JEAN TETSUO TAKAMORI

**Avaliação de polimorfismos em genes de metabolismo do
etanol e gene de reparo do DNA em pacientes portadores
de câncer de boca**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências**

Programa de Oncologia

Orientador: Marcos Brasilino de Carvalho

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Takamori, Jean Tetsuo

Avaliação de polimorfismos em genes de metabolismo do etanol e gene de reparo do DNA em pacientes portadores de câncer de boca / Jean Tetsuo Takamori. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Oncologia.

Orientador: Marcos Brasilino de Carvalho.

Descritores: 1.Etanol 2.Acetaldeído 3.Polimorfismo genético 4.Aldeído desidrogenase 5.Álcool desidrogenase 6.Câncer da boca 7.Carcinoma de células escamosas

USP/FM/DBD-188/12

Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo

Candidato: Jean Tetsuo Takamori

Titulo da Dissertação: Avaliação de polimorfismos em genes de metabolismo do etanol e gene de reparo do dna em pacientes portadores de câncer de boca

Orientador: Marcos Brasilino de Carvalho

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em/...../....., considerou

() APROVADO(A) () REPROVADO(A)

Prof (a). Dr(a). _____ Assinatura _____

Instituição _____

Prof (a). Dr(a). _____ Assinatura _____

Instituição _____

Prof (a). Dr(a). _____ Assinatura _____

Instituição _____

Prof (a). Dr(a). _____ Assinatura _____

Instituição _____

Presidente Prof (a) Dr(a). _____

Assinatura _____

Instituição _____

À meus pais
Likio e Isabel

Agradecimentos

A Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;

Ao Dr. Roger Chammas, por conceder a oportunidade de desenvolver o projeto como aluno da Faculdade de Medicina da USP;

Ao Dr. Marcos Brasilino de Carvalho, diretor da divisão médica oncológica do Hospital Heliópolis e meu Orientador, por seus ensinamentos e incentivo na elaboração deste trabalho;

A Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva pelo apoio e ensinamentos não apenas acadêmicos;

A Liliane Rossi, Diana Gazito, Marcelo Santos e Mariana Barbosa de Souza, colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis e grandes amigos, pela colaboração para a conclusão deste trabalho ;

A todos os médicos, residentes e enfermeiras do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Heliópolis, pela disposição em auxiliar e compartilhar conhecimentos e experiências;

Ao Grupo Brasileiro Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço (GENCAPO) pela confiança e colaboração;

A FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento do projeto, a CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior e ao CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa pela bolsa concedida;

“Quem nunca errou nunca experimentou nada novo”

(Albert Einstein)

“Não existem métodos fáceis para resolver problemas difíceis”

(René Descartes)

RESUMO

Takamori JT. Avaliação de polimorfismos em genes de metabolismo do etanol e gene de reparo do DNA em pacientes portadores de câncer de boca. Dissertação. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

O carcinoma epidermóide é uma neoplasia que pode ter origem do revestimento mucoso de vários sítios das vias aerodigestivas superiores, sendo a língua o sítio primário com maior incidência. Entre os fatores de risco para a doença estão a idade, as mutações genômicas, o hábito tabagista e principalmente o consumo de etanol. O etanol é considerado um agente co-carcinogênico no processo de desenvolvimento do câncer de boca. Por outro lado, o acetaldeído, subproduto da oxidação do etanol, é tóxico e participa diretamente na carcinogênese. Assim, polimorfismos genéticos que alteram a oxidação de etanol para acetaldeído promovendo seu acúmulo podem alterar o risco de câncer oral. Os resultados sugerem que pacientes portadores do polimorfismo do gene ADH1C Ile350Val possuem maior risco de tornarem-se etilistas crônicos (OR=2,0199), mas o risco de desenvolverem câncer não é alterado quando comparado aos não portadores. Já os portadores dos polimorfismos nos genes ADH1B Arg47His (OR=0,3445), CY2E1 (ins) (OR=0,3261) e ALDH2 (GA) (OR=0,4811) apresentaram menores riscos de desenvolverem câncer oral, mas estes polimorfismos não estavam associados ao risco de tornarem-se etilistas crônicos. Observou-se também uma possível interação entre a baixa atividade da enzima ALDH2 e a expressão do gene CYP2E1 como um fator protetor no desenvolvimento do câncer de boca. Entretanto, há necessidade de mais estudos para comprovar esses achados.

Descritores: Etanol, acetaldeído, polimorfismo genético, álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase, câncer da boca, carcinoma de células escamosas.

ABSTRACT

Takamori JT. Evaluation of polymorphisms in genes of ethanol metabolism and DNA repair gene in patients with oral cancer

Squamous cell carcinoma is a neoplasm that may originate from the mucosal tissue from various sites of the upper aerodigestive tract, the tongue being the primary site with the highest incidence. Among the risk factors for the disease are age, genomic mutations, smoking habit, and especially the consumption of ethanol. Ethanol is considered a co-carcinogenic agent in the development of oral cancer. Moreover, acetaldehyde, ethanol oxidation product, is toxic and is directly involved in carcinogenesis. Thus, genetic polymorphisms that alter the oxidation of ethanol to acetaldehyde by promoting its accumulation can alter the risk of oral cancer. The results suggest that patients with the ADH1C Ile350Val polymorphism have increased risk of becoming chronic drinkers (OR = 2.0199), but the risk of developing cancer is not changed when compared to non carriers. Since the carriers of polymorphisms in genes ADH1B Arg47His (OR = 0.3445), CYP2E1 (ins) (OR = 0.3261) and ALDH2 (GA) (OR = 0.4811) lower risk of developing oral cancer, but these polymorphisms were not associated with risk of becoming chronic drinkers. There was also a possible interaction between the low activity of the enzyme ALDH2 and CYP2E1 gene expression as a protective factor in the development of oral cancer. However, we need more studies to confirm these findings.

Keywords: Ethanol, acetaldehyde, genetic polymorphism, alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, oral cancer, squamous cell carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representando a via de metabolismo de etanol a acetaldeído, pela ação das enzimas ADH e CYP2e1; metabolismo de acetaldeído a acetato, pela enzima ALDH; a interferência do acetaldeído no DNA com a formação de adutos; e ação das enzimas XPD na promoção do reparo do DNA. (Adaptado de ZYGOIANNI, KYRGIAS, MYSTAKIDOU, & al., 2011) 22

Figura 2: Representação gráfica da localização dos genes de metabolismo de etanol de classe I. Fonte: (OSIER & al., 2004) 23

Figura 3: Imagem do gel de eletroforese (poliacríamida 12%) para a identificação do polimorfismo do gene ADH1B Arg369Cys. O produto de PCR foi tratado com a enzima de restrição AlwNI (Fermentas Life sciences®) e corado em brometo de etídeo 10mg/ml. A genotipagem foi realizada da seguinte forma: Homozigotos para o alelo C (C/C), quando presentes somente as bandas de 173pb; Heterozigotos (C/T), quando presentes as bandas de 173pb,145pb e 28pb (não visíveis); e quando presente somente as bandas de 145pb e 28pb eram classificadas como homozigotos para o alelo T (T/T) 38

Figura 4: Imagem do gel de eletroforese (agarose 3%) para a identificação do polimorfismo do gene ADH1B Arg47His. O produto de PCR foi tratado com a enzima de restrição RseI (Fermentas Life sciences®) e corado em brometo de etídeo 10mg/ml. A genotipagem foi realizada da seguinte forma: Homozigotos para o alelo G (G/G), quando presentes somente as bandas de 173pb; Heterozigotos (C/T), quando presentes as bandas de 173pb,145pb e 28pb (não visíveis); e

quando presente somente as bandas de 145pb e 28pb eram classificadas como homozigotos para o alelo T (T/T)..... 38

Figura 5 Imagem do gel de eletroforese (agarose 3%) para a identificação do polimorfismo do gene ADH1C Ile350Val, tratado com a enzima de restrição Sspl (Fermentas Life Sciences®) e corado em brometo de etideo 10mg/ml. . A genotipagem foi realizada da seguinte forma: Homozigotos para o alelo G (G/G), quando presentes somente as bandas de 274pb e 104pb; Heterozigotos (G/A), quando presentes as bandas de 378pb, 274pb e 104pb ; e quando presente somente as bandas de 378pb eram classificadas como homozigotos para o alelo A (A/A)..... 39

Figura 6: Imagem do gel de eletroforese (agarose 3%) para a identificação do polimorfismo de inserção no gene CYP2E1 corado como brometo de etideo 10mg/ml. A presença do polimorfismo de inserção no gene, era identificado pelo amplicon de 729pb, quando não portador do polimorfismo o amplicon continha 633pb..... 39

Figura 7: Imagem do gel de eletroforese (agarose 3%) para a identificação do polimorfismo do gene ALDH2 tratado com enzima de restrição AlwNI (Fermentas Life Sciences), corado como brometo de etideo 10mg/ml. . A genotipagem foi realizada da seguinte forma: Homozigotos para o alelo G (G/G), quando presentes somente as bandas de 155pb e 25pb (bandas não visíveis); Heterozigotos (G/A), quando presentes as bandas de 180pb,155pb e 25pb (não visíveis); e quando presente somente as bandas de 180pb, foram classificadas como homozigotos para o alelo A (A/A) 40

Figura 8: Imagem do produto de PCR par o polimorfismo do gene XPD Lys751Gln, tratado com a enzima de restrição PstI (Fermentas Life Sciences) submetido à eletroforese em gel de agarose 3% corado como brometo de etideo 10mg/ml. . A genotipagem foi realizada da seguinte forma: Homozigotos para o alelo A (A/A), quando presentes somente as bandas de 144pb e 27pb (bandas não visíveis); Heterozigotos (A/C), quando presentes as bandas de 144pb,81pb,63pb e 27pb (não visíveis); e quando presente somente as bandas de 81pb, 63pb e 27pb, eram classificadas como homozigotos para o alelo C (C/C).....41

Figura 9: curva ROC de quantidade média de etanol consumida por dia ($p < 0,05$ para consumo menor que 63g/dia).44

