a investigar e constatar uma associação positiva entre o polimorfismo *TaqIA* e o alcoolismo. Neste estudo, os autores observaram um risco oito vezes maior de dependência alcoólica em indivíduos portadores do alelo *A1*. Desde então, resultados semelhantes (Munafò et al., 2007; Smith et al., 2008; Voisey et al., 2012; Wang F et al., 2013) e também contraditórios (Gelernter et al. 1991; Buckland, 2001; Ball, 2004; Vasconcelos et al., 2015; Ragia et al., 2016) foram publicados por uma série de estudos tanto para o álcool quanto para o tabaco. No Brasil, embora dois estudos (Bau et al., 2000; Vasconcelos et al., 2015) tenham identificado uma maior prevalência do alelo *A1* em indivíduos com dependência alcoólica (27% e 39%) em relação aos controles (21% e 31,6%), esse alelo não modificou o risco para o alcoolismo. No tocante as neoplasias de cabeça e pescoço, esse também é o primeiro estudo que avalia a associação desse polimorfismo com o risco de tumores da cavidade oral e laringe. Embora o alelo *A1* tenha sido frequente em nossa amostra (28%) e os hábitos de beber e fumar tenham contribuído no risco das neoplasias estudadas, nenhuma diferença significativa foi encontrada ao comparar as frequências genotípicas entre os controles e os pacientes com CEC de cavidade oral ou laringe.

Em referência ao polimorfismo caracterizado pela inserção/deleção de 44pb na região promotora do gene transportador de serotonina (*SLC6A4/5-HTT*), a variante alélica *S* também não modificou o risco do câncer de cavidade oral e de laringe. Em outra amostra brasileira, esse polimorfismo também não foi associado com o desenvolvimento de carcinoma oral e com o hábito de fumar e beber (Abdo et al., 2012). Os estudos caso-controle de associação desse polimorfismo com a dependência de álcool e tabaco são também inconclusivos. No estudo de metanálise de Villalba et al. (2015) incluindo 4.388 indivíduos dependentes de álcool e 4.497 controles, os autores não observaram

associações significativas entre o polimorfismo do promotor *SLC6A4* e a dependência alcoólica para os três modelos genéticos avaliados.

Considerando a importância do tabaco na gênese dos carcinomas da cavidade oral e laringe, o presente estudo incluiu a análise de dois polimorfismos que parecem estar envolvidos em diferentes comportamentos associados ao seu consumo, como idade de início, quantidade e dependência, além de doenças relacionadas ao tabagismo. O polimorfismo *CHRNA5* (rs16969968, G>A) tem sido relacionado ao uso precoce, ao maior consumo de cigarros por dia e também a maiores riscos de câncer de pulmão e de cabeça e pescoço (Lips et al., 2010; Fowler; Kenny, 2014). Já a variante alélica *CHRNA3* (rs578776, C>T) tem sido associada de forma contraditória com a dependência, o padrão de consumo do tabaco e o risco de neoplasias (Stevens et al., 2008; Stephens et al., 2013; Anantharaman et al., 2014). De acordo com Stevens et al. (2008), os genótipos heterozigoto (GA) e homozigoto mutado (AA) do gene *CHRNA5* foram significativamente associados (OR = 1,45 e OR = 1,77) a um maior maior número de cigarros fumados por dia (>30), enquanto a presença do alelo polimórfico *CHRNA3* foi relacionada a um menor consumo (OR = 0,72).

Em relação as neoplasias, essas variantes têm sido fortemente associadas ao risco de câncer de pulmão (Thorgeirsson et al., 2008; Galvan; Dragani, 2010; Saccone et al., 2010; Ji et al., 2015), mas a contribuição delas na carcinogênese da cavidade oral e da laringe é ainda pouco explorada na literatura (Lips et al., 2010, Chen et al., 2011; Anantharaman et al., 2014). Na presente investigação, as variantes alélicas *CHRNA5* (rs16969968) e *CHRNA3* (rs578776) não contribuíram no risco do CEC de cavidade oral e laringe. Além disso, as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *CHRNA5* não estavam em EWH ($X^2 = 3,90$, $p = 0,048$). Em um estudo caso-controle com 17.300 indivíduos, o alelo polimórfico *CHRNA5* elevou significativamente o risco de câncer pulmão (OR = 1,30), mas apresentou um risco discreto (OR = 1,08) para as neoplasias de cavidade oral e laringe (Lips et al., 2010). Já Chen et al. (2011) observaram uma associação entre a variante *CHRNA5* e o risco de cânceres no trato aerodigestivo superior em mulheres, particularmente para a laringe (OR = 1,24, $p = 0,003$) mas não em homens, enquanto a variante alélica *CHRNA3* foi associada a um risco 16% menor de câncer oral (Anantharaman et al., 2014).

Existem diversos estudos na literatura que relacionam os polimorfismos genéticos *OPRM1*, *DRD2*, *SLC6A4*, *CHRNA5* e *CHRNA3* com o consumo abusivo e dependente de drogas como o álcool e o tabaco. No entanto, os artigos que investigaram a contribuição

desses polimorfismos para a carcinogênese de cavidade oral e de laringe são escassos. Isto mostra a necessidade de estudos adicionais em populações de diferentes origens étnicas, uma vez que uma associação genética, embora válida para uma população étnica específica, pode não ser relevante para indivíduos de outra etnicidade. Além disso, deve-se considerar a análise funcional de cada SNP com ensaios *in vitro* e *in vivo* para determinar se aquela variante genética exerce seu efeito na função e expressão do gene, mesmo que ela seja raramente observada naquela determinada população. Assim, quanto maior o número de estudos na área de epidemiologia molecular, em diferentes populações, com informações seguras e uniformemente obtidas, maiores as chances de identificarmos associações genuínas entre os polimorfismos genéticos e o risco associado.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora nosso estudo traga informações importantes no que diz respeito ao papel de variantes genéticas no risco do desenvolvimento do CEC de cavidade oral e laringe, algumas considerações precisam ser pontuadas, levando em conta os vieses e limitações para que os nossos resultados possam ser melhor interpretados.

Primeiro, quando investigamos hábitos e perfis de consumo de álcool e tabaco da população de um estudo devemos considerar a possibilidade de interferência na fidedignidade das respostas autorreferidas. A esse respeito, é razoável afirmar que as questões sobre o uso dessas substâncias estão sujeitas a diversos vieses, sobretudo àqueles de memória e de resposta que podem subestimar a frequência e a quantidade real do consumo, levando a erros de classificação dos indivíduos e minimizando a magnitude das associações. Além disso, grande parte das comparações entre os estudos devem ser relativizadas por conta de diferenças metodológicas, como as unidades de medidas adotadas, categorias de consumo e covariáveis ajustadas em modelos multivariados. Deve-se ainda considerar que essas substâncias são produzidas, comercializadas e consumidas de maneira diferente entre os países e que contêm diferentes concentrações de carcinógenos, conservantes e impurezas que podem também modificar o risco para a doença.

Segundo, vale lembrar que a penetrância e a expressividade de cada genótipo é geralmente reduzida tendo em vista que o câncer é uma doença complexa, resultante da combinação entre fatores ambientais, de estilo de vida e genéticos. Dessa forma, o estudo dos polimorfismos genéticos deve ser pensado dentro de um contexto mais amplo e interativo, no qual os genes não atuam sozinhos e nem possuem funções exclusivas, mas sim fazem parte de sistemas complexos, interagindo entre si direta ou indiretamente dentro de uma mesma via ou vias biológicas distintas.

Terceiro, é importante ressaltar também que as discrepâncias encontradas entre os nossos resultados e os de outros estudos caso-controle podem ser decorrentes de alguns fatores, entre eles: estratificação populacional e heterogeneidade genética entre as populações estudadas; diferenças no tamanho das amostras que estão sendo comparadas; exposições a diversos carcinógenos; interações gene-gene e gene-ambiente; diferentes variáveis utilizadas como ajustes nos modelos multivariados; desequilíbrio de ligação entre os SNPs selecionados no estudo e outras variantes funcionais, além de diferentes técnicas utilizadas na identificação dos genótipos.

A miscigenação e heterogeneidade genética da população brasileira também deve ser ponderada em estudos de associação. Uma possível abordagem para minimizar ou eliminar esse viés é a investigação de marcadores de ancestralidade genética, o que não foi realizada pela presente pesquisa. Outra estratégia para tentar compreender o efeito das variações genéticas na suscetibilidade do câncer é a inclusão de análises haplotípicas, que muitas vezes podem ser mais informativas do que aquelas envolvendo polimorfismos individuais. Alguns resultados significativos observados em estudos de associação podem realmente representar um efeito funcional da variante sobre o fenótipo avaliado, mas podem também ser associações indiretas causadas pelo desequilíbrio de ligação com um SNP verdadeiramente causal.

Entretanto, mesmo com as limitações mencionadas e que novas questões tenham surgido, não podemos desconsiderar a validade e consistência dos resultados obtidos pela nossa pesquisa. Devemos estar sempre atentos à plausibilidade biológica das associações observadas e à necessidade de replicação para validar o envolvimento dos polimorfismos genéticos com a doença em questão, utilizando números amostrais maiores e populações étnicas distintas. No mesmo sentido, deve-se considerar a análise funcional de cada SNP para determinar se aquela variante genética exerce seu efeito na função e expressão do gene, mesmo que ela seja raramente observada em uma determinada população.

Por fim, nossos resultados nos fornecem evidências sobre a importância do consumo de álcool e tabaco e dos genes avaliados no contexto da carcinogênese de cavidade oral e de laringe e também nos auxilia a planejar e direcionar melhor novos estudos nessa temática.

8 CONCLUSÕES

1. O hábito de beber aumentou em praticamente duas vezes o risco de CEC de cavidade oral entre os pacientes que se declararam bebedores atuais quando comparados aos indivíduos que nunca beberam, enquanto a ingestão pesada de bebidas alcoólicas elevou o risco de desenvolver tanto o CEC de cavidade oral (duas vezes e meia) quanto o CEC de laringe (duas vezes). Os outros dois padrões de consumo de álcool avaliados não modificaram o risco das neoplasias estudadas.

2. O hábito de fumar aumentou em praticamente oito vezes o risco de desenvolver neoplasias tanto na cavidade oral quanto na laringe entre os pacientes que declararam ainda fumar no momento da entrevista quando comparados aos indivíduos que nunca fumaram, enquanto aqueles que se declararam ex-fumantes apresentaram riscos menores de desenvolver CEC de cavidade oral (OR = 2,72) e de laringe (OR = 4,17). Quanto ao padrão de consumo, o aumento da carga tabágica (maços/ano) determinou riscos crescentes que variaram de duas a nove vezes para o CEC de cavidade oral e de sete a 11 vezes para o CEC de laringe.

3. O *ADH1B**2 (rs 1229984) foi o único dos cinco polimorfismos genéticos de metabolização do álcool que foi associado a riscos menores (64% e 67%) de desenvolvimento do CEC de cavidade oral e de laringe, tanto no modelo de genótipos quanto no modelo dominante.

4. Dos quatro polimorfismos genéticos associados com o consumo abusivo e dependente do álcool e tabaco, somente as duas variantes alélicas no gene do receptor *OPRM1* aumentaram o risco do CEC de laringe em 1,73 (alelo G, rs 1799971) e cerca de duas vezes (alelo T, rs 1799972) para os modelos genéticos avaliados.

5. Apesar do tabagismo ter contribuído no risco das neoplasias estudadas, os polimorfismos *CHRNA5* (rs16969968) e *CHRNA3* (rs578776) associados exclusivamente com o consumo abusivo e dependente do tabaco não modificaram a suscetibilidade ao CEC de cavidade oral e de laringe para os dois modelos genéticos.

6. Em síntese, nossos resultados demonstram a contribuição e a importância de fatores de riscos conhecidos, como o fumo e o consumo excessivo de bebidas alcoólicas no desenvolvimento dessas neoplasias. Quanto aos polimorfismos genéticos, nossos resultados podem ser aceitos como sugestivos mas não como determinantes na suscetibilidade ao CEC de cavidade oral e de laringe. Esses polimorfismos podem ser informativos para os profissionais de saúde nas condutas preventivas de pacientes de risco, sobretudo aqueles com abuso no consumo de tabaco e álcool.

9 ANEXOS

Anexo A – Questionário

QUESTIONÁRIO SOBRE HÁBITOS DE VIDA

Data: ____/____/____. Reg. Hosp.: ____ Reg. Lab.: ____ Reg. Proj.: ____

Nome: _____

Endereço: _____ n.º: ____ apto: ____

Bairro: _____ Cidade: _____ U.F.: ____

CEP: _____ Telefone: (____) _____

Entrevistador: _____

INFORMAÇÕES GERAIS

A1 Estado: (1) Caso (2) Controle

A2 Data de nascimento: ____/____/____

A3 Clínica do hospital:

(1) Clínica Médica	(7) Dermatologia
(2) Cirurgia	(8) Oftalmologia
(3) Gin / Obst	(9) Odontologia
(4) Ortopedia	(10) Radioterapia
(5) Oncologia	(11) Ambulatório
(6) Otorrino	(12) Outro

A4 Diagnóstico principal da baixa hospitalar: _____

A5 Data da admissão hospitalar ____/____/____

A6 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino

A7 Idade em anos completos _____

A8 Grupo étnico?

(1) branco (2) mulato (3) negro (4) índio (5) oriental

Cor pele pai: _____ Cor pele mãe: _____

A9 Qual a cidade onde mora?

A10 Há quanto tempo mora nesta cidade?

A11 Em qual cidade o(a) Sr.(a) nasceu?

A12 O(a) Sr.(a) frequentou a escola? (1) sim (2) não

A13 Qual o último ano completo que o(a) Sr.(a) terminou na escola?

A14 Até qual grau o(a) Sr.(a) estudou?

HÁBITO DE FUMAR

B1 O(a) Sr.(a) fuma ou já fumou em média 1 cigarro ou charuto ou cachimbo, diariamente, pelo menos por 1 ano?

(1) sim ainda fuma (2) nunca fumou (3) somente no passado

B2 O(a) Sr.(a) fuma ou já fumou cigarro? (1) sim (2) não

Idade início _____ idade que parou _____ tipo cigarro _____ n°/dia _____

Idade início _____ idade que parou _____ tipo cigarro _____ n°/dia _____

Idade início _____ idade que parou _____ tipo cigarro _____ n°/dia _____

Tipo 1: manufaturado, com filtro

Tipo 2: manufaturado, sem filtro

Tipo 3: enroladinho de papel

Tipo 4: enroladinho de palha

B3 O(a) Sr.(a) fuma ou já fumou charuto? (1) sim (2) não

Idade início _____ idade que parou _____ marca _____ n°/dia _____

B4 O(a) Sr.(a) fuma ou já fumou cachimbo? (1) sim (2) não

Idade início _____ idade que parou _____ marca _____ n°/dia _____

B5 O(a) Sr.(a) fuma ou já fumou maconha, pelo menos uma vez por semana por pelo menos 6 meses? (1) sim (2) não

Idade início _____ idade que parou _____ n°/semana _____

QUESTÕES PARA NÃO FUMANTES

B6 O(a) Sr. (a) já esteve casado (ou vivendo junto) com um(a) fumante?

(1) sim (2) não

B7 O(a) Sr.(a) trabalhou em lugar fechado onde as pessoas fumassem?

(1) sim (2) não

HÁBITOS ALIMENTARES

C1 Qual a frequência em que o(a) Sr.(a) consome ou consumia esses alimentos?

Tipo de alimento	Número vezes	Semana	Mês
Carne vermelha			
Carne branca			
Leite e/ou derivados			
Verduras			
Legumes			
Frutas frescas			
Bolos ou doces			

C2 Nos últimos dois anos o(a) Sr.(a) tem tomado vitaminas?

(1) sim (2) não (3) não sabe

C3 Com que frequência o(a) Sr.(a) toma estas vitaminas?

(1) diariamente (2) 1x semana (3) 1 x mês (4) ocasionalmente (5) nunca

C4 Qual o seu peso hoje? _____Kg

C5 Perdeu peso ultimamente? (1) sim (2) não Quantos? ____ Kg

C6 O (a) Sr.(a) usa fogão a lenha para cozinhar alimentos? (1) sim (2) não

HÁBITOS DE BEBIDA

D1 O(a) Sr.(a) toma bebidas alcoólicas pelo menos 1 vez por mês?

(1) sim (2) não (3) só no passado

Unidade:

(1) copo peq. - 50mL (3) copo gnd. -500mL (5) garrafa -700 - 750mL

(2) copo méd. - 100mL (4) 1/2 ou garrafa peq. ou lata 330mL (6) garrafa -1 L

Por: (1) dia (2) semana (3) mês

Bebida	1 sim/ 2-nao	Idade início	Idade que parou	Unidade	Quantas unidades consome	Por
Cerveja						
Vinho						
Cachaça, vodca,rum						
Licores						

INFORMACÕES SOBRE SAÚDE

QUEIXAS GERAIS

E1 O(a) Sr. (a) tem algum problema de saúde? ☐ Não ☐ Sim

Especifique:

E2 Possui casos de câncer na família?

☐ Não ☐ Sim ☐ Não sei

Grau de parentesco

Tipo de Câncer

<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>

HISTÓRIA OCUPACIONAL

F1 Qual sua profissão atual?

F2 Há quanto tempo o(a) Sr(a) trabalha com essa atividade?

F3 O(a) Sr.(a) poderia descrever suas atividades específicas (o que fazia ou como fazia)?

F4 Qual sua profissão anterior?

Anexo B – Aprovações dos Comitês de Ética em Pesquisa das instituições envolvidas

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09.04.03, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **115/03**, intitulado: "Avaliação de polimorfismos genéticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço" apresentado pela ÁREA DE FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

1. Pesquisador(a) Responsável: **PROFA. DRA. GILKA JORGE FÍGARO GATTÁS**

2. Pesquisador(a) Executante: **DRA. MARIA SALETE SIRAQUE GARCEZ**

CAPPesq, 09 de Abril de 2003.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

inscreva-se à CPG-FMUSP

devidas providências.

1104103

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

n.º pontou

a. Mana Miltz Brentani
coordenadora do Curso de
atualização do programa
Patologia Experimental

RECEBIDO SPG

ASS:

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 24.03.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **148/05**, intitulado: "Marcadores moleculares em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cavidade bucal" apresentado pelo Departamento de **MEDICINA LEGAL, ÉTICA MÉDICA E MEDICINA SOCIAL E DO TRABALHO**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Dra. Gilka Jorge Figaro Gattás**

CAPPesq, 24 de Março de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

COMPLEXO HOSPITALAR HELIÓPOLIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

São Paulo, 15 de fevereiro de 2005.