INDICE DE TABELAS

Tabela 1: Apresentação das características epidemiológicas da população em estudo.	33
Tabela 2: Distribuição entre casos e controles quanto ao consumo médio diário, utilizando-se o ponto de riscos indicado pela curva ROC.	45
Tabela 3: Distribuição dos polimorfismos quanto ao habito de consumir etanol.	45
Tabela 4: Distribuição dos polimorfismos quanto ao consumo médio de etanol em gramas por dia.....	47
Tabela 5: Associação entre os polimorfismo de metadolismo do etanol e acetaldeído quanto ao consumo, menor ou maior que 62g/l/dia	48
Tabela 6: Regressão logística entre a associação do polimorfismo de gene ADH1C e o risco de consumir etanol.	49
Tabela 7: Distribuição dos polimorfismos dos genes de metabolismo do etanol, acetaldeído e reparo entre os casos e controles.....	49
Tabela 8: Regressão logística multivariada entre a interação dos fatores de risco para o câncer de boca e os polimorfismos CYP2E1 e ALDH2.....	51
Tabela 9 : Associação dos polimorfismos de metabolismo de etanol e acetaldeído entre os casos e controles	52
Tabela 10 Regressão logística multivariada entre a interação do polimorfismo de inserção do gene CYP2E1 e ALDH2 (G1510A) e o riscos de câncer oral.: Regressão logística multivariada entre a interação do polimorfismo de inserção do gene CYP2E1 e ALDH2 (G1510A) e o riscos de câncer oral.	53

Tabela 11: Distribuição dos polimorfismos entre casos e controles de pacientes com hábitos tabagistas e hábito etilista e não etilista..... 53

Tabela 12: Modelo de regressão logística dos polimorfismos ADH1B Arg47His, CYP2E1, ALDH2 e XPD. 55

Tabela 13 : Associação entre o consumo de etanol e os polimorfismos dos genes de metabolismo de etanol para o risco de câncer de boca. 56

INDICE DE QUADROS

Quadro 1: Primers utilizados nas reações da Reação em Cadeia da Polimerase	36
Quadro 2: Apresentação do padrão de bandas para a genotipagem dos polimorfismos.....	37
Quadro 3: Combinação dos polimorfismos dos genes ADH1B para a formação dos haplótipos.	43

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1.	O carcinoma epidermóide de boca.....	18
1.2.	O etanol e o acetaldeído	19
1.3.	Genes de metabolização do etanol	22
1.3.1.	Álcool Desidrogenase 1B (ADH1B).....	22
1.3.2.	Álcool Desidrogenase 1C (ADH1C).....	24
1.3.3.	Citocromo P450 2E1 (CYP2E1).....	26
1.4.	Genes de metabolização do acetaldeído	27
1.5.	Genes de reparo do DNA.....	28
2.	OBJETIVOS.....	30
3.	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1.	Descrição da Casuística.....	31
3.2.	Descrição das análises dos polimorfismos	34
3.3.	Descrição das reações de digestão com enzimas de restrição....	36
3.4.	Interpretação do consumo de etanol.....	41
3.5.	Análise estatística.....	42
4.	RESULTADOS	44
5.	DISCUSSÃO.....	57
6.	CONCLUSÃO	66
7.	REFERÊNCIAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

1.1. O carcinoma epidermóide de boca

O carcinoma epidermóide é uma neoplasia que pode ter origem do revestimento mucoso de vários sítios das vias aerodigestivas superiores. Dentro da cavidade oral a língua é o sítio primário com maior incidência dos tumores de boca. Em de 2011, no Brasil, segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), foram estimados 14.120 casos novos de câncer da cavidade oral. Destes, 4190 estavam no Estado de São Paulo, o que representa uma incidência de 16,84/100000 habitantes entre os homens e 4,75/100000 entre as mulheres (INCA, 2011). A incidência é maior em indivíduos entre a quinta e sétima décadas de vida, porém alguns estudos indicam uma tendência de diminuição da idade de acometimento, com muitos casos diagnosticados em homens jovens na faixa de 40 anos de idade (HOOGSTEEN *et al.*, 2007). Nos ambulatórios de cirurgia de cabeça e pescoço são raros os pacientes que referem nunca terem fumado ou bebido. O papel que o tabaco desempenha no desenvolvimento dos carcinomas primitivos do revestimento mucoso das vias aerodigestivas superiores tem sido exaustivamente estudado, tanto na identificação dos agentes carcinogênicos quanto no seu mecanismo de ação. Entretanto, admite-se a ocorrência de outros fatores que podem atuar sinérgica ou isoladamente ao tabaco como, por exemplo, o hábito de consumir etanol. Considerado por alguns autores o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer das vias aerodigestivas superiores e que potencializa a ação do tabaco. Segundo estudos, pacientes portadores de câncer

do trato aerodigestivo, que possuíam consumo maior que 80 gramas por dia de etanol, apresentavam maior risco ($RR=18$) de desenvolverem câncer do que pacientes não etilistas; pacientes com habito de fumar apresentam risco relativo pouco maior ($RR= 5$) quando comparados aos não tabagistas; e os etilistas e tabagistas apresentaram risco 44 vezes maior de desenvolver câncer das vias aerodigestivas quando comparados com os pacientes não etilistas e não tabagistas ($RR=44$) (SZABO, 1999; FORASTIERE *et al.*, 2001; NEVILLE e DAY, 2002). Algumas hipóteses têm sido relatadas entre a associação do câncer e o consumo de etanol que, por suas características co-carcinógenicas, podem modificar as estruturas das células das mucosas da boca tornando-as permeáveis às substâncias potencialmente carcinogênicas.

Outros autores relatam o acetaldeído, produto de oxidação do etanol, como o responsável pelo risco de desenvolvimento da neoplasia. Especula-se que tanto o etanol como o acetaldeído possam interferir nos mecanismos epigenéticos e ter um importante papel na gênese do tumor. (WIGHT; OGDEN, 1998; SZABO, 1999).

1.2. O etanol e o acetaldeído

O etanol ou álcool etílico é o álcool presente em destilados, cervejas e outras bebidas alcoólicas. É uma molécula pequena capaz de penetrar nas membranas celulares e, eventualmente, pode causar injúria à célula. (CRABB *et al.* 2004). Logo após sua ingestão, o etanol é absorvido principalmente pela mucosa do

sistema digestório, estômago e intestino, embora uma pequena parte seja absorvida pela mucosa oral. O etanol, por ser uma molécula hidrofílica entra no sistema circulatório distribuindo-se por todos os tecidos que contenham água, como coração, músculos, cérebro, etc. Entretanto, o etanol sistêmico não fica acumulado no organismo, pois tem efeito tóxico devendo ser eliminado. Há duas formas de eliminação deste composto: uma pequena parte pode ser eliminada sem qualquer oxidação diretamente pelo suor e urina ou secretado junto à saliva retornando à cavidade oral (cerca de 5 a 15%) (HENDRIKS, 2005). Porém, a principal via de eliminação ocorre no fígado e em tecidos extra-hepáticos que contenham ação das Álcool Desidrogenases (ADH) e Citocromo P450 2E1 (CYP2E1), onde cerca de 90% do etanol que foi ingerido é metabolizado.

O processo de oxidação ocorre em duas etapas, na primeira o etanol sofre oxidação das enzimas ADH's e enzimas CYP2E1 convertendo o etanol a acetaldeído (Figura1).

O acetaldeído endógeno é produzido por todos os tecidos do corpo humano que tenham atividade da ADH e pela ação da CYP2E1. Também possui alta afinidade pela água e é distribuído por todo o organismo e pode ser excretado sem qualquer oxidação pela saliva. Contudo o principal mecanismo de eliminação se dá pela oxidação. Inicia-se a segunda fase, na qual o acetaldeído é convertido pela ação da enzima mitocondrial Aldeído Desidrogenase (ALDH) a acetato, que posteriormente será utilizado pelas células na obtenção de energia pelo ciclo de KREBS. (BRENNAN *et al*, 2004)

Existem outras fontes de etanol e acetaldeído endógenos, que podem ser provenientes da inalação dos subprodutos da queima do cigarro, poluição

ambiental e da ação bacteriana na boca e estômago, onde em baixa concentração de oxigênio, pode produzir tanto o etanol como acetaldeído, ocasionando seu acúmulo local. (Seitz e Becker, 2007; HOMANN *et al.*, 1997)

O acúmulo de acetaldeído e etanol também podem estar associados a fatores intrínsecos ao hospedeiro com alterações na atividade das enzimas que metabolizam o etanol e acetaldeído. Podendo ser ocasionadas devido a mutações ou polimorfismos em genes que as transcrevem.

O acúmulo do acetaldeído pode promover alterações nas cromátides irmãs, ocasionar perdas cromossômicas, interferir no mecanismo de replicação celular, síntese e reparo do DNA (XPD) , além de formar ligações com o DNA (adutos) e proteínas citoplasmáticas (SEITZ E STICKEL, 2007). Recentemente, Yang e colaboradores revelaram também que o acetaldeído pode induzir a metaplasia do epitélio traqueal por causar injúria celular associada à hiper-regeneração. (Figura1) (YANG *et al.*, 2010).

Assim, as variações funcionais correspondentes às atividades enzimáticas da classe I de ADH ou em enzimas que participam em algum nível do metabolismo de etanol constituem-se em possíveis marcadores moleculares para o risco de câncer de boca (NAYAK *et al.*, 2008).

Figura 1: Esquema representando a via de metabolismo de etanol a acetaldeído, pela ação das enzimas ADH e CYP2e1; metabolismo de acetaldeído a acetato, pela enzima ALDH; a interferência do acetaldeído no DNA com a formação de adutos; e ação das enzimas XPD na promoção do reparo do DNA. (Adaptado de ZYGOGIANNI, KYRGIAS, MYSTAKIDOU, *et al.*, 2011)

1.3. Genes de metabolização do etanol

1.3.1. Álcool Desidrogenase 1B (ADH1B)

Existem 5 diferentes classes de ADH e 7 isoenzimas, α , β e γ (ADH1A, ADH1B e ADH1C, respectivamente), que correspondem à classe 1, π na classe 2, χ na classe 3, ADH7 na classe 4 e ADH6 na classe 5 (figura 2). As

subunidades da classe I de ADH podem ser formadas por homo ou heterodímeros (α/α , β/β , γ/γ , α/β , α/γ , e β/γ) (BRENNAN et al. 2004).

Figura 2: Representação gráfica da localização dos genes de metabolismo de etanol de classe I. Fonte: (OSIER & al., 2004)

As enzimas de classe 1 de ADH (ADH1A, ADH1B e ADH1C) possuem estruturas proteicas similares, diferindo por pequenas modificações entre as sequências de aminoácidos que as compõem, e estas diferenças resultam em enzimas de atividades metabólicas e de preferência pelo substrato em diferentes faixas. Contudo, ainda existem variações genômicas, alteração de uma única base do DNA (SNP), que também podem codificar enzimas de diferentes atividade e afinidade pelo substrato, como ocorre nos genes ADH1B e ADH1C. O gene ADH1B apresenta 2SNP's nas regiões codificantes que alteram a transcrição de 2 aminoácidos da proteína, nos códons 47 e 369, e podem formar três tipos de subunidades de enzima: a *ADH1B*1*, composta pelo 47Arg e 369Arg, o *ADH1B*2* alelo composto por 47His e 369Arg; e *ADH1B*3* formado por 47Arg e 369Cys.