Ao

Dr. Otávio Alberto Curioni.

Informamos que o projeto de pesquisa: **"Marcadores moleculares em pacientes portadores de carcinoma epidermóide da cavidade bucal"**, registrado neste CEP sob nº374, tendo como relator Dr. Marcos Brasilino de Carvalho foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa no dia 15/02/2005.

Atenciosamente,

Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
Coordenador

MINISTERIO DA SAUDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa: MACULAS MOLECULARES EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ADEQA PESCOÇO		01/2000	
2. Área do Conhecimento (Ver relação no verso) MEDICINA		3. Código: 4. 01	4. Nível: (Só áreas do conhecimento 2 a 4) T
5. Área(s) Temática(s) Especial (s)		6. Código(s):	7. Fase: (Só área temática 3) I () II () III () IV ()
8. Unitermos:			
SUJEITOS DA PESQUISA			
9. Número de sujeitos		10. Grupos Especiais: <18 anos () Portador de Deficiência Mental () Embrião/Feto () Relação de Dependência (Estudantes, Militares, Presidiários, etc) () Outros () Não se aplica ()	
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
11. Nome: OTAVIO ALBERTO CURIONI			
12. Identidade: 16558433	13. CPF: 12237423857	19. Endereço (Rua, nº): CAPO XAVIER L7C 9ª Andar. CEP 04231030	
14. Nacionalidade: BRASIL	15. Profissão: PESSO	20. CEP: 04231030	21. Cidade: SÃO PAULO 22. U.F.: SP
16. Maior Titulação: DESTRE	17. Cargo: PESSO	23. Fone: 619145576	24. Fax: 09266743
18. Instituição a que pertence: HOSPITAL VALE DO POU		25. E-mail: JOSR.CURIONI@adl.com	
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Data: 31/01/05 <i>Otavio Alberto Curioni</i> Assinatura			
INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO			
26. Nome: HOSPITAL VALE DO POU		29. Endereço (Rua, nº): CAPO XAVIER L7C	
27. Unidade/Orgão: Serviço Cirúrgico de Cabeça e Pescoço		30. CEP: 04231030	31. Cidade: SÃO PAULO 32. U.F.: SP
28. Participação Estrangeira: Sim () Não (X)		33. Fone: 09266743	34. Fax:
35. Projeto Multicêntrico: Sim () Não (X) Nacional (X) Internacional () (Anexar a lista de todos os Centros Participantes no Brasil)			
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução Nome: _____ Cargo: _____ Data: 23/01/05 <i>[Assinatura]</i> Assinatura			
PATROCINADOR			
36. Nome:		39. Endereço	
37. Responsável:		40. CEP:	41. Cidade:
38. Cargo/Função:		43. Fone:	44. Fax:
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP			
45. Data de Entrada: 11/02/05	46. Registro no CEP: 379	47. Conclusão: Aprovado (X) Data: 15/2/05	48. Não Aprovado () Data: _____
49. Relatório(s) do Pesquisador responsável previsto(s) para: _____ Data: _____			
Encaminhamento a CONEP: 50. Os dados acima para registro () 51. O projeto para apreciação (X) 52. Data: _____			
54. Nº Expediente		53. Coordenador: <i>[Assinatura]</i> Assinatura	
55. Processo:		55. Data Recebimento:	
56. Observações:		57. Registro na CONEP:

COMPLEXO HOSPITALAR HELIÓPOLIS

N.º do CEP: 374.	Data de entrada: 01/02/2005
Data de aprovação: 15/02/2005.	Data de encerramento:
Autor: Dr. Otávio Alberto Curioni.	
Relator: Dr. Marcos Brasilino de Carvalho.	
Título: "Marcadores moleculares em pacientes portadores de carcinoma epidermóide da cavidade bucal".	
Obs:	

Rua Cônego Xavier, 276 – Sacomã – São Paulo – PS-Externo – CEP 04231-030 Fone: 6215-1001/274-
7600 ramal 105 – E-mail: cep@hospitalheliopolis.org.br e Site www.hospitalheliopolis.org.br

Rua Cônego Xavier, 276 – Sacomã – São Paulo – PS-Externa – CEP 04231-030 Fone: 6215-1001/274-
7600 ramal 105 – E-mail: cep@hospitalheliopolis.org.br e Site www.hospitalheliopolis.org.br

Anexo C - Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

ESTUDO INTERNACIONAL SOBRE AMBIENTE, VÍRUS E DOENÇAS DA CAVIDADE ORAL E LARINGE

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do paciente:
Documento de identidade: Sexo ☒ M... ☐ F....
Data de nascimento:/...../.....
Endereço:
Bairro: Cidade: Estado:
CEP: Telefone: (.....)
2. Responsável legal:
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):
Documento de identidade: Sexo ☐ M... ☐ F....
Data de nascimento:/...../.....
Endereço:
Bairro: Cidade: Estado:
CEP: Telefone: (.....)

II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. Título do protocolo de pesquisa: "Estudo internacional sobre ambiente, vírus e doenças da cavidade oral e laringe".

Pesquisadores responsáveis:
José Eluf Neto, CREMESP: 22183, Professor Doutor, Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da USP.
Victor Wunsch Filho, CREMESP: 28777, Professor Doutor, Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP.
2. Avaliação do risco da pesquisa:
Os procedimentos da pesquisa apresentam risco mínimo de ocorrência de algum dano imediato ou tardio para o participante.
3. Duração da pesquisa: agosto de 1998 a julho de 2001.

III. REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA

Nós estamos conduzindo um estudo no Brasil e em outros países para investigar se certas características e hábitos dos homens e das mulheres estão relacionados com algumas doenças. Para isso, estamos solicitando aos pacientes neste e em outros hospitais para participarem da pesquisa.

A sua participação na pesquisa inclui: a) responder a perguntas de um questionário; b) o exame da boca e coleta de algumas células com uma escova de dentes e c) a coleta de uma amostra de sangue de 15 ml por punção venosa. Esclarecemos que estes procedimentos podem lhe trazer algum desconforto.

Dependendo da sua doença e, somente se isto fizer parte dos procedimentos habituais e necessários de diagnóstico ou de tratamento de sua doença, serão coletadas pelo seu médico assistente amostras de tecido da parte doente e isto fará parte dos dados da pesquisa.

IV. ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

Todas as informações prestadas durante a entrevista serão de caráter confidencial e as informações colhidas serão utilizadas somente para fins científicos descritos no protocolo desta pesquisa, sem qualquer identificação pessoal.

Qualquer provável benefício do estudo para o bem-estar da população depende da exatidão de suas respostas. Portanto, se o (a) Sr.(a) não entender alguma das questões, por favor solicite todos os esclarecimentos que julgar necessário sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa ou qualquer outra dúvida.

O(A) Sr.(a) tem a liberdade de não participar do estudo e retirar seu consentimento a qualquer momento deixando de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade de sua assistência.

Para quaisquer danos à saúde decorrentes dos procedimentos necessários para a pesquisa o (coleta de sangue e de células da mucosa oral) o(a) Sr.(a) será ressarcido pela pesquisa em compensação pelas despesas exclusivas decorrentes destes danos.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

Esther M. O. A. de Camargo Andrade. End.: Rua Vito Bovino, 477
Fone/fax: (011) 5632-0675

Sérgio Guerra Sartor. End.: Av. Caminho do Mar, 2131, apt. 36
Fone: (011) 7764-2020

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo,/...../.....

(assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal)

(assinatura do pesquisador)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº..... SEXO: M () F ()
DATA NASCIMENTO:/...../.....
Endereço..... Nº.....
Complemento:BAIRRO:.....
CIDADE
CEP:..... TELEFONE:DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M() F()
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº..... APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Avaliação de Polimorfismos Genéticos em Pacientes com Câncer de Cabeça e Pescoço
2. PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:
- Gilka Jorge Figaro Gattás, CRBM: 2654. Professora Doutora, Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do trabalho -Faculdade de Medicina da USP.
- Marcos Brasilino de Carvalho, CREMESP: 17212. Diretor das Clínicas Cirúrgicas - Hospital Heliópolis- - São Paulo, SP
- José Eluf Neto, CREMESP: 22183. Professor Doutor, Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da USP.
- Víctor Wünsch Filho, CREMESP: 28777, Professor Doutor, Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP.
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
SEM RISCO	x RISCO MÍNIMO	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	
- Os procedimentos da pesquisa apresentam risco mínimo de ocorrência de algum dano imediato ou tardio para o participante.
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : Janeiro de 2003 a Janeiro de 2006

HOSPITAL DAS CLINICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº.....SEXO: M () F ()
DATA NASCIMENTO: / /
Endereço.....Nº.....
Complemento:.....
BAIRRO:.....
CIDADE:.....
CEP:..... TELEFONE: DDD ()

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M () F ()
DATA DE NASCIMENTO / /
ENDEREÇO:.....Nº.....APTO: ".....
BAIRRO:.....CIDADE:.....
CEP:.....TELEFONE: DDD ()

II- DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Polimorfismos Genéticos e o risco de câncer de cabeça e pescoço

2. PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Gilka Jorge Fígaro Gattás, CRBM: 2654. Professora Doutora, Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho - Faculdade de Medicina da USP.

Marcos Brasilino de Carvalho, CREMESP: 17212. Diretor das Clínicas Cirúrgicas - Hospital Heliópolis - São Paulo, SP

Dr. Otávio Alberto Curioni - Hospital Heliópolis - São Paulo, SP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	☒ RISCO MÍNIMO	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	

Os procedimentos da pesquisa apresentam risco mínimo de ocorrência de algum dano imediato ou tardio para o participante.