Osier et al. 2004, não observaram a dupla variação (47His e 369Cys), mas consideravam que poderia existir. A ADH1B*1 tem alta afinidade pelo substrato e baixa capacidade de oxidação, em contraste dos alelos ADH1B*2 e ADH1B*3, que possuem baixa afinidade pelo etanol e alta capacidade de oxidação (OSIER *et al.* 2004).

Recentemente Yokoyama, Omori e Yokoyama estudando pacientes com hábito etilista relataram que portadores das subunidades ADH1B*1 possuem maior risco de câncer orofaringe e esôfago por terem enzimas de menor atividade. Relataram também que portadores da subunidade ADH1B*1 apresentam maiores concentrações de etanol e acetaldeído do que pacientes portadores de outras subunidades (ADH1B*2 e ADH1B*3) (YOKOYAMA, OMORI e YOKOYAMA, 2010).

1.3.2. Álcool Desidrogenase 1C (ADH1C)

O gene que codifica a enzima *ADH1C* também apresenta variações enzimáticas, provenientes de alterações genéticas do gene *ADH1C*, que podem produzir dois tipos de isoenzimas, *ADH1C*1* e *ADH1C*2*. Estas variações são resultantes de duas substituições de aminoácidos na proteína, de Arginina para uma Glutamina no códon 271 e de uma Isoleucina por uma Valina no códon 349 (ZEE *et al.* 2004).

A isoenzima *gamma1* ou *ADH1C*1* metaboliza o etanol 2,5 vezes mais rápido que a *ADH1C*2* e indivíduos homozigotos para enzimas de metabolização rápida *ADH1C* e *ADH1B 2* têm concentração de acetaldeído mais alta (PETERS *et al.*, 2005). Em vista disto, vários trabalhos têm procurado

relacionar o polimorfismo do ADH com o risco de câncer de boca e/ou orofaringe associado ao consumo de etanol (PETERS *et al.* 2005; YOKOYAMA *et al.*, 2001). Tem sido relatada uma frequência aumentada de indivíduos polimórficos para o gene ADH em etilistas crônicos e com câncer das vias aerodigestivas superiores que também apresentavam concentração salivar de acetaldeído mais elevada após a ingestão de etanol (VISAPÃÃ *et al.*, 2004; HASHIBE *et al.*, 2006).

Peters *et al.* observaram uma significativa interação entre o consumo de etanol e polimorfismo do gene ADH1C e um aumento do risco de 7,1 vezes para câncer de boca entre os etilistas crônicos homozigotos polimórficos comparado com o risco de 2,3 para os heterozigotos e homozigotos selvagens. Concluem que o alelo ADH1C modifica a dose-resposta ao efeito carcinogênico do etanol e do tabaco no carcinoma de cabeça e pescoço, mas também que o etanol tem um efeito direto na mucosa bucal e que o risco de câncer não é mediado por seus metabólitos (PETERS *et al.*, 2005).

Nishimoto *et al.* estudando os polimorfismos dos genes ADH's como fator de risco para o desenvolvimento do câncer de via aerodigestiva superior, observaram um aumento significativo do risco apenas entre aqueles indivíduos com baixo consumo de etanol, mais tarde Wang *et al.* não confirmaram o aumento do risco do câncer, mas relataram que poderia estar associado ao pior prognóstico (NISHIMOTO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005).

Outros estudos não identificaram influência entre o consumo de etanol correlacionado aos polimorfismos nos genes ADH's e o risco de desenvolvimento do câncer de boca e/ou orofaringe, mas relataram a necessidade de mais estudos

nas vias de metabolismo de etanol por não saber exatamente em quais vias metabólicas o etanol pode interferir. (BRENNAN *et al.*, 2004; STUGIS *et al.*, 2001).

1.3.3. Citocromo P450 2E1 (CYP2E1)

O gene citocromo P450 subunidade IIE1 ou CYP2E1 está localizado no cromossomo 10q26.3, e é transcrito em uma proteína de aproximadamente 56KD. (OMIN 124040). É uma proteína induzida pelo etanol e representa uma outra via de degradação do etanol a aldeído por meio dos microsossomos. Esta proteína também está relacionada ao metabolismo de drogas, hormônios, xenobióticos e tem como característica produzir radicais livres e aumentar em até 30% a produção de acetaldeído endógeno. É expresso em sítios em que o etanol pode causar grandes danos, como fígado, cérebro e pâncreas. (WANG, *et al.* 2009)

O gene CYP2E1 também é polimórfico e algumas patologias como câncer colo retal e de esôfago são descritas associadas a alterações de sua expressão, causadas por variações na região promotora do gene. (HOWARD, AHLUWALIAB, *et al.*, 2003) Dois polimorfismos do tipo SNP na região reguladora. identificados pelas enzimas de restrição *PstI* e *RsaI*, são relatados em literatura associados ao aumento da expressão gênica de até 10 vezes maior, quando comparados com os não portadores dos polimorfismos e que este fenômeno estaria associado ao aumento da produção de acetaldeído endógeno em indivíduos etilistas (POSCHL e SEITZ, 2004) . Outro polimorfismo descrito em literatura do gene é um polimorfismo de inserção na região promotora de 96pb que fornece as enzimas codificadas de alta atividade metabólica, conhecida com CYP2E1*D. Poucos

autores relatam haver associação deste polimorfismo com a predisposição à dependência química, ao etilismo, tabagismo e a alguns tipos de câncer, entre eles o de cabeça e pescoço, entretanto há pouco relato a respeito deste polimorfismo, sendo necessário mais estudos para comprovar tal associação. (SEITZ E HEIDELBERG, 2002).

1.4. Genes de metabolização do acetaldeído

A enzima ALDH mitocondrial de classe II é a principal responsável pela oxidação do acetaldeído, devido a sua alta afinidade pelo mesmo. O gene que codifica a enzima está localizado na posição 24.2 do braço longo do cromossomo 12. Este gene apresenta variações genômicas que transcrevem proteínas de diferentes atividades enzimáticas. Um dos polimorfismos que apresenta alta frequência nas populações asiáticas é o ALDH2 Glu504Lys, que codificam 2 tipos de isoenzimas, o ALDH2*1 (“alelo selvagem”) e ALDH2*2 que se diferenciam por um ponto de mutação do aminoácido na posição 487, por substituição de uma Lisina por um Ácido Glutâmico, resultante de uma transição do G → A no nucleotídeo 1510. O alelo ALDH2*1 é frequentemente encontrado na maioria das populações e é mais ativo que o alelo ALDH2*2. Dessa forma, alguns autores consideram a isoforma ALDH2*2 a forma inativa da proteína, e tem sido relacionada à proteção ao alcoolismo associada ao acúmulo do acetaldeído endógeno. (NAYAK et al., 2008).

Por outro lado, alguns autores relatam a deficiência de atividade da enzima como fator de risco para câncer de esôfago e orofaringe, ocasionado pela ação do acetaldeído diluído em saliva em contato com as mucosas, entretanto, não se encontram resultados significativos para outros tipos de tumores em sítios que também possuem contato direto com o acetaldeído, como o estômago e o tecido hepático (CRABB, MATSUMOTO, & CHANG, 2004).

A associação do polimorfismo ALDH2 Glu504Lys, para o câncer não é um consenso. Recentemente Ji *et al.* estudando o mesmo polimorfismo em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço na população da Coreia, não encontraram resultados significativos (Ji *et al.*, 2011)

1.5. Genes de reparo do DNA

O gene XPD (ERCC2), localizado no cromossomo 19q13.3, transcreve a proteína helicase, subunidade do fator *TFIIH*. A proteína XPD está envolvida em diversos processos biológicos, como a transcrição de genes, duplicação do DNA, controle do ciclo celular, entre outros. É responsável também pela manutenção e integridade do material genômico, consertando erros de transcrição pela via de reparo por excisão de nucleotídeo (NER). Por esta via são reparados os adutos de DNA promovidos pelo acetaldeído (SKJELBRED *et al.*, 2006; LIU, G *et al.*, 2007). Polimorfismos neste gene podem alterar a atividade do complexo *TFIIH*, promovendo erros de transcrição, de reparo e atividades celulares anormais nas respostas apoptóticas (SKJELBRED *et al.*, 2006).

Estudos revelaram que os polimorfismos no gene XPD resultariam em enzimas com menores atividades funcionais, ou seja, perda da atividade da proteína XPD, por alterar a ligação entre os demais componentes que formam o complexo TFIIH. Como relata Sturgis *et al.* estudando os polimorfismos XPD Lys751Gln (rs 13181) e XPD G23591A (rs 1799793) (STURGIS, ZHENG, LI, & al., 2000)

Recentemente, um estudo de meta análise sugere que o alelo polimórfico do XPD Lys751Gln pode ser um fator de risco para o câncer de esôfago, explicado pela deficiência de transcrição e de reparo do DNA, entretanto sugere que são necessários mais estudos para comprovar seus achados (YUAN, CUI, ZHAO, & al., 2011). Sturgis *et al.* estudando os mesmos polimorfismos não encontraram associação para o desenvolvimento de câncer das vias aerodigestivas, mas sugeriram que poderia ocorrer, pois seus resultados ainda que não estatisticamente significativos, apontavam para uma possível correlação. (STURGIS *et al.*, 2000).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral: o presente estudo pretende avaliar o etanol no desenvolvimento do câncer de boca.

Objetivo específico: avaliar a frequência dos polimorfismos ADH, ALDH, CYP2E1 e XPD como fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de boca.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Descrição da Casuística

Para o estudo dos polimorfismos foram selecionados 95 pacientes portadores de câncer de cavidade bucal atendidos pelo Hospital das Clínicas e 113 pacientes atendidos no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e de Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis entre os anos de 2002 e 2008, totalizando 208 casos e 217 controles que fazem parte do projeto Temático Genoma Clínico do Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço – Estudo de Marcadores de Agressividade (Fapesp 04/15022-0) e que já tiveram o DNA extraído de acordo com o protocolo estabelecido por Sambrook e Russel (2006) de amostras de sangue coletadas e que estão armazenadas no banco de amostras do Hospital Heliópolis. O critério de inclusão dos casos considerou pacientes com idade acima de 30 anos, não tratados previamente e sem sinais clínicos de infecção na cavidade bucal. Foram excluídos os pacientes e controles imunodeprimidos, diabéticos, sob terapêutica antibiótica e portadores de câncer de localização diferente da cavidade bucal.

Após esclarecimento da natureza e objetivos do projeto, os indivíduos sujeitos da pesquisa foram convidados a assinarem o termo de consentimento esclarecido.

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis e pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o protocolo nº167/10.

Considerando o gênero, idade e hábitos como variáveis relacionadas ao desenvolvimento do câncer de boca, a amostra foi pareada em relação a estes indicadores epidemiológicos. A maioria dos indivíduos estudados é do gênero masculino.