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 01 Agosto 2006 a Agosto de 2008

**III- REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE
OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:**

Este estudo está sendo realizado na Faculdade de Medicina da USP, em colaboração com o Hospital Heliópolis, com o objetivo de avaliar se certas características biológicas e hábitos dos homens e das mulheres estão relacionados com algumas doenças. Para isso estamos solicitando sua participação voluntária. Esta participação inclui:

- a) Responder a um questionário com questões sobre as atividades desenvolvidas no trabalho e no lar, hábitos de vida, condições de trabalho, de saúde e outras.
- b) Coleta de uma amostra de sangue, 10 ml, por punção venosa. Este procedimento poderá trazer-lhe algum desconforto, mas servirá para avaliar as possíveis alterações genéticas.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Qualquer provável benefício do estudo para o bem-estar da população depende da exatidão de suas respostas. Portanto se o(a) Sr.(a) não entender alguma das questões, por favor solicite todos os esclarecimentos que julgar necessário sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa ou qualquer outra dúvida.
2. O(A) Sr.(a) tem a liberdade de não participar do estudo e retirar seu consentimento a qualquer momento deixando de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade de sua assistência oferecida no Hospital Heliópolis.
3. Todas as informações dadas durante a entrevista serão de caráter confidencial e, após colhidas, serão utilizadas somente para os fins científicos descritos no protocolo desta pesquisa, sem qualquer identificação pessoal.
4. Para quaisquer danos à saúde decorrentes dos procedimentos necessários para a pesquisa, como por exemplo a coleta de sangue, você poderá contar com o atendimento no Hospital Heliópolis.
5. Caso seja necessário, você será ressarcido nas despesas decorrentes destes danos.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

Marcos Brasilino de Carvalho. End.: Cônego Xavier, 276

Fone: (11) 274-7600 - Hospital Heliópolis - São Paulo, SP

Gilka Jorge Fígaro Gattás. End.: Rua Teodoro Sampaio, 115

Fone: (11) 3085-9677 - Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho. Faculdade de Medicina da USP.

VI - CONSENTIMENTO PÓS ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo,de.....de.....

(assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal)

(assinatura do pesquisador (carimbo ou nome Legível))

10 REFERÊNCIAS

Abdo EN, Correia-Silva Jde F, Gomes CC, Pordeus IA, Gomez RS. Serotonin transporter gene polymorphisms: a case-control study. *Braz Dent J*. 2012;23(1):68-71.

Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc*. 2006;65(3):278-90.

Amar A, Ortellado DK, Franzi SA, Curioni OA, Rapoport A. Sobrevida após Recidiva Intratável do Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço. *Rev. Col. Bras. Cir*. 2005;32(5):267-9.

American Joint Committee on Cancer (AJCC). Lip and oral cavity. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010a:29-40.

American Joint Committee on Cancer (AJCC). Larynx. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010b:57-67.

An J, Zhao J, Zhang X, Ding R, Geng T, Feng T et al. Impact of multiple Alcohol Dehydrogenase gene polymorphisms on risk of laryngeal, esophageal, gastric and colorectal cancers in Chinese Han population. *Am J Cancer Res*. 2015;5(8):2508-15.

Anantharaman D, Marron M, Lagiou P, Samoli E, Ahrens W, Pohlabein H, et al. Population attributable risk of tobacco and alcohol for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol*. 2011;47(8):725-31.

Anantharaman D, Chabrier A, Gaborieau V, Franceschi S, Herrero R, Rajkumar T, et al. Genetic variants in nicotine addiction and alcohol metabolism genes, oral cancer risk and the propensity to smoke and drink alcohol: a replication study in India. *PLoS One*. 2014;9(2):e88240.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008;371(9625):1695-709.

Asakage T, Yokoyama A, Haneda T, Yamazaki M, Muto M, Yokoyama T et al. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases, and drinking, smoking and diet in Japanese men with oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2007;28(4):865-74.

Azevedo e Silva G, de Moura L, Curado MP, Gomes FS, Otero U, Rezende LFM, et al. The fraction of cancer attributable to ways of life, infections, occupation and environmental agents in Brazil in 2020. *PLoS One*. 2016;11(2): e0148761.

Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncol*. 2007;8(4):292-3.

Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer*. 2015;112(3):580-93.

Balbo S, Brooks PJ. Implications of acetaldehyde-derived DNA adducts for understanding alcohol-related carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2015;815:71-88.

Ball D. Genetic approaches to alcohol dependence. *Br J Psychiatry*. 2004;185:449-51.

Bart G, Kreek MJ, Ott J, LaForge KS, Proudnikov D, Pollak L, et al. Increased attributable risk related to a functional μ -opioid receptor gene polymorphism in association with alcohol dependence in central Sweden. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(2):417-22.

Bau CH, Almeida S, Hutz MH. The TaqI A1 allele of the dopamine D2 receptor gene and alcoholism in Brazil: association and interaction with stress and harm avoidance on severity prediction. *Am J Med Genet*. 2000;96(3):302-6.

Bediaga NG, Marichalar-Mendia X, Rey-Barja N, Setien-Olarra A, Gonzalez-Garcia JA, de Pancorbo MM, et al. Polymorphisms in alcohol and tobacco metabolism genes in head and neck cancer in the Basque Country. *J Oral Pathol Med*. 2015;44(10):769-75.

Befort K, Filliol D, Decaillot FM, Gaveriaux-Ruff C, Hoehe MR, Kieffer BL. A single nucleotide polymorphic mutation in the human μ -opioid receptor severely impairs receptor signaling. *J Biol Chem*. 2001;276(5):3130-7.

Bergen AW, Kokoszka J, Peterson R, Long JC, Virkkunen M, Linnoila M, et al. Mu opioid receptor gene variants: lack of association with alcohol dependence. *Mol Psychiatry*. 1997;2(6):490-4.

Berrettini WH, Hoehe MR, Ferraro TN, Demaria PA, Gottheil E. Human mu opioid receptor gene polymorphisms and vulnerability to substance abuse. *Addict Biol*. 1997;2(3):303-8.

Beyer A, Koch T, Schröder H, Schulz S, Höllt V. Effect of the A118G polymorphism on binding affinity and agonist-mediated endocytosis, desensitization, and resensitization of the human μ -opioid receptor. *J Neurochem*. 2004;89(3):553-60.

Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Grucza RA, Xuei X, et al. Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry*. 2008;165(9):1163-71.

Bierut LJ, Goate AM, Breslau N, Johnson EO, Bertelsen S, Fox L, et al. ADH1B is associated with alcohol dependence and alcohol consumption in populations of European and African ancestry. *Mol Psychiatry*. 2012;17(4):445-50.

Blum K, Noble EP, Sheridan PJ, Montgomery A, Ritchie T, Jagadeeswaran P, et al. Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. *JAMA*. 1990;263(15):2055-60.

Boccia S, Cadoni G, Sayed-Tabatabaei FA, Volante M, Arzani D, De Lauretis A 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(1):93-100.

Boeing H. Alcohol and risk of cancer of the upper gastrointestinal tract: first analysis of the EPIC data. *IARC Sci Publ*. 2002;156:151-4.

Boffetta P, Hashibe M, La Vecchia C, Zatonski W, Rehm J. The burden of cancer attributable to alcohol drinking. *Int J Cancer*. 2006;119(4):884-7.

Boing AF, Antunes JL. Condições socioeconômicas e câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática de literatura. *Ciênc Saude Colet*. 2011;16(2):615-22.

Bond C, LaForge KS, Tian M, Melia D, Zhang S, Borg L, et al. Single nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9608-13.

Bosetti C, Garavello W, Gallus S, La Vecchia C. Effects of smoking cessation on the risk of laryngeal cancer: an overview of published studies. *Oral Oncol*. 2006;42(9):866-72.

Bouchardy C, Hirvonen A, Coutelle C, Ward PJ, Dayer P, Benhamou S. Role of alcohol dehydrogenase 3 and cytochrome P-4502E1 genotypes in susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract. *Int J Cancer*. 2000;87(5):734-40.

Bowirrat A, Oscar-Berman M. Relationship between dopaminergic neurotransmission, alcoholism, and Reward Deficiency syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005;132B(1):29-37.

Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel 2006). 2007. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2006.pdf.

Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel 2015). 2016. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2015.pdf.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.

Brennan P, Lewis S, Hashibe M, Bell DA, Boffetta P, Bouchardy C, et al. Pooled analysis of alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: A HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2004;159(1):1-16.

Brooks PJ, Zakhari S. Acetaldehyde and the genome: beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2014;55(2):77-91.

Buch SC, Nazar-Stewart V, Weissfeld JL, Romkes M. Case-control study of oral and oropharyngeal cancer in whites and genetic variation in eight metabolic enzymes. *Head Neck*. 2008;30(9):1139-47.

Buckland PR. Genetic association studies of alcoholism problems with the candidate gene approach. *Alcohol Alcohol*. 2001;36(2):99-103.

Burim RV, Canalle R, Martinelli Ade L, Takahashi CS. Polymorphisms in glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and cytochromes P450CYP2E1 and CYP1A1 and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics. *Mutagenesis*. 2004;19(4):291-8.

Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PLoS One*. 2013;8(4):e62005.

Carvalho AL, Pintos J, Schlecht NF, Oliveira BV, Fava AS, Curado MP, et al. Predictive factors for diagnosis of advanced-stage squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;128(3):313-8.

Celorio D, Bujanda L, Caso C, Landabaso M, Oria JC, Ogando J, et al. A comparison of Val81Met and other polymorphisms of alcohol metabolizing genes in patients and controls in Northern Spain. *Alcohol*. 2012;46(5):427-31.

Chang JS, Straif K, Guha N. The role of alcohol dehydrogenase genes in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis of ADH1B and ADH1C. *Mutagenesis*. 2012;27(3):275-86.

Chen D, Truong T, Gaborieau V, Byrnes G, Chabrier A, Chuang SC, et al. A sex-specific association between a 15q25 variant and upper aerodigestive tract cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(4):658-64.

Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma an update. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(5):401-21.

Chu SL, Xiao D, Wang C, Jing H. Association between 5-hydroxytryptamine transporter gene-linked polymorphic region and smoking behavior in Chinese males. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(12):1365-8.

Cichoz-Lach H, Celiński K, Wojcierowski J, Słomka M, Lis E. Genetic polymorphism of alcohol-metabolizing enzyme and alcohol dependence in Polish men. *Braz J Med Biol Res*. 2010;43(3):257-61.

Cieślińska A, Sienkiewicz-Szłapka E, Kostyra E, Fiedorowicz E, Snarska J, Wroński K, et al. μ -Opioid receptor gene (OPRM1) polymorphism in patients with breast cancer. *Tumour Biol*. 2015;36(6):4655-60.

Colombo J, Rossit AR, Caetano A, Borim AA, Wornrath D, Silva AE. GSTT1, GSTM1 and CYP2E1 genetic polymorphisms in gastric cancer and chronic gastritis in a Brazilian population. *World J Gastroenterol*. 2004;10(9):1240-5.

Compton P, Geschwind DH, Alarcón M. Association Between Human mu-Opioid Receptor Gene Polymorphism, Pain Tolerance, and Opioid Addiction. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003;121B(1):76-82.

Conway DI, Petticrew M, Marlborough H, Berthiller J, Hashibe M, Macpherson LM. Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: a systematic review and metaanalysis of case-control studies. *Int J Cancer*. 2008;122:2811-9.

Corrao G, Bagnardi V, Zambon A, La Vecchia C. A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases. *Prev Med*. 2004;38(5):613-9.

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(3):319-25.

Coutelle C, Höhn B, Benesova M, Oneta CM, Quattrochi P, Roth HJ, et al. Risk factors in alcohol associated breast cancer: alcohol dehydrogenase polymorphism and estrogens. *Int J Oncol*. 2004;25(4):1127-32.

Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, You M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc Nutr Soc*. 2004;63(1):49-63.

Crowley JJ, Oslin DW, Patkar AA, Gottheil E, DeMaria PA Jr, O'Brien CP, et al. A genetic association study of the mu opioid receptor and severe opioid dependence. *Psychiatr Genet*. 2003;13(3):169-73.

Crystal HA, Hamon S, Randesi M, Cook J, Anastos K, Lazar J, et al. A C17T polymorphism in the mu opiate receptor is associated with quantitative measures of drug use in African-American women. *Addict Biol*. 2012;17(1):181-91.

Dackis C, O'Brien C. Neurobiology of addiction: treatment and public policy ramifications. *Nat Neurosci*. 2005;8(11):1431-6.

Daher M, Costa FM, Neves FA. Genotyping the mu-opioid receptor A118G polymorphism using the real-time amplification refractory mutation system: allele frequency distribution among Brazilians. *Pain Pract.* 2013;13(8):614-20.

de Menezes RF, Bergmann A, de Aguiar SS, Thuler LC. Alcohol consumption and the risk of cancer in Brazil: A study involving 203,506 cancer patients. *Alcohol.* 2015;49(7):747-51.

Deschler DG, Richmon JD, Khariwala SS, Ferris RL, Wang MB. The “new” head and neck cancer patient-young, nonsmoker, nondrinker, and HPV positive: evaluation. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;151(3):375-80.

Doyle GA, Chou AD, Saung WT, Lai AT, Lohoff FW, Berrettini WH. Identification of CHRNA5 rare variants in African-American heavy smokers. *Psychiatr Genet.* 2014;24(3):102-9.

Du Y, Wan YJ. The interaction of reward genes with environmental factors in contribution to alcoholism in Mexican Americans. *Alcohol Clin Exp Res.* 2009;33(12):2103-12

Ducci F, Goldman D. The Genetic Basis of Addictive Disorders. *Psychiatr Clin North Am.* 2012;35(2):495-519.

Edenberg HJ. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Res Health.* 2007;30(1):5-13.

Edenberg HJ, McClintick JN. Alcohol Dehydrogenases, Aldehyde Dehydrogenases, and Alcohol Use Disorders: A Critical Review. *Alcohol Clin Exp Res.* 2018;42(12):2281-2297.

Feinn R, Nellissery M, Kranzler HR. Meta-analysis of the association of a functional serotonin transporter promoter polymorphism with alcohol dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005;133B(1):79-84.

Feron VJ, Kruysse A, Woutersen RA. Respiratory tract tumours in hamsters exposed to acetaldehyde vapour alone or simultaneously to benzo(a)pyrene or diethylnitrosamine. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1982;18(1):13-31.

Ferreira Antunes JL, Toporcov TN, Biazevic MG, Boing AF, Scully C, Petti S. Joint and Independent Effects of Alcohol Drinking and Tobacco Smoking on Oral Cancer: A Large Case-Control Study. *PLoS One*. 2013;8(7):e68132.

Figuerro Ruiz E, Carretero Peláez MA, Cerero Lapiedra R, Esparza Gómez G, Moreno López LA. Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: Relationship with oral cancer. *Med Oral*. 2004;9(1):14-23.

Fowler CD, Kenny PJ. Nicotine aversion: Neurobiological mechanisms and relevance to tobacco dependence vulnerability. *Neuropharmacology*. 2014;76 Pt B:533-44.

Gacek P, Conner TS, Tennen H, Kranzler HR, Covault J. Tryptophan hydroxylase 2 gene and alcohol use among college students. *Addict Biol*. 2008;13(3-4):440-8.

Galvan A, Dragani TA. Nicotine dependence may link the 15q25 locus to lung cancer risk. *Carcinogenesis*. 2010;31(3):331-3.

Garcia SM, Curioni OA, de Carvalho MB, Gattás GJ. Polymorphisms in alcohol metabolizing genes and the risk of head and neck cancer in a Brazilian population. *Alcohol Alcohol*. 2010;45(1):6-12.

Gattás GJ, Soares-Vieira JA. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. *Occup Med (Lond)*. 2000;50(7):508-11.

Gattás GJ, de Carvalho MB, Siraque MS, Curioni OA, Kohler P, Eluf-Neto J, Wünsch-Filho V. Genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. *Head Neck*. 2006; 28(9):819-26.

Gill A, Vasan N, Givi B, Joshi A. AHNS Series: Do you know your guidelines? Evidence-based management of oral cavity cancers. *Head Neck*. 2018;40(2):406-16.

Gelernter J, O'Malley S, Risch N, Kranzler HR, Krystal J, Merikangas K, et al. No association between an allele of the D2 dopamine receptor gene (DRD2) and alcoholism. *JAMA*. 1991;266:1801-7.

Gelernter J, Kranzler HR, Sherva R, Almasy L, Koesterer R, Smith AH, et al. Genome-wide association study of alcohol dependence: significant findings in African- and European-Americans including novel risk loci. *Mol Psychiatry*. 2014;19(1):41-9.

Guo H, Zhang G, Mai R. Alcohol dehydrogenase-1B Arg47His polymorphism and upper aerodigestive tract cancer risk: a meta-analysis including 24,252 subjects. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012;36(2):272-8.

Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Science*. 1908;28(706):49-50.

Harty LC, Caporaso NE, Hayes RB, Winn DM, Bravo-Otero E, Blot WJ, et al. Alcohol dehydrogenase 3 genotype and risk of oral cavity and pharyngeal cancers. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(22):1698-705.

Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, et al. Evidence for an important role of alcohol - and aldehyde - metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(4):696-703.

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.

Hashibe M, McKay JD, Curado MP, Oliveira JC, Koifman S, Koifman R, et al. Multiple ADH genes are associated with upper aerodigestive cancers. *Nat Genet*. 2008;40(6):707-9.

Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(2):541-50.

Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem.* 1991;110(4):559-65.

Herman AI, Philbeck JW, Vasilopoulos NL, Depetrillo PB. Serotonin transporter promoter polymorphism and differences in alcohol consumption behaviour in a college student population. *Alcohol Alcohol.* 2003;38(5):446-9.

Heymann HM, Gardner AM, Gross ER. Aldehyde-Induced DNA and Protein Adducts as Biomarker Tools for Alcohol Use Disorder. *Trends Mol Med.* 2018;24(2):144-55.

Hildesheim A, Anderson LM, Chen CJ, Cheng YJ, Brinton LA, Daly AK, et al. CYP2E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(16):1207-12.

Hiraki A, Matsuo K, Wakai K, Suzuki T, Hasegawa Y, Tajima K. Gene-gene and gene-environment interactions between alcohol drinking habit and polymorphisms in alcohol-metabolizing enzyme genes and the risk of head and neck cancer in Japan. *Cancer Sci.* 2007;98(7):1087-91.