Quanto aos hábitos de etilismo e de tabagismo foram considerados não tabagistas/ não etilistas os pacientes que nunca possuíram o hábito ou eram etilista /tabagista esporádicos (finais de semana ou eventualmente); pacientes que haviam parado de beber ou fumar há mais de dez anos foram classificados como “só no passado”; e pacientes que ainda possuíam o hábito foram classificados como “sim, ainda bebe” ou “sim, ainda fuma”. Desse modo podemos observar que tanto na população caso como controle são predominantes os pacientes que ainda possuíam o hábito de beber ou fumar (Tabela1)

Tabela 1: Apresentação das características epidemiológicas da população em estudo.

Epidemiologia	Casos	Controles
Gênero		
Feminino	34	29
Masculino	174	188
Faixa etária		
< 40	8	17
40 – 49	54	68
50 – 59	75	68
60 – 69	49	45
≥ 70	22	19
Etilismo		
Nunca	24	47
Sim, ainda bebe	126	94
Só no passado	55	74
Ignorado	3	2
Tabagismo		
Nunca fumou	13	41
Sim, ainda fuma	155	107
Somente no passado	37	67
Ignorado	3	2
Total	208	217

3.2. Descrição das análises dos polimorfismos

Foram estudados os polimorfismos dos genes ADH1B Arg47His, ADH1B Arg369Cys, ADH1C Ile350Val, CYP2E1 Ins98pb, ALDH2 G1510A e XPD Lys751Gln.

A análise dos polimorfismos foi realizada por meio da técnica de PCR-RFLP, que consiste na amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) seguido do tratamento com enzimas de restrição específicas para mutações de base única (restriction fragment length polymorphism). Foram utilizados os oligonucleotídeos (primers) Forward 5'-GGG ATT AGT AGC AAA ACC CTC A-3' Reverse R- 5'-TCA CCC CTT CTC CAA CAC TC-3' e enzima de restrição *RseI* (fermentas®) para identificação do polimorfismo do gene ADH1B (rs1229984); Forward: 5'-ACC AAA TGT ATG GGG ATG GA-3' , Reverse: 5'-ATT GCC TCA AAA CGT CAG GA-3' e enzima de restrição *AlwNI* (fermentas®) para identificação do polimorfismo ADH1B (rs2066702) e para o polimorfismo do gene ADH1C (rs698) foram utilizados os oligonucleotídeos F: 5'-TTG TTT ATC TGT GAT TTT TTT TGT-3' R: 5'- CGT TAC TGT AGA ATA CAA AGC-3' e enzima de restrição *SspI* (fermentas ®), adaptados do protocolo utilizado por Garcia et al.(2010). (Quadro 1)

Para a identificação do polimorfismo de inserção do gene CYP2E1, foram utilizados os oligonucleotídeos: Forward: 5' - GTG ATG GAA GCC TGA AGA ACA - 3' e Reverse 5' - CTT TGG TGG GGT GAG AAC AG - 3', construídos com o auxílio do programa *primer3* e as sequências adquiridas foram avaliadas com a

utilização da ferramenta BLAST do site NCBI a fim de analisar sua especificidade. O *amplicon* gerado foi ainda sequenciado pelo método de *SANGER* para confirmar se a região de interesse do estudo. (Quadro 1)

Para análise do polimorfismo do gene ALDH2 (rs671) foram utilizados os oligonucleotídeos R: 5' - CTT TGG TGG GGT GAG AAC AG - 3' e F: 5'-AAC CCA TAA CCC CCA AGA GT-3' e enzima de restrição TspRI (fermentas®) (adaptado de Lee et al. 2009). (Quadro 1)

O polimorfismo do gene XPD (rs13181) foi identificado com auxílio da enzima de restrição PstI (fermentas®) e oligonucleotídeos Forward 5'-GGA TCA AAG AGA CAG ACG A-3 e Reverse 5'-GCG AGG AGA CGC TAT CAG-3' (adaptado de Sturgis et al. 2000). (Quadro 1)

Para a reação da PCR foram utilizados 50-100ng de DNA genômico previamente purificado, tampão de PCR 10X concentrado, 50mM de MgCl₂, 10pMol de primer Forward e Reverse, 10mMol de dNTP e 1U de Taq Polimerase, em volume final de 20ul.

As condições de ciclagem para gerar o *amplicon* incluíram a desnaturação por 5 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, anelamento durante 30 segundos à temperatura de 58°C para ação dos *primers* e extensão por 30 segundos a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídio 12%.

Quadro 1: Primers utilizados nas reações da Reação em Cadeia da Polimerase

GENE	ENZIMA	POLIMORFISMO	SEQUÊNCIA	AMPLICON
ADH1B	<i>RseI</i>	Arg47His (rs1229984)	F : 5'-GGG ATT AGT AGC AAA ACC CTC A-3' R: 5'-TCA CCC CTT CTC CAA CAC TC-3'	243pb
	<i>A/wNI</i>	Arg369Cysc (rs2066702)	F: 5'-ACC AAA TGT ATG GGG ATG GA-3' R: 5'-ATT GCC TCA AAA CGT CAG GA-3'	173pb
ADH1C	<i>SspI</i>	Ile350Val (rs698)	F: 5'-TTG TTT ATC TGT GAT TTT TTT TGT R: 5'- CGT TAC TGT AGA ATA CAA AGC	378pb
<i>CYP2E1</i>	-	Ins96pb	F: 5' - GTG ATG GAA GCC TGA AGA ACA - 3' R: 5' - CTT TGG TGG GGT GAG AAC AG - 3'	729pb
<i>ALDH2</i>	<i>TspRI</i>	G1510A (rs671)	F: 5'-AAC CCA TAA CCC CCA AGA GT-3' R: 5'-CAG GTC CCA CAC TCA CAG TTT-3'	180pb
ERCC2/XPD	<i>PstI</i>	Lys751Gln (rs13181)	F: 5'-GGA TCA AAG AGA CAG ACG A-3 R: 5'-GCG AGG AGA CGC TAT CAG-3'	171pb

3.3. Descrição das reações de digestão com enzimas de restrição

O tratamento com as enzimas de restrição foi realizado com 8µL do produto de PCR, 1µl enzima *fast digest* (Fermentas Life sciences®), respectivas para cada polimorfismo e 1µl de *buffer solution* (quadro 2). Estes componentes foram incubados em temperatura de 37°C overnight. Após a incubação foram adicionados 5 µL de corante- *Loading Buffer* ao produto de digestão e submetidos à eletroforese em gel de poliacrílamida 12% para o polimorfismo do gene ADH1B Arg369Cys (figura 3) e em gel de agarose 3% para os demais polimorfismos (figuras 4,5,6,7 e 8). Após o término da eletroforese os géis foram corados com

brometo de etídio (1mg/mL) e genotipados sobre luz ultravioleta de acordo com o quadro 2. Foram utilizados marcadores moleculares para a eletroforese de acordo com o tamanho e a diferença entre os fragmentos a serem observados.

Quadro 2: Apresentação do padrão de bandas para a genotipagem dos polimorfismos.

Polimorfismo	Enzima	Genotipagem
ADH1B Arg47His	<i>RseI</i>	PCR - 243pb
		Homozigoto G - 243pb
		Heterozigoto A/G - 243 pb, 145pb e 98pb
		Homozigoto A - 145b e 98pb
ADH1B Arg369Cys	<i>AlwNI</i>	PCR - 173pb
		Homozigoto C - 173pb
		Heterozigoto C/T - 173pb, 145pb e 28pb
		Homozigoto T - 145pb e 28pb
ADH1C Ile350Val	<i>SspI</i>	PCR - 378pb
		Homozigoto G (Ile) - 274pb e 104pb
		Heterozigoto G/A (Ile/Val) - 378pb, 274pb e 104pb
		Homozigoto A (Val) - 378pb
CYP2E1	--	PCR - 633pb
		Ins98pb - 729pb
ALDH2 Glu504Lys	<i>TspRI</i>	PCR - 180pb
		Homozigoto G - 155pb e 25pb
		Heterozigoto G/A - 180pb, 155pb e 25pb
		Homozigoto A - 180pb
		PCR - 171pb
		Homozigoto A - 144pb e 27pb
		Heterozigoto A/C- 144pb, 81pb, 63pb e 27pb
XPD Lys751Gln	<i>PstI</i>	Homozigoto C - 81pb, 63pb e 27pb

Figura 3: Imagem do gel de eletroforese (poliacríamida 12%) para a identificação do polimorfismo do gene ADH1B Arg369Cys. O produto de PCR foi tratado com a enzima de restrição AlwNI (Fermentas Life sciences®) e corado em brometo de etídeo 10mg/ml. A genotipagem foi realizada da seguinte forma: Homozigotos para o alelo C (C/C), quando presentes somente as bandas de 173pb; Heterozigotos (C/T), quando presentes as bandas de 173pb,145pb e 28pb (não visíveis); e quando presente somente as bandas de 145pb e 28pb eram classificadas como homozigotos para o alelo T (T/T)

Figura 4: Imagem do gel de eletroforese (agarose 3%) para a identificação do polimorfismo do gene ADH1B Arg47His. O produto de PCR foi tratado com a enzima de restrição RseI (Fermentas Life sciences®) e corado em brometo de etídeo 10mg/ml. A genotipagem foi realizada da seguinte forma: Homozigotos para o alelo G (G/G), quando presentes somente as

bandas de 173pb; Heterozigotos (C/T), quando presentes as bandas de 173pb, 145pb e 28pb (não visíveis); e quando presente somente as bandas de 145pb e 28pb eram classificadas como homozigotos para o alelo T (T/T)

Figura 5 Imagem do gel de eletroforese (agarose 3%) para a identificação do polimorfismo do gene ADH1C Ile350Val, tratado com a enzima de restrição Sspl (Fermentas Life Sciences®) e corado em brometo de etideo 10mg/ml. . A genotipagem foi realizada da seguinte forma: Homozigotos para o alelo G (G/G), quando presentes somente as bandas de 274pb e 104pb; Heterozigotos (G/A), quando presentes as bandas de 378pb, 274pb e 104pb ; e quando presente somente as bandas de 378pb eram classificadas como homozigotos para o alelo A (A/A)

Figura 6: Imagem do gel de eletroforese (agarose 3%) para a identificação do polimorfismo de inserção no gene CYP2E1 corado como brometo de etideo 10mg/ml. A presença do polimorfismo de inserção no gene, era identificado pelo amplicon de 729pb, quando não portador do polimorfismo o amplicon continha 633pb.

Figura 7: Imagem do gel de eletroforese (agarose 3%) para a identificação do polimorfismo do gene ALDH2 tratado com enzima de restrição AlwNI (Fermentas Life Sciences), corado como brometo de etideo 10mg/ml. . A genotipagem foi realizada da seguinte forma: Homozigotos para o alelo G (G/G), quando presentes somente as bandas de 155pb e 25pb (bandas não visíveis); Heterozigotos (G/A), quando presentes as bandas de 180pb, 155pb e 25pb (não visíveis); e quando presente somente as bandas de 180pb, foram classificadas como homozigotos para o alelo A (A/A)

Figura 8: Imagem do produto de PCR par o polimorfismo do gene XPD Lys751Gln, tratado com a enzima de restrição PstI (Fermentas Life Sciences) submetido à eletroforese em gel de agarose 3% corado como brometo de etideo 10mg/ml. . A genotipagem foi realizada da seguinte forma: Homozigotos para o alelo A (A/A), quando presentes somente as bandas de 144pb e 27pb (bandas não visíveis); Heterozigotos (A/C), quando presentes as bandas de 144pb,81pb,63pb e 27pb (não visíveis); e quando presente somente as bandas de 81pb, 63pb e 27pb, eram classificadas como homozigotos para o alelo C (C/C)

3.4. Interpretação do consumo de etanol

Os relatos de consumo médio de etanol dos pacientes etilistas (“sim, ainda bebe” ou “só no passado”) foram calculados da seguinte forma:

$$GI \times RC \times d = m \text{ etOH}$$

GI = Graduação alcoólica da bebida (48%, 12% ou 5%)

RC= Relato do consumo médio diário em mililitros

d= Densidade do etanol (0,8)

m etOH= média em gramas de etanol consumidos por dia

(Fonte: adaptado do Departamento de Adolescência da SBP, Adolescência & Saúde volume 4 nº 3 agosto 2007)

A graduação alcoólica adotada foi considerada de 48% para destilados, 12% para vinho e 5% para cervejas; assim, a quantidade média de consumo de etanol relatado por um paciente que tem como hábito consumir 1L de destilado por dia é de 384g/dia (Fonte: adaptado do Departamento de Adolescência da SBP, Adolescência & Saúde volume 4 nº 3 agosto 2007)

Foram calculadas as quantidades médias de consumo de etanol de cada paciente de acordo com seu relato, após o cálculo de consumo de todos os pacientes, foi realizado o modelo de Curva ROC a fim de determinar o ponto de corte para o cálculo estatístico quanto ao consumo de etanol total, ou seja, a quantidade ingerida pelo tempo de consumo em anos (g/dia/ano) e quanto ao consumo diário (g/dia).

3.5. Análise estatística

Foram realizados testes estatísticos entre os grupos caso e controle adotando-se o teste de qui-quadrado (teste exato de Fisher) para caracterizar a casuística quanto ao gênero, faixa etária, etilismo e os polimorfismos. As variáveis que apresentaram níveis de significância menor que $p < 0,2$ foram utilizadas no modelo de regressão logística multivariada, adotando-se como fator de risco o *odds ratio* e seu intervalo de confiança como proposto por Snow em 1953, citado

por Rumel (RUMEL, 1986). Os testes estatísticos foram realizados adotando-se os níveis de significância de liliefors ($p < 0,05$)

Quanto ao consumo de etanol, foi realizado o método de curva ROC (*Receiver operating characteristic*) para determinar o ponto de risco (quantidade de etanol consumida) para o risco de câncer oral. Neste teste é avaliada a sensibilidade e a especificidade entre o consumo e o câncer oral.

As análises estatísticas para os polimorfismos do gene ADH1B foram realizadas quanto ao haplótipo, ou seja, com a combinação dos alelos ADH1B Arg47His e ADH1B Arg369Cys (quadro 3).

Quadro 3: Combinação dos polimorfismos dos genes ADH1B para a formação dos haplótipos.

Haplotipo	Polimorfismo
ADH1B*1	47Arg (G) e 369Arg (C)
ADH1B*2	47His (A) e 369Arg (C)
ADH1B*3	47Arg (G) e 369Cys (T)

4. RESULTADOS

Foi utilizado a curva ROC para determinar um ponto de risco para o câncer oral quanto ao consumo de etanol (figura 9). O valor indicado que representa o aumento de risco são os pacientes que tem como hábito ingerir uma quantidade maior que 63g/dia de etanol.

Figura 9: Curva ROC de quantidade média de etanol consumida por dia ($p < 0,05$ para consumo menor que 63g/dia).

A tabela 2 apresenta distribuição entre os casos e controles quanto ao consumo diário de etanol indicado pela curva ROC, e observa-se que o consumo

maior que 63g/dia é mais freqüente entre os casos (59,4%) do que nos controles (40,3%). E os pacientes que possuíam o hábito de consumir menos etanol são mais frequentes entre os controles (59,7%) do que nos casos (40,3%).

Tabela 2: Distribuição entre casos e controles quanto ao consumo médio diário, utilizando-se o ponto de riscos indicado pela curva ROC.

Consumo	Caso	Controle	P- Value ¹	Odds Ratio	C.I. 95%	P-Value
Menor que 63g/dia	65 (40,6%)	95 (59,7%)	<u>0,0004</u>	1	Referência	
Maior que 63g/dia	95 (59,4%)	64 (40,3%)		<u>2,1695</u>	<u>1,3872-3,3929</u>	<u>0,0007</u>

A tabela 3,apresenta a distribuição dos polimorfismos quanto ao hábito de consumir etanol, “Não etilista”, “Só no passado” e “Sim,ainda bebe”. Não foram encontrados resultados estatisticamente significativos para nenhum dos polimorfismos.

Tabela 3: Distribuição dos polimorfismos quanto ao hábito de consumir etanol.

	Não etilista	Só no passado	Sim, ainda bebe	P
ADH1B Arg47His				
GG	48 (87,%)	85 (87,6%)	156 (93,4%)	
GA	6 (10,9%)	11 (11,3%)	10 (6%)	0,4748
AA	1 (1,8%)	1 (1%)	1 (0,6%)	
GA+AA	7 (12,7%)	12 (12,4%)	11 (6,6%)	0,1949
ADH1B Arg369Cys				
CC	51 (92,7%)	90 (92,8%)	154 (92,2%)	
CT	4(7,3%)	7 (7,2%)	10 (6%)	0,571
TT	0	0	3 (1, *%)	
CT+TT	4 (7,3%)	7 (7,2%)	13 (7,8%)	0,9829

ADH1B haplotipo				
ADH1B*1	44 (80%)	79 (81,4%)	143 (85,6%)	
ADH1B*2	7 (12,7%)	11 (11,3%)	11 (6,6%)	0,6016
ADH1B*3	4 (7,3%)	7 (7,2%)	13 (7,8%)	
ADH1B*2+ADH1B*3	11 (20%)	18 (18,6%)	24 (14,4%)	0,5154
ADH1C				
Ile/Ile	33 (60%)	62 (63,9%)	110 (65,9%)	
Ile/Val	19 (34,5%)	29 (29,9%)	45 (26,9%)	0,8627
Val/Val	3 (5,5%)	6 (6,2%)	12 (7,2%)	
Ile/Val+Val/Val	22 (40%)	35 (36,1%)	57 (34,1%)	0,7306
CYP2E1				
WT	45 (81,8%)	77 (79,4%)	136 (81,4%)	
INS	10 (18,2%)	20 (20,6%)	31 (18,6%)	0,9023
ALDH2				
GG	44 (80%)	67 (69,1%)	115 (68,9%)	
GA	9 (16,4%)	22 (22,7%)	38 (22,8%)	0,562
AA	2 (3,6%)	8 (8,2%)	14 (8,4%)	
GA+AA	11 (20%)	30 (30,9%)	52 (31,1%)	0,2596
TOTAL	55	97	167	

A distribuição do consumo médio em gramas por dia de etanol apresentada na tabela 4, indica que apenas o polimorfismo do gene ADH1C foi estatisticamente significativo para o consumo de etanol, maior ou menor que 63g/dia. Observa-se que 74% dos pacientes não portadores do polimorfismo (Ile/Ile) apresentam consumo de etanol menor que 63g/dia e 58% dos pacientes apresentam consumo maior. Entre os portadores do polimorfismo (Val), a frequência é maior entre os que possuem hábito de ingerir mais que 63g/dia de etanol, cerca de 41% dos pacientes.

Tabela 4: Distribuição dos polimorfismos quanto ao consumo médio de etanol em gramas por dia

Polimorfismo	Consumo		P
	Menor que 63g/dia	Maior que 63g/dia	
ADH1B Arg47His			
GG	89 (89%)	148 (93,1%)	0,2981
GA	11 (11%)	10 (6,3%)	
AA	0(0%)	1 (0,6%)	
GA+ AA	11 (11%)	11 (6,9%)	0,17872
ADH1B Arg369Cys			
CC	93 (93%)	147 (92,5%)	0,9092
CT	6 (6%)	11 (6,9%)	
TT	1 (1%)	1 (0,6%)	
CT+TT	7 (7%)	12 (7,5%)	0,538291
ADH1B haplotipo			
ADH1B*1	83 (83%)	136 (84,5%)	0,6734
ADH1B*2	10 (10%)	11 (6,9%)	
ADH1B*3	7 (7%)	12 (7,5%)	
ADH1B*2+ADH1B*3	17 (17%)	23 (14,5%)	0,351784
ADH1C			
ILE/ILE	74 (74%)	93 (58,5%)	0,0335
VAL/VAL	4 (4%)	14 (8,8%)	
ILE/VAL	22 (22%)	52 (32,7%)	
ILE/VAL+VAL/VAL	26 (26%)	66 (41,5%)	0,007621
CYP2E1			
WT	80 (80%)	129 (81,1%)	0,471874
INS	20 (20%)	30 (18,9%)	
ALDH2			
GG	63 (63%)	114 (71,7%)	0,3416
GA	27 (27%)	33 (20,8%)	
AA	10 (10%)	12 (7,5%)	
GA+AA	37 (37%)	45 (28,3%)	0,092475
TOTAL	100	159	

Tabela 5: Associação entre os polimorfismos de metadolismo do etanol e acetaldeído quanto ao consumo, menor ou maior que 62g/l/dia

	Menor que 63g/dia	Maior que 63g/dia	P-Value
ADH1B+ALDH			
ADH1B*1+GG	50 (50%)	100 (62,9%)	0,1369
ADH1B*1+GA	25 (25%)	24 (15,1%)	
ADH1B*1+AA	8 (8%)	12 (7,5%)	
ADH1B*2+AA	1 (1%)	0 (0%)	
ADH1B*2+GA	2 (2%)	5 (3,1%)	
ADH1B*2+GG	7 (7%)	6 (3,8%)	
ADH1B*3+AA	1 (1%)	0 (0%)	
ADH1B*3+GA	0 (0%)	4 (2,5%)	
ADH1B*3+GG	6 (6%)	8 (5%)	
ADH1C+ALDH			
Ile/Ile+GG	49 (49%)	65 (40,7%)	0,2015
Ile/Ile+GA	18 (18%)	19 (11,9%)	
Ile/Ile +AA	7 (7%)	9 (5,7%)	
Ile/Val+GG	13 (13%)	40 (25,2%)	
Ile/Val+GA	7 (7%)	10 (6,3%)	
Ile/Val+AA	2 (2%)	2 (1,3%)	
Val/Val+GG	1 (1%)	9 (5,9%)	
Val/Val+GA	2 (2%)	4 (2,5%)	
Val/Val+AA	1 (1%)	1 (0,6%)	
CYP+ALDH			
WT+GG	50 (50%)	97 (61%)	0,3905
WT+GA	23 (23%)	23 (14,5%)	
WT+AA	7 (7%)	9 (5,7%)	
INS+GG	13 (13%)	17 (10,7%)	
INS+GA	4 (4%)	10 (6,3%)	
INS+AA	3 (3%)	3 (1,9%)	
TOTAL	100	159	

A tabela 6 apresenta o modelo de regressão logística quanto ao risco de consumir etanol (consumo médio diário) associado ao polimorfismo ADH1C

Ile350Val. Observa-se que os portadores em heterozigose apresentam risco para o etilismo (OR=1,8), mas não os portadores em homozigose do polimorfismo (p=0,08).