Homann N, Jousimies-Somer H, Jokelainen K, Heine R, Salaspuro M. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: Methodological aspects and pathogenetic implications. *Carcinogenesis.* 1997;18(9):1739-43.

Homann N, Tillonen J, Rintamäki H, Salaspuro M, Lindqvist C, Meurman JH. Poor dental status increases the acetaldehyde production from ethanol in saliva: a possible link to the higher risk of oral cancer among alcohol consumers. *Oral Oncol.* 2001;37(2):153-8.

Homann N, Stickel F, König IR, Jacobs A, Junghanns K, Benesova M, et al. Alcohol dehydrogenase 1C*1 allele is a genetic marker for alcohol-associated cancer in heavy drinkers. *Int J Cancer*. 2006;118(8):1998-2002.

Hopfer CJ, Timberlake D, Haberstick B, Lessem JM, Ehringer MA, Smolen A, et al. Genetic influence on quantity of alcohol consumed by adolescents and young adults. *Drug Alcohol Depend*. 2005;78(2):187-93.

Huang CC, Hsiao JR, Lee WT, Lee YC, Ou CY, Chang CC, et al. Investigating the Association between Alcohol and Risk of Head and Neck Cancer in Taiwan. *Sci Rep*. 2017;7(1):9701.

Hurley TD, Edenberg HJ. Genes encoding enzymes involved in ethanol metabolism. *Alcohol Res*. 2012;34(3):339-44.

INCA - Estimativa 2018: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva / Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Disponível em: <https://www.inca.gov.br>.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. In: IARC Monographs on the the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. 1999;71:1-1555.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Alcohol consumption and ethyl carbamate. In: IARC Monographs on the the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. 2010;96:3-1383.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Personal habits and indoor combustions. In: IARC Monographs on the the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. 2012;100(Pt E):1-538.

Ishikawa H, Yamamoto H, Tian Y, Kawano M, Yamauchi T, Yokoyama K. Effects of ALDH2 gene polymorphisms and alcohol-drinking behavior on micronuclei frequency in non-smokers. *Mutat Res.* 2003;541(1-2):71-80.

Iwahashi K, Matsuo Y, Suwaki H, Nakamura K, Ichikawa Y. CYP2E1 and ALDH2 genotypes and alcohol dependence in Japanese. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995;19(3):564-6.

Ji X, Gui J, Han Y, Brennan P, Li Y, McKay J, et al. The role of haplotype in 15q25.1 locus in lung cancer risk: results of scanning chromosome 15. *Carcinogenesis.* 2015;36(11):1275-83.

Jiang O, Zhou R, Wu D, Liu Y, Wu W, Cheng N. CYP2E1 polymorphisms and colorectal cancer risk: a HuGE systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol.* 2013;34(2):1215-24.

Kfoury SA, Eluf Neto J, Koifman S, Curado MP, Menezes A, Daudt AW, Wünsch Filho V. Fraction of head and neck cancer attributable to tobacco and alcohol in cities of three Brazilian regions. *Rev Bras Epidemiol.* 2018;21:e180005.

Kim SA, Kim JW, Song JY, Park S, Lee HJ, Chung JH. Association of polymorphisms in nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene (CHRNA4), mu-opioid receptor gene (OPRM1), and ethanol-metabolizing enzyme genes with alcoholism in Korean patients. *Alcohol.* 2004;34(2-3):115-20.

Kong X, Deng H, Gong S, Alston T, Kong Y, Wang J. Lack of associations of the opioid receptor mu 1 (OPRM1) A118G polymorphism (rs1799971) with alcohol dependence: review and meta-analysis of retrospective controlled studies. *BMC Med Genet.* 2017;18(1):120.

Knapman A, Connor M. Cellular signalling of non-synonymous single-nucleotide polymorphisms of the human μ -opioid receptor (OPRM1). *Br J Pharmacol.* 2015; 172(2):349-63.

Konishi T, Calvillo M, Leng AS, Feng J, Lee T, Lee H, et al. The ADH3*2 and CYP2E1 c2 alleles increase the risk of alcoholism in Mexican American men. *Exp Mol Pathol*. 2003;74(2):183-9.

Kowalski LP, Carvalho AL. Natural history of untreated head and neck cancer. *Eur J Cancer*. 2000;36(8):1032-7.

Kranzler H, Lappalainen J, Nellissery M, Gelernter J. Association study of alcoholism subtypes with a functional promoter polymorphism in the serotonin transporter protein gene. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002;26(9):1330-5.

Lee SH, Ahn WY, Seweryn M, Sadee W. Combined genetic influence of the nicotinic receptor gene cluster CHRNA5/A3/B4 on nicotine dependence. *BMC Genomics*. 2018;19(1):826.

Leite TK, Fonseca RM, de França NM, Parra EJ, Pereira RW. Genomic ancestry, self-reported “color” and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian admixed siblings. *PLoS One*. 2011;6(11):e27162.

Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*. 1996;274(5292):1527-31.

II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD). Consumo de Álcool no Brasil: Tendências entre 2006 e 2012. Disponível em: <http://inpad.org.br/>.

Lewis CM, Knight J. Introduction to genetic association studies. *Cold Spring Harb Protoc*. 2012;2012(3):297-306.

Li D, Zhao H, Gelernter J. Strong association of the alcohol dehydrogenase 1B gene (ADH1B) with alcohol dependence and alcohol-induced medical diseases. *Biol Psychiatry*. 2011;70(6):504-12.

Li D, Zhao H, Gelernter J. Further clarification of the contribution of the ADH1C gene to vulnerability of alcoholism and selected liver diseases. *Hum Genet.* 2012;131(8):1361-74.

Li D, Zhang R, Jin T, He N, Ren L, Zhang Z, et al. ADH1B and CDH1 polymorphisms predict prognosis in male patients with non-metastatic laryngeal cancer. *Oncotarget.* 2016;7(45):73216-73228.

Linhart K, Bartsch H, Seitz HK. The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts. *Redox Biol.* 2014;3:56-62.

Lips EH, Gaborieau V, McKay JD, Chabrier A, Hung RJ, Boffetta P, et al. Association between a 15q25 gene variant, smoking quantity and tobacco-related cancers among 17.000 individuals. *Int J Epidemiol.* 2010;39(2):563-77.

Loh el W, Fann CS, Chang YT, Chang CJ, Cheng AT. Endogenous opioid receptor genes and alcohol dependence among Taiwanese Han. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004;28(1):15-9.

Luczak SE, Glatt SJ, Wall TL. Meta-analyses of ALDH2 and ADH1B with alcohol dependence in Asians. *Psychol Bull.* 2006;132(4):607-21.

Lunetta KL. Genetic association studies. *Circulation.* 2008;118(1):96-101.

Mague SD, Blendy JA. OPRM1 SNP (A118G): involvement in disease development, treatment response, and animal models. *Drug Alcohol Depend.* 2010;108(3):172-82.

Marchioni DML, Gattás GJ, Curioni OA, de Carvalho MB. Interação entre consumo alimentar e polimorfismos da GSTM1 e GSTT1 no risco para o câncer de cabeça e pescoço: estudo caso-controle em São Paulo, Brasil. *Cad Saude Publica.* 2011;27(2):379-87.

Marichalar-Mendia X, Acha-Sagredo A, Rodriguez-Tojo MJ, Rey-Barja N, Hernando-Rodriguez M, Aguirregaviria JI, et al. Alcohol-dehydrogenase (ADH1B) Arg48His

polymorphism in Basque Country patients with oral and laryngeal cancer: preliminary study. *Anticancer Res.* 2011;31(2):677-80.

Marron M, Boffetta P, Zhang ZF, Zaridze D, Wünsch-Filho V, Winn DM, et al. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol.* 2010;39(1):182-96.

Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(4):489-501.

Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* 2010;11(8):781-9.

Matsuda T, Yabushita H, Kanaly RA, Shibutani S, Yokoyama A. Increased DNA damage in ALDH2-deficient alcoholics. *Chem Res Toxicol.* 2006;19(10):1374-8.

Matsushita S, Yoshino A, Murayama M, Kimura M, Muramatsu T, Higuchi S. Association study of serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and alcoholism. *Am J Med Genet.* 2001;105(5):446-50.

McDonald JT, Johnson-Obaseki S, Hwang E, Connell C, Corsten M. The relationship between survival and socio-economic status for head and neck cancer in Canada. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;43:2-6.

Mendes de Oliveira JR, Otto PA, Vallada H, Lauriano V, Elkis H, Lafer B, et al. Analysis of a novel functional polymorphism within the promoter region of the serotonin transporter gene (5-HTT) in Brazilian patients affected by bipolar disorder and schizophrenia. *Am J Med Genet.* 1998;81(3):225-7.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.

Mingione CJ, Heffner JL, Blom TJ, Anthenelli RM. Childhood adversity, serotonin transporter (5-HTTLPR) genotype, and risk for cigarette smoking and nicotine dependence in alcohol dependent adults. *Drug Alcohol Depend.* 2012;123(1-3):201-6.

Miranda R, Ray L, Justus A, Meyerson LA, Knopik VS, McGuey J, et al. Initial evidence of an association between OPRM1 and adolescent alcohol misuse. *Alcohol Clin Exp Res.* 2010;34(1):112-22.

Mizoi Y, Yamamoto K, Ueno Y, Fukunaga T, Harada S. Involvement of genetic polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenases in individual variation of alcohol metabolism. *Alcohol Alcohol.* 1994;29(6):707-10.