Tabela 6: Regressão logística entre a associação do polimorfismo de gene ADH1C e o risco de consumir etanol.

Term	Odds Ratio	C.I. 95%	P-Value
ADH1C (ILE/ILE)	1		
ADH1C (ILE/VAL)	<u>1,8807</u>	<u>1,0482 - 3,3744</u>	<u>0,0342</u>
ADH1C (VAL/VAL)	2,7849	0,8804 - 8,8098	0,0813
ADH1C (ILE/VAL+VAL/VAL)	<u>2,0199</u>	<u>1,1689 - 3,4902</u>	<u>0,0118</u>

A tabela 7 apresenta a distribuição dos polimorfismos entre os casos e controles. Observa-se que apenas os polimorfismos dos genes CYP2E1 e ALDH2 apresentam diferenças estatisticamente significativas, $p < 0,05$ e $p = 0,03$, respectivamente.

Tabela 7: Distribuição dos polimorfismos dos genes de metabolismo do etanol, acetaldeído e reparo entre os casos e controles

	Caso	Controle	P-Value ¹	Odds Ratio	C.I. 95%	P-Value ²
ADH1B Arg47His						
GG	152 (93,3%)	141 (88,1%)		1		
GA	9 (5,5%)	18 (11,3%)	0,1558	0,4638	0,2018 - 1,0661	0,0704

AA	2 (1,2%)	1 (0,6%)		1,8553	0,1664 -20,6838	0,6154
GA+AA	11 (6,7%)	19 (11,9%)	0,06	0,537	0,2469-1,1682	0,1169
ADH1B Arg369Cys						
CC	149 (91,4%)	150 (93,8%)		1		
CT	11 (6,7%)	10 (6,3%)		1,1074	0,4566-2,6855	0,8215
TT	3 (1,8%)	0 (0%)	0,2205		NA	0,9591
CT+TT	14 (8,6%)	10 (6,3%)	0,278411	1,4094	0,6069 -3,2731	0,4247
ADH1B haplotipo						
ADH1B*1	138(84,7%)	132 (82,5%)		1		
ADH1B*2	11 (6,7%)	18 (11,3%)		0,5845	0,2661-1,2843	0,1812
ADH1B*3	14 (8,6%)	10 (6,3%)	0,292	1,3391	0,5747 -3,1201	0,4986
ADH1B*2+ADH1B*3	25 (15,3 %)	28 (17,5%)	0,354	0,854	0,4735	0,6
ADH1C						
Ile/Ile	110 (67,5%)	97 (60,6%)		1		
Ile/Val	41 (25,2%)	53 (33,1%)		0,6822	0,4177 -1,1142	0,1265
Val/Val	12 (7,4%)	10 (6,3%)	0,2861	1,0582	0,4378 -2,5575	0,9
Ile/Val + Val/Val	53 (32,5%)	63 (39,4%)	0,12121	0,7418	0,4702 -1,1705	0,1994
CYP2E1						
WT	144 (88,3%)	118 (73,8%)		1		
INS	19 (11,7%)	42 (23,3%)	<u>0,00041</u>	<u>0,3707</u>	<u>0,2047 -0,6714</u>	<u>0,0011</u>
ALDH2 (G1510A)						
GG	126 (77,3%)	103 (64,4%)		1		
GA	27 (16,6%)	42 (26,3%)		<u>0,5255</u>	<u>0,3035 -0,91</u>	<u>0,0216</u>
AA	10 (6,1%)	15 (9,4%)	<u>0,0379</u>	0,545	0,2349 -1,2642	0,1574
GA+AA	37 (22,7%)	57 (35,6%)	0,007355	<u>0,5306</u>	<u>0,3254-0,8652</u>	<u>0,0111</u>
XPD						
AA	80 (49,1%)	79 (49,4%)		1		
AC	74 (45,4%)	68 (42,5%)		1,0746	0,6833-1,6901	0,7554
CC	9 (5,5%)	13 (8,1%)	0,619	0,6837	0,2766-1,6899	0,4101
AC+CC	83 (50,9%)	81 (50,6%)	0,523211	1,0119	0,6541-1,5653	0,9577
TOTAL	163 (100%)	160 (100%)				

P-value¹ – Teste de χ^2

P-value² – Teste de regressão logística univariada

A tabela 8 apresenta a regressão logística multivariada para os polimorfismos dos genes CYP2E1 e ALDH2, considerando os fatores de risco para o câncer de boca, etilismo (Maior ou menor que 63g/dia), o tabagismo, gênero e a idade. Pode-se observar que apresentam diferenças estatisticamente significativas tanto o polimorfismo de inserção do gene CYP2E1 como para o gene ALDH2..

Tabela 8: Regressão logística multivariada entre a interação dos fatores de risco para o câncer de boca e os polimorfismos CYP2E1 e ALDH2

Term	Odds Ratio	C.I. 95%	P-Value
CYP2E1 (WT)	1		
CYP2E1 (INS)	<u>0,3261</u>	<u>0,168 - 0,6337</u>	<u>0,0009</u>
ALDH2 (GG)	1		
ALDH2 (GA)	<u>0,4811</u>	<u>0,263 - 0,8817</u>	<u>0,0179</u>
ALDH2 (AA)	0,5209	0,201 - 1,3496	0,1794
ALDH2 (GA+AA)	<u>0,5355</u>	<u>0,3148 - 0,9109</u>	<u>0,0212</u>

*Modelo de regressão logística para os polimorfismos de metabolismo de etanol e acetaldeído e genes de reparo, ajustados pelos fatores de risco para o câncer de cavidade oral, gênero, idade, etilismo e tabagismo.

Quando estudados a interação dos polimorfismos nos genes de metabolismo de etanol e acetaldeído, pode - se observar que apenas a interação entre os polimorfismos de inserção do gene CYP2E1 e o polimorfismo do gene ALDH2 são estatisticamente significativos (tabela9).

Tabela 9 : Associação dos polimorfismos de metabolismo de etanol e acetaldeído entre os casos e controles

	Caso	Controle	P
Haplotipo ADH1B + ALDH2			
ADH1B*1 + ALDH2*1	106 (65%)	85 (53,1%)	0,2166
ADH1B*1 + ALDH2*1*2	22 (13,5%)	34 (21,3%)	
ADH1B*1 + ALDH2*2	10 (6,1%)	13 (8,1%)	
ADH1B*2 + ALDH2*2	0 (0%)	1 (0,6%)	
ADH1B*2 + ALDH2*1*2	3 (1,8%)	5 (3,1%)	
ADH1B*2 + ALDH2*1	8 (4,9%)	12(7,5%)	
ADH1B*3 + ALDH2*2	0 (0%)	1 (0,6%)	
ADH1B*3 + ALDH2*1*2	2 (1,2%)	3 (1,9%)	
ADH1B*3 + ALDH2*1	12 (7,4%)	6 (3,8%)	
ADH1C+ALDH2			
Ile/Ile + ALDH2*1	84 (51,5%)	62 (38,8%)	0,2582
Ile/Ile + ALDH2*1*2	19 (11,7%)	24 (15%)	
Ile/Ile + ALDH2*2	7 (4,3%)	11 (6,9%)	
Ile/Val + ALDH2*1	33 (20,2%)	36 (22,5%)	
Ile/Val + ALDH2*1*2	6 (3,7%)	14 (8,8%)	
Ile/Val + ALDH2*2	2 (1,2%)	3 (1,9%)	
Val/Val + ALDH2*1	9 (5,5%)	5 (3,1%)	
Val/Val + ALDH2*1*2	2 (1,2%)	4 (2,5%)	
Val/Val + ALDH2*2	1 (0,6%)	1 (0,6%)	
CYP+ALDH			
WT+ ALDH2*1	110 (67,5%)	80 (50%)	0,0031
WT+ ALDH2*1*2	25 (15,3%)	28 (17,5%)	
WT+ ALDH2*2	9 (5,5%)	10 (6,3%)	
INS+ ALDH2*1	16 (,8%)	23 (14,4%)	
INS+ ALDH2*1*2	2 (1,2%)	14 (8,8%)	
INS+ ALDH2*2	1 (0,6%)	5(3,1%)	
TOTAL	163 (100%)	160 (100%)	

Utilizando-se a regressão logística multivariada com os fatores de risco para o câncer de boca, observa-se a interação dos polimorfismos CYP2E1 (INS) +ALDH2 (ALDH2*1 e ALDH2*1*2), estatisticamente significativa, p=0,0087

e $p=0,0124$. Não foram observadas diferenças estatísticas para as outras combinações dos polimorfismos do gene CYP2E1 e ALDH2 (Tabela 9).

Tabela 10 Regressão logística multivariada entre a interação do polimorfismo de inserção do gene CYP2E1 e ALDH2 (G1510A) e o riscos de câncer oral.: Regressão logística multivariada entre a interação do polimorfismo de inserção do gene CYP2E1 e ALDH2 (G1510A) e o riscos de câncer oral.

	Odds Ratio	C.I. 95%	P-Value
CYP2E1 (WT)+ ALDH2*1	1		
CYP 2E1 (WT)+ALDH2*1*2	0,5153	0,2621 - 1,0132	0,0546
CYP 2E1 (WT)+ALDH2*2	0,5648	0,1914 - 1,6663	0,3007
CYP2E1 (INS)+ALDH2*1	<u>0,3617</u>	<u>0,163 - 0,8026</u>	<u>0,0124</u>
CYP 2E1 (INS)+ ALDH2*1*2	<u>0,1188</u>	<u>0,0242- 0,5833</u>	<u>0,0087</u>
CYP 2E1 (INS)+ALDH2*2	0,1632	0,0169 -1,577	0,1173

*Modelo de regressão logística para os polimorfismo de metabolismo de etanol e acetaldeído e genes de reparo, ajustados pelos fatores de risco para o câncer de cavidade oral, gênero, idade, etilismo e tabagismo.

A tabela 11 apresenta a distribuição entre os polimorfismos de metabolismo de etanol e de reparo de DNA entre os casos e controles, todos com hábitos tabagistas. Observa-se que os polimorfismo ADH1B Arg47His, CYP2E1 Ins e ALDH2 G1510A possuem diferenças estatisticamente significativas entre as populações caso e controles, $p<0,05$.

Tabela 11: Distribuição dos polimorfismos entre casos e controles de pacientes com hábitos tabagistas e hábito etilista e não etilista.

	Caso	Controle	P-Value ¹	Odds Ratio	C.I. 95%	P-Value ²
ADH1B Arg47His						
GG	142 (94,0%)	110 (86,6%)	<u>0,0526</u>	1		
GA	7 (4,6%)	16 (12,6%)		<u>0,3389</u>	<u>0,1347-0,8524</u>	<u>0,0215</u>
AA	2 (1,3%)	1 (0,8%)	<u>0,0279</u>	1,5493	0,1387- 17,3068	0,7222
GA+AA	9 (6%)	17 (13,4%)		<u>0,4101</u>	<u>0,1761 -0,9551</u>	<u>0,0388</u>

ADH1B Arg369Cys

CC	138 (91,4%)	117 (92,1%)	0,2622	1		
CT	10 (6,6%)	10 (7,9%)		0,8478	0,341 -2,1073	0,7223
TT	3 (2,0%)	0 (0,0%)	0,5008	464749,79	N.A	0,9599
CT+TT	13 (8,6%)	10 (7,9%)		1,1022	0,4662 -2,6056	0,8246

ADH1B haplotipo

ADH1B*1	129 (85,4%)	101 (79,5%)	0,156			
ADH1B*2	9 (6,0%)	16 (12,6%)		0,4404	0,187-1,0378	0,0608
ADH1B*3	13 (8,6%)	10 (7,9%)	0,1276	1,0178	0,429-2,4163	0,968
ADH1B*2+ADH1B*3	22 (14,6%)	26 (20,5%)		0,6625	0,3547 -1,2373	0,1964

ADH1C

ILE/ILE	102 (67,5%)	78 (61,4%)	0,2312	1		
VAL/VAL	11 (7,3%)	6 (4,7%)	0,1735	1,402	0,497 -3,9565	0,5233
ILE/VAL	38 (25,2%)	43 (33,9%)		0,6758	0,399 -1,1443	0,1447
ILE/VAL+VAL/VAL	49 (32,5%)	38,6%)		0,7647	0,4668 -1,2528	0,2868

CYP2E1

AWT	133 (88,1%)	94 (74,0%)	<u>0,002</u>	1		
INS	18 (11,9%)	33 (26,0%)		<u>0,3855</u>	<u>0,205 -0,7254</u>	<u>0,0031</u>

ALDH2

GG	116 (76,8%)	78 (61,4%)	0,0206	1		
GA	26 (17,2%)	36 (28,3%)	0,00397	<u>0,4856</u>	<u>0,272 -0,8677</u>	<u>0,0147</u>
AA	9 (6,0%)	13 (10,2%)		0,4655	0,19 -1,1416	0,0948
GA+AA	35 (23,2%)	49 (38,6%)		<u>0,4803</u>	<u>0,2855 -0,808</u>	<u>0,0057</u>

XPD

AA	76 (50,3%)	65 (51,2%)	0,6325	1		
AC	66 (43,7%)	51 (40,2%)	0,4917	1,1068	0,676 -1,8123	0,6867
CC	9 (6,0%)	11 (8,7%)		0,6998	0,273 -1,7935	0,4572
AC+CC	75 (49,7%)	62 (48,8%)		1,0346	0,6453 -1,6587	0,8877
Total	151 (100%)	127 (100%)				

P-value¹ – Teste de X²

P-value² – Teste de regressão logística univariada

Na tabela 12 estão apresentados o modelo de regressão logística multivariada entre os polimorfismos ADH1B Arg47His, CYP2E1 e ALDH2 e os fatores de risco para o câncer de boca. Observa-se que a presença de polimorfismos apresenta-se como fator de proteção ao câncer de boca, quando comparados com os não portadores de polimorfismos.

Tabela 12: Modelo de regressão logística dos polimorfismos ADH1B Arg47His, CYP2E1, ALDH2 e XPD.

Term	Odds Ratio	95%	C.I.	P-Value
ADH1B_Arg47His (GG)	1			
ADH1B_Arg47His (GA)	<u>0,3445</u>	<u>0,1292</u>	<u>0,9187</u>	<u>0,0332</u>
ADH1B_Arg47His (AA)	2,0895	0,1742	25,0593	0,561
ADH1B_Arg47His (GA+AA)	0,4362	0,1777	1,0709	0,0702
CYP2E1 (WT)	1			
CYP2E1 (INS)	<u>0,345</u>	<u>0,1752</u>	<u>0,6791</u>	<u>0,0021</u>
ALDH2 (GG)	1			
ALDH2 (GA)	<u>0,4911</u>	<u>0,2662</u>	<u>0,906</u>	<u>0,0229</u>
ALDH2 (AA)	0,5678	0,2135	1,5098	0,2566
ALDH2 (GA+AA)	<u>0,5086</u>	<u>0,292</u>	<u>0,8858</u>	<u>0,0169</u>

*Modelo de regressão logística para os polimorfismos de metabolismo de etanol e acetaldeído e genes de reparo, ajustados pelos fatores de risco para o câncer de cavidade oral, gênero, idade, etilismo e tabagismo.

A tabela 13 apresenta a associação entre o consumo de etanol como os polimorfismos dos genes de metabolismo de etanol para o risco de câncer de boca. Pode-se observar que os pacientes portadores do alelo ADH1B*1 possuem risco aumentado para o câncer oral, quando apresentam consumo maior que 63g/dia de etanol (OR=2,0008). Pacientes portadores em heterozigose do polimorfismo ADH1C que tinham consumo menor que 63g/dia de etanol, apresentaram proteção ao câncer oral (OR=0,39).

Os paciente que possuíam consumo menor de etanol e eram portadores do polimorfismo de inserção do gene CYP2E1 apresentaram proteção ao câncer oral (OR=0,25), por outro lado os pacientes não portadores (WT) e que tinham hábito

de consumir mais que 63g/dia de etanol, apresentaram risco ao câncer (OR=2,07). Pacientes portadores do polimorfismo ALDH2 (GG) que consumiam mais de 63g/dia de etanol, apresentaram risco ao câncer oral (OR= 1,9)

Tabela 13 : Associação entre o consumo de etanol e os polimorfismos dos genes de metabolismo de etanol para o risco de câncer de boca.

Variável	Odds Ratio	C.I. 95%	P-Value
ADH1B Haplótipo			
ADH1B*1 menor 63g/dia		Referência	
ADH1B*2 menor 63g/dia	0,6225	0,1997-1,94	0,4137
ADH1B*3 menor 63g/dia	0,976	0,2584-3,6862	0,9714
ADH1B*1 maior 63g/dia	<u>2,0008</u>	<u>1,1307-3,5402</u>	<u>0,0172</u>
ADH1B*2 maior 63g/dia	1,2802	0,3417-4,7957	0,714
ADH1B*3 maior 63g/dia	2,8069	0,7466-10,5524	0,1266
ADH1C			
Ile/Ile menor 63g/dia		Referência	
Ile/Val menor 63g/dia	<u>0,3959</u>	<u>0,1657-0,9459</u>	<u>0,0371</u>
Val/Val menor 63g/dia	0,7339	0,1248-4,3179	0,7323
Ile/Ile maior 63g/dia	1,7223	0,9133-3,2477	0,093
Ile/Val maior 63g/dia	1,6064	0,7735-3,3365	0,2037
Val/Val maior 63g/dia	1,7639	0,498-6,2481	0,3791
CYP2E1			
WT menor 63g/dia		Referência	
INS menor 63g/dia	<u>0,2574</u>	<u>0,0873 -0,7587</u>	<u>0,0139</u>
WT maior 63g/dia	<u>2,0786</u>	<u>1,1665- 3,7041</u>	<u>0,013</u>
INS maior 63g/dia	0,7793	0,3271-1,8564	0,5734
ALDH2			
GG menor 63g/dia		Referência	
GA menor 63g/dia	0,4722	0,1945-1,1464	0,0973
AA menor 63g/dia	0,4857	0,1158-2,037	0,3235
GG maior 63g/dia	<u>1,926</u>	<u>1,0421-3,5596</u>	<u>0,0365</u>
GA maior 63g/dia	1,1201	0,4702-2,6682	0,7979
AA maior 63g/dia	1,3537	0,3794-4,83	0,6408

5. DISCUSSÃO

Para as análises estatísticas foram excluídos 45 pacientes portadores de câncer de boca e 57 controles. Grande parte dos pacientes que foram excluídos, 74 casos, foi devido a falta ou a pobre qualidade do DNA para a realização das reações, que foram repetidas 3 vezes e sem sucesso de PCR positivo. Embora os DNA's tenham sido quantificados, e contivessem a concentração adequada, eram muito antigos e foram purificados nos anos de 2002 e 2003. Outra possível explicação deve-se ao fato de que a purificação foi realizada pelo método de *souting out*, fato que pode comprometer a qualidade do DNA; 18 casos foram excluídos, devido a localização do tumor que inicialmente foram classificados como portadores de câncer de boca e em atualizações do banco de dados foram reclassificados como portadores de câncer de base de língua. E 10 casos foram excluídos das análises estatísticas devido à falta de informações do hábito de consumir etanol.

Na população de estudo, somente os polimorfismos dos genes CYP2E1 e XPD estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os demais polimorfismos encontravam-se em desequilíbrio, tal fato pode ter ocorrido devido a população ter “desvio” do normal, ou seja, eram pacientes internados no hospital que poderiam ter algum tipo de moléstia causada pela presença do polimorfismo indiretamente.

Os resultados sugerem que os pacientes portadores do polimorfismo do gene ADH1C, está associado à quantidade de consumo de etanol, mas não ao risco de câncer, portadores dos polimorfismos nos genes CY2E1 (ins) e os pacientes portadores do alelo ALDH2*1*2 (GA) apresentam menores riscos de

câncer oral (tabela 7) e que não estão associados ao hábito de consumir etanol e o polimorfismo do gene XPD não esta associado ao câncer oral.