Morimoto K, Takeshita T. Low Km aldehyde dehydrogenase (ALDH2) polymorphism, alcohol-drinking behavior, and chromosome alterations in peripheral lymphocytes. *Environ Health Perspect.* 1996;104 Suppl 3:563-7.

Moyses RA, López RV, Cury PM, Siqueira SA, Curioni OA, Gois Filho JF, et al. Significant differences in demographic, clinical, and pathological features in relation to smoking and alcohol consumption among 1,633 head and neck cancer patients. *Clinics.* 2013;68(6):738-44.

Munafò MR, Matheson IJ, Flint J. Association of the DRD2 gene Taq1A polymorphism and alcoholism: a meta-analysis of case-control studies and evidence of publication bias. *Mol Psychiatry.* 2007;12(5):454-61.

Munafò MR, Timofeeva MN, Morris RW, Prieto-Merino D, Sattar N, Brennan P, et al. Association between genetic variants on chromosome 15q25 locus and objective measures of tobacco exposure. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(10):740-8.

National Cancer Institute (NCI). Disponível em: <https://www.cancer.gov/>

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA). Disponível em: <https://www.niaaa.nih.gov/>.

National Institute on Drug Abuse (NIDA). Tobacco, Nicotine and E-Cigarettes. Disponível em: <https://www.drugabuse.gov/drugs-abuse/tobacconicotine-e-cigs>.

Nishimoto IN, Hanaoka T, Sugimura H, Nagura K, Ihara M, Li XJ, et al. Cytochrome P450 2E1 polymorphism in gastric cancer in Brazil: case-control studies of Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9(7):675-80.

Noble EP. Addiction and its reward process through polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene: a review. *Eur Psychiatry*. 2000;15(2):79-89.

Noce CW, Rebelo MS. Avaliação da relação entre o tamanho do tumor e características sociais em pacientes com carcinoma de células escamosas bucal. *Rev bras cancerol*. 2008;54(2):123-9.

Oh CS, Lee SH, Yoo YB, Yang JH, Kim SH. Mu-Opioid Receptor Polymorphisms and Breast Cancer in a Korean Female Adult Population: A Retrospective Study. *J Breast Cancer*. 2016;19(2):206-9.

Olivieri EH, da Silva SD, Mendonça FF, Urata YN, Vidal DO, Faria Mde A, et al. CYP1A2*1C, CYP2E1*5B, and GSTM1 polymorphisms are predictors of risk and poor outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol*. 2009;45(9):e73-9.

Olfson E, Bierut LJ. Convergence of genome-wide association and candidate gene studies for alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012;36(12):2086-94.

Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. Risk of head and neck cancer and the alcohol dehydrogenase 3 genotype. *Carcinogenesis*. 2001;22(1):57-61.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Global status report on alcohol and health - 2014ed. Disponível em: www.who.int.

Organização Mundial da Saúde (OMS). WHO report on the global tobacco epidemic, 2013. Disponível em: https://www.who.int/tobacco/global_report/2013/en/.

Panwar A, Interval E, Lydiatt WM. Emergence of a Novel Staging System for Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Based on HPV Status. *Oncology*. 2017;31(12):e33-e40.

Pastorelli R, Bardazzi G, Saieva C, Cerri A, Gestri D, Allamani A, et al. Genetic determinants of alcohol addiction and metabolism: a survey in Italy. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25(2):221-7.

Picciotto MR, Caldarone BJ, King SL, Zachariou V. Nicotinic receptors in the brain. Links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2000;22(5):451-65.

Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol*. 2004;39(3):155-65.

Prasad P, Ambekar A, Vaswani M. Dopamine D2 receptor polymorphisms and susceptibility to alcohol dependence in Indian males: a preliminary study. *BMC Med Genet*. 2010;11:24.

Praud D, Rota M, Rehm J, Shield K, Zatonski W, Hashibe M et al. Cancer incidence and mortality attributable to alcohol consumption. *Int J Cancer*. 2016;138(6):1380-7.

Ragia G, Veresies I, Veresie L, Veresies K, Manolopoulos VG. Association study of DRD2 A2/A1, DRD3 Ser9Gly, D β H -1021C>T, OPRM1 A118G and GRIK1 rs2832407C>A polymorphisms with alcohol dependence. *Drug Metab Pers Ther*. 2016;31(3):143-50.

Ramchandani VA, Umhau J, Pavon FJ, Ruiz-Velasco V, Margas W, Sun H, et al. A genetic determinant of the striatal dopamine response to alcohol in men. *Mol Psychiatry*. 2011;16(8):809-17.

Ramchandani VA. Genetics of Alcohol Metabolism. In: Watson R, Preedy VR, Zibadi S, editors. *Alcohol, Nutrition, and Health Consequences*. New York: Humana Press; 2013. Chap. 2, p.15-25.

Rezende LFM, Lee DH, Louzada MLDC, Song M, Giovannucci E, Eluf-Neto J. Proportion of cancer cases and deaths attributable to lifestyle risk factors in Brazil. *Cancer Epidemiol*. 2019;59:148-157.

Ribeiro IL, de Medeiros JJ, Rodrigues LV, Valença AM, Lima Neto Ede A. Factors associated with lip and oral cavity cancer. *Rev Bras Epidemiol*. 2015;18(3):618-29.

Rietschel M, Treutlein J. The genetics of alcohol dependence. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1282:39-70.

Risch A, Ramroth H, Raedts V, Rajaei-Behbahani N, Schmezer P, Bartsch H, et al. Laryngeal cancer risk in Caucasians is associated with alcohol and tobacco consumption but not modified by genetic polymorphisms in class I alcohol dehydrogenases ADH1B and ADH1C, and glutathione-S-transferases GSTM1 and GSTT1. *Pharmacogenetics*. 2003;13(4):225-30.

Rommelspacher H, Smolka M, Schmidt LG, Samochowiec J, Hoehe MR. Genetic analysis of the μ -opioid receptor in alcohol-dependent individuals. *Alcohol*. 2001;24(2):129-35.

Rossini A, Lima SS, Rapozo DC, Faria M, Albano RM, Pinto LF. CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(2):195-201.

Ruwali M, Khan AJ, Shah PP, Singh AP, Pant MC, Parmar D. Cytochrome P450 2E1 and head and neck cancer: interaction with genetic and environmental risk factors. *Environ Mol Mutagen*. 2009;50(6):473-82.

Saccone NL, Culverhouse RC, Schwantes-An T-H, Cannon DS, Chen X, Cichon S, et al. Multiple independent loci at chromosome 15q25.1 affect smoking quantity: a meta-analysis and comparison with lung cancer and COPD. *PLoS Genet.* 2010;6(8).

Salaspuro MP. Acetaldehyde, microbes, and cancer of the digestive tract. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2003;40(2):183-208.

Salaspuro M, Salaspuro V, Seitz HK. Interaction of alcohol and tobacco in upper aerodigestive tract and stomach cancer. In: Cho CH, Purohit V, editors. *Alcohol, Tobacco and Cancer.* Basel, Karger; 2006.p.48-62.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Seitz HK, Stickel F, Homann N. Pathogenetic mechanisms of upper aerodigestive tract cancer in alcoholics. *Int J Cancer.* 2004;108(4):483-7.

Seitz HK, Becker P. Alcohol metabolism and cancer risk. *Alcohol Res Health.* 2007;30(1):38-41, 44-7.

Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):599-612.

Seitz HK, Stickel F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. *Genes Nutr.* 2010;5(2):121-8.

Seitz HK, Wang XD. The role of cytochrome P450 2E1 in ethanol-mediated carcinogenesis. *Subcell Biochem.* 2013;67:131-43.

Seitz HK, Mueller S. Alcohol and cancer: an overview with special emphasis on the role of acetaldehyde and cytochrome P450 2E1. *Adv Exp Med Biol.* 2015;815:59-70.

Setiawan E, Pihl RO, Benkelfat C, Leyton M. Influence of the *OPRM1* A118G polymorphism on alcohol-induced euphoria, risk for alcoholism and the clinical efficacy of naltrexone. *Pharmacogenomics*. 2012;13(10):1161-72.

Setshedi M, Wands JR, Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2010;3(3):178-85.

Silva MTB, Araújo FLO, Félix FHC, Simão AFL, Lobato RFG, Sousa FCF, et al. Alcohol and nicotine: mechanisms of dependence. *Rev Neurocienc*. 2010;18(4):531-7.

Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol*. 2014;50(5):387-403.

Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (SBCCP). Disponível em: <https://sbccp.org.br/>.

Smith L, Watson M, Gates S, Ball D, Foxcroft D. Meta-analysis of the association of the Taq1A polymorphism with the risk of alcohol dependency: a HuGE gene-disease association review. *Am J Epidemiol*. 2008;167(2):125-38.

Standaert D, Galanter JM. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. In: Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ, Armstrong AW, editores. *Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia*. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. p.166-85.

Stephens SH, Hartz SM, Hoft NR, Saccone NL, Corley RC, Hewitt JK, et al. Distinct loci in the *CHRNA5/CHRNA3/CHRNA4* gene cluster are associated with onset of regular smoking. *Genet Epidemiol*. 2013;37(8):846-59.

Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, Higgins KA, Saba NF. An update on larynx cancer. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):31-50.

Stevens VL, Bierut LJ, Talbot JT, Wang JC, Sun J, Hinrichs AL, et al. Nicotinic receptor gene variants influence susceptibility to heavy smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(12):3517-25.

Sturgis EM, Dahlstrom KR, Guan Y, Eicher SA, Strom SS, Spitz MR, Wei Q. Alcohol dehydrogenase 3 genotype is not associated with risk of squamous cell carcinoma of the oral cavity and pharynx. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(3):273-5.

Sullivan PF, Neale BM, van den Oord E, Miles MF, Neale MC, Bulik CM, et al. Candidate genes for nicotine dependence via linkage, epistasis, and bioinformatics. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2004;126B(1):23-36.

Sun F, Tsuritani I, Yamada Y. Contribution of genetic polymorphisms in ethanol-metabolizing enzymes to problem drinking behavior in middle-aged Japanese men. *Behav Genet.* 2002;32(4):229-36.

Suraj Singh H, Ghosh PK, Saraswathy KN. DRD2 and ANKK1 gene polymorphisms and alcohol dependence: a case-control study among a Mendelian population of East Asian ancestry. *Alcohol Alcohol.* 2013;48(4):409-14.

Szymańska K, Hung RJ, Wünsch-Filho V, Eluf-Neto J, Curado MP, Koifman S, et al. Alcohol and tobacco, and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Latin America: a case-control study. *Cancer Causes Control.* 2011;22(7):1037-46.

Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C, Dal Maso L, Levi F, Bidoli E, et al. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control.* 2002;13(10):957-64.

Tamaki A, Miles BA, Lango M, Kowalski L, Zender CA. AHNS Series: Do you know your guidelines? Review of current knowledge on laryngeal cancer. *Head Neck.* 2018;40(1):170-81.

Thomasson HR, Beard JD, Li TK. ADH2 gene polymorphisms are determinants of alcohol pharmacokinetics. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995;19(6):1494-9.

Thompson MD, Gonzalez N, Nguyen T, Comings DE, George SR, O'Dowd BF. Serotonin transporter gene polymorphisms in alcohol dependence. *Alcohol*. 2000;22(2):61-7.

Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*. 2008;452(7187):638-42.

Toporcov TN, Znaor A, Zhang ZF, Yu GP, Winn DM, Wei Q, et al. Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Int J Epidemiol*. 2015;44(1):169-85.

Town T, Abdullah L, Crawford F, Schinka J, Ordorica PI, Francis E, et al. Association of a functional mu-opioid receptor allele (+118A) with alcohol dependency. *Am J Med Genet*. 1999;88(5):458-61.

True WR, Xian H, Scherrer JF, Madden PA, Bucholz KK, Heath AC, et al. dCommon genetic vulnerability for nicotine and alcohol dependence in men. *Arch Gen Psychiatry*. 1999;56(7):655-61.

van der Zwaluw CS, Engels RC, Vermulst AA, Rose RJ, Verkes RJ, Buitelaar J, et al. A serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) predicts the development of adolescent alcohol use. *Drug Alcohol Depend*. 2010;112(1-2):134-9.

Vasconcelos AC, Neto Ede S, Pinto GR, Yoshioka FK, Motta FJ, Vasconcelos DF, et al. Association study of the SLC6A3 VNTR (DAT) and DRD2/ANKK1 Taq1A polymorphisms with alcohol dependence in a population from northeastern Brazil. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015;39(2):205-11.

Vidal F, Lorenzo A, Auguet T, Olona M, Broch M, Gutiérrez C, et al. Genetic polymorphisms of ADH2, ADH3, CYP4502E1 Dra-I and Pst-I, and ALDH2 in Spanish men: lack of association with alcoholism and alcoholic liver disease. *J Hepatol*. 2004;41(5):744-50.

Vilar CMC, Martins IM. Câncer de Cabeça e Pescoço. In: Sabas CV, Lutoso AML, Barbosa CNB, Teixeira JMR, Brito LXE, Soares LFM, Ferreira MAT, editores. *Oncologia Básica*. 1a ed. Teresina: Fundacao Quixote 2012. p.9-22.

Villalba K, Attonito J, Mendy A, Devieux JG, Gasana J, Dorak TM. A meta-analysis of the associations between the SLC6A4 promoter polymorphism (5HTTLPR) and the risk for alcohol dependence. *Psychiatr Genet*. 2015;25(2):47-58.

Vink JM, Beem AL, Posthuma D, Neale MC, Willemsen G, Kendler KS, et al. Linkage analysis of smoking initiation and quantity in Dutch sibling pairs. *Pharmacogenomics J*. 2004;4(4):274-82.

Voisey J, Swagell CD, Hughes IP, van Daal A, Noble EP, Lawford BR, et al. A DRD2 and ANKK1 haplotype is associated with nicotine dependence. *Psychiatry Res*. 2012;196(2-3):285-9.

Wall TL, Luczak SE, Hiller-Sturmhöfel S. Biology, Genetics, and Environment: Underlying Factors Influencing Alcohol Metabolism. *Alcohol Res*. 2016;38(1):59-68.

Wang XD. Alcohol, vitamin A, and cancer. *Alcohol*. 2005;35(3):251-8

Wang F, Simen A, Arias A, Lu QW, Zhang H. A large-scale meta-analysis of the association between the ANKK1/DRD2 Taq1A polymorphism and alcohol dependence. *Hum Genet*. 2013;132(3):347-58.

Wang S, Li Y, Liu XD, Zhao CX, Yang KQ. Polymorphism of A118G in l-opioid receptor gene is associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Int J Clin Oncol*. 2013;18(4):666-9.

Wen L, Jiang K, Yuan W, Cui W, Li MD. Contribution of Variants in CHRNA5/A3/B4 Gene Cluster on Chromosome 15 to Tobacco Smoking: From Genetic Association to Mechanism. *Mol Neurobiol*. 2016;53(1):472-484.

Whitfield JB. Alcohol dehydrogenase and alcohol dependence: Variation in genotype-associated risk between populations. *Am J Hum Genet.* 2002;71(5):1247-50

Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanism by which alcohol may influence the development of oral cancer-a review. *Oral Oncology.* 1998;34(6):441-7

Woutersen RA, Appelman LM, Van Garderen-Hoetmer A, Feron VJ. Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. III. Carcinogenicity study. *Toxicology.* 1986;41(2):213-31.

Wu M, Chang SC, Kampman E, Yang J, Wang XS, Gu XP, et al. Single nucleotide polymorphisms of ADH1B, ADH1C and ALDH2 genes and esophageal cancer: a population-based case-control study in China. *Int J Cancer.* 2013;132(8):1868-77.

Xu X, Mao B, Wu L, Liu L, Rui J, Chen G. A118G Polymorphism in μ -Opioid Receptor Gene and Interactions with Smoking and Drinking on Risk of Oesophageal Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Lab Anal.* 2017;31(1).

Yao K, Qin H, Gong L, Zhang R, Li L. CYP2E1 polymorphisms and nasopharyngeal carcinoma risk: a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2017;274(1):253-259.

Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, Yokoyama T, Okuyama K, Takahashi H, et al. Alcohol-related cancers and aldehyde dehydrogenase-2 in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis.* 1998;19(8):1383-7.

Yokoyama A, Muramatsu T, Omori T, Yokoyama T, Matsushita S, Higuchi S et al. Alcohol and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms and oropharyngolaryngeal, esophageal and stomach cancers in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis.* 2001;22(3):433-9.

Yokoyama A, Omori T. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and risk for esophageal and head and neck cancers. *Alcohol.* 2005;35(3):175-85.

Yu HS, Oyama T, Isse T, Kitagawa K, Pham TT, Tanaka M, et al. Formation of acetaldehyde-derived DNA adducts due to alcohol exposure. *Chem Biol Interact.* 2010 5;188(3):367-75.

Zaso MJ, Desalu JM, Kim J, Suryadevara K, Belote JM, Park A. Interaction between the ADH1B*3 allele and drinking motives on alcohol use among Black college students. *Am J Drug Alcohol Abuse.* 2018;44(3):329-338.

Zhang H, Luo X, Kranzler HR, Lappalainen J, Yang BZ, Krupitsky E, et al. Association between two mu-opioid receptor gene (Oprm1) haplotype blocks and drug or alcohol dependence. *Hum Mol Genet.* 2006;15(6):807-19.

Zhang H, Li H, Yu H. Analysis of the role of rs2031920 and rs3813867 polymorphisms within the cytochrome P450 2E1 gene in the risk of squamous cell carcinoma. *Cancer Cell Int.* 2018;18:67.

Zhang L, Kendler KS, Chen X. The mu-opioid receptor gene and smoking initiation and nicotine dependence. *Behav Brain Funct.* 2006;2:28.

Zhang Y, Wang D, Johnson AD, Papp AC, Sadée W. Allelic expression imbalance of human mu opioid receptor (OPRM1) caused by variant A118G. *J Biol Chem.* 2005;280(38):32618-24.

Zhang Y, Gu N, Miao L, Yuan H, Wang R, Jiang H. Alcohol dehydrogenase-1B Arg47His polymorphism is associated with head and neck cancer risk in Asian: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2015;36(2):1023-7.

Zhuo X, Song J, Liao J, Zhou W, Ye H, Li Q, Xiang Z, Zhang X. Does CYP2E1 RsaI/PstI polymorphism confer head and neck carcinoma susceptibility?: A meta-analysis based on 43 studies. *Medicine.* 2016;95(43):e5156.

Zintzaras E, Stefanidis I, Santos M, Vidal F. Do alcohol-metabolizing enzyme gene polymorphisms increase the risk of alcoholism and alcoholic liver disease? *Hepatology.* 2006;43(2):352-61.