Estudando o polimorfismo do gene ADH1B Arg47His apenas entre os pacientes que possuíam o hábito tabagista (tabagista “só no passado” com “sim, ainda fuma”), “etilista” e “não etilista”, identificamos uma associação sensível entre a presença do alelo polimórfico e o menor risco de câncer oral (tabela 11). Nossos resultados são similares aos encontrados por HASHIBE, BOFETA, ZARIDZE, *et al.* Sua população de estudo era composta de 811 pacientes portadores de câncer, dos quais 168 eram portadores de câncer oral e 1083 controles, e relataram que os alelos polimórficos do gene estavam associados à proteção de câncer oral e sugeriram que a presença do polimorfismo (ADH1B 47His) promoveria um rápido acúmulo de acetaldeído e que este processo de algum modo estimularia mecanismos de rápida eliminação deste composto. (HASHIBE, BOFETA, & ZARIDZE, 2006)

Recentemente, Zhang, Mai e Huang com estudo de meta análise avaliaram 4220 casos e 8946 controles de 12 estudos de populações da Ásia para associação entre o carcinoma de esôfago e o polimorfismo ADH1B. Esta análise revelou a presença do polimorfismo ADH1B Arg47Arg associado ao aumento do risco de carcinoma epidermóide de esôfago, OR=20.2, quando comparado com os outros alelos polimórficos (ADH1B Arg47His e His47His). Os resultados deste estudo foram similares ao avaliar os pacientes portadores de câncer bucal, pois verificou-se que a presença do polimorfismo ADH1B Arg47His e His47His atua como fator de proteção quando comparados aos não portadores. (Tabela 11 e 12).

Avaliando-se a interação entre a quantidade de consumo de etanol, maior ou menor que 63g/dia e a presença dos polimorfismos, também observamos resultados similares aos encontrados em trabalhos de meta análises realizados por Zhang *et al.* (2010), em que os pacientes portadores do alelo ADH1B*1 que apresentavam maior consumo de etanol possuíam maior risco de câncer. (ZHANG *et al.*, 2010). (tabela 13)

Quando avaliado o polimorfismo do gene ADH1C, os resultados não apresentaram associação entre a presença dos polimorfismos e o hábito de consumir etanol (tabela 3), mas identificaram resultados estatisticamente significativos quanto à quantidade consumida (tabela 4) e que é fator de risco ao alcoolismo (tabela 6), resultados similares aos encontrados por Peters *et al.* com estudos de 521 casos e 599 controles. Neste estudo foi relatado a presença do polimorfismo do gene ADH1C como fator de proteção ao alcoolismo, justificando que a presença do alelo polimórfico transcreveria proteínas de menores atividades enzimáticas, alterando a oxidação do etanol a acetato, assim o paciente teria menor ingestão de etanol por se intoxicar com o acúmulo. E portadores de polimorfismos neste gene, podem ter menores riscos de se tornarem etilistas crônicos (Peter *et al.*, 2005). Entretanto não identificamos qualquer associação entre a presença do polimorfismo e o risco de câncer de boca (tabela 7 e 13), similares aos resultados encontrados por Olshan *et al.* Estudando uma casuística de 182 casos e 202 controles na universidade da Carolina do Norte, Olshan *et al.* sugeriram que o metabolismo do etanol era muito complexo, múltiplos genes de oxidação estariam atuando de formas diferentes na oxidação do etanol e que

poderia favorecer ao acúmulo de acetaldeído. (OLSHAN, 2001; SEITZ e STICKEL, 2010)

Estudo do polimorfismo no gene ADH1C relatou sua associação a doenças, como a cirrose hepática, pancreatites e ao consumo de etanol, mas não foram encontrados resultados significativos para o risco câncer (SEITZ E STICKEL, 2010). Recentemente, Garcia *et al* (2010), estudando pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço na população brasileira, com uma casuística de 207 casos e 100 controles, identificaram o polimorfismo do gene ADH1C associado ao haplótipo ADH1B*2 como fator de risco e relatou que tal associação poderia ser um artefato, pois em sua casuística o polimorfismo do gene ADH1C encontrava-se em desequilíbrio de Hard-Weimberg, entretanto ainda não há um consenso de que o polimorfismo é de fato um fator de risco ao câncer (Garcia *et al.*, 2010)

Outra via de oxidação do etanol a acetaldeído, realizada pela CYP2E1, pode gerar radicais livres por meio da peroxidação lipídica, que podem lesionar ou interferir nas metilações e nos processos de síntese e reparo do DNA (Asakage *et al.*, 2007 e Ji *et al.* , 2010; Helmut K. Seitz e Felix Stickel, 2010). Assim, seria possível considerar que pacientes com enzimas de melhores atividades enzimáticas teriam maiores riscos a desenvolver câncer, já que teriam menores quantidades de etanol e maiores quantidades de radicais livres acumulados. Os resultados obtidos mostraram a presença do polimorfismo de inserção do gene CYP2E1 como sendo estatisticamente significativa, no modelo de regressão logística identificou-se o polimorfismo como fator de proteção ao câncer oral (tabelas 7 e 8).

E como já discutido por outros autores, o etanol na cavidade oral não possui características carcinogênicas, mas atua como co-carcinógeno aumentando a permeabilidade das estruturas celulares da mucosa da boca facilitando a entrada de carcinógenos e consequentemente potencializando sua ação (HASHIBE *et al.*, 2006).

Entretanto, a CYP2E1 está associada ao metabolismo de outras substâncias, como os xenobióticos, incluindo pró-carcinógenos como nitrosaminas, hidrocarbonetos aromáticos, hidrocarbonetos policíclicos, entre outros componentes potencialmente carcinogênicos presentes na queima do tabaco, além da produção do acetaldeído pela oxidação do etanol, que podem modificar os riscos de câncer e que devem ser melhores investigados (Pöschl e Seitz, 2004; Howard *et al.*, 2003).

Em nossos resultados encontramos diferenças estatísticas entre as populações caso e controle (Tabela 5) e que a presença do alelo ALDH2*1*2 estava associado a proteção ao câncer oral, OR=0,48 (Tabela6). Contudo, este fato não é observado em trabalhos recentes ou mais antigos, que correlacionaram a presença do polimorfismo com fator de risco ao câncer oral, como relatam Asakage *et al.* em 2007, na população japonesa. Outros autores encontraram a presença do polimorfismo do gene ALDH2 e sua variante em heterozigose (ALDH2*1*2) associados aos altos riscos de câncer de cavidade oral e orofaringe em homens com hábito de ingerir etanol e relataram que o possível mecanismo estava associado a baixa capacidade de oxidação do acetaldeído, promovido pela forma inativa do gene ALDH2 (ALDH2*2). (ASAKAGE *et al.*, 2007; KIM *et al.* 2010; JI *et al.*, 2010; SEITZ e STICKEL, 2010).

Yang *et al.* em 2010, estudando a presença do polimorfismo do gene ALDH2 e o aumento de risco de câncer de esôfago revelaram que a presença do polimorfismo reduz a atividade da enzima de oxidação do acetaldeído, aumentando sua concentração. O acúmulo deste composto com propriedades carcinogênicas podem formar adutos de DNA, promover alterações nas cromátides irmãs, perdas cromossômicas, e recentes estudos revelaram também que o acetaldeído pode induzir a metaplasia do epitélio traqueal, promover injúria celular associada à hiperregeneração nas mucosas do esôfago e cólon. Desse modo é possível que seu acúmulo na cavidade oral possa estar associado ao risco de câncer. (SEITZ e STICKEL, 2007, YANG *et al.*, 2010).

Outro aspecto que pode ser abordado sobre a presença do alelo polimórfico do gene ALDH2, pode ser relacionado ao consumo de etanol em que os portadores de enzimas aldh2 de menor atividade (ALDH2*1*2/ALDH2*2) podem ter como características ingerir ou terem frequências de ingestão menores do que os portadores de enzimas mais eficientes (ALDH2*1) por terem maior acúmulo de acetaldeído, como sugerem nossos resultados (tabela 4). Embora não apresentaram resultados significativos sugere que possa existir tal correlação. Entre os paciente que tinham o hábito de consumir mais que 63g/dia de etanol era predominante os portadores do alelo GG (70%),e 37% dos pacientes que apresentavam pelo menos um alelo polimórfico (GA ou AA) possuíam consumo menor que 63g/dia (tabela 4)(PETER *et al.*, 2005).

Outra hipótese quanto ao fator de proteção da presença do polimorfismo ALDH2 pode ser observada quando avaliamos a interação dos polimorfismos de

oxidação de etanol e de acetaldeído. Os resultados indicam existir diferenças estatisticamente significativas entre a associação dos polimorfismos CYP2E1 e ALDH2, ($p=0,0031$) sendo que a combinação CYP2E1(INS)+ALDH2*1 ou CYP2E1(INS)+ALDH2*1*2, apresentou caráter de proteção ao câncer oral, ($OR=0,36$ e $OR=0,11$) e a combinação CYP2E1(WT)+ALDH2*1*2, sugere que o portador do alelo ALDH2*1*2 possa estar associado à proteção ao câncer oral de modo conjunto ao mecanismo de oxidação do etanol pela CYP2E1. Assim podemos supor a possível interação entre a baixa atividade da ALDH2 (ALDH2*1*2) e o aumento da expressão do gene CYP2E1, visto que o alelo CYP2E1 (WT) associado ao ALDH2*1*2 sugere proteção ao câncer oral (Tabela 7 e 8). A interação das proteínas cyp2e1 e aldh2 foram observadas por Oyama *et al.* (2005) e Kim *et al.* (2007), que identificaram o aumento de expressão do gene CYP2E1 em camundongos *knock out* para o gene ALDH2 e relataram que a baixa atividade da enzima aldh2 poderia estar associado a tal evento (Oyama, T *et al.*, 2005 e Kim *et al.*, 2007). Entretanto, este mecanismo promoveria o acúmulo de acetaldeído endógeno, aspecto que pode constituir-se em fator de risco ao câncer bucal.

Outra possível hipótese pode estar relacionada a presença de outros genes de metabolismo do acetaldeído (ALDH1, ALDH3) que podem estar atuando sinergicamente ou mesmo podem ter suas expressões aumentadas, caracterizadas por polimorfismos e mesmo influenciadas pela baixa atividade da enzima *aldh2*.

Por outro lado, os pacientes com altas concentrações de acetaldeído podem ter o mecanismo de síntese e reparo de DNA mais eficientes promovendo proteção ao câncer bucal. Nesta via os adutos de DNA promovidos pelo acetaldeído, são reparados pelas enzimas *xpd*. Entretanto, o gene também pode possuir diferentes capacidades enzimáticas devido a polimorfismos que transcreve a proteína, como relata Yong Bae Ji, 2010.

Após análise do polimorfismo no gene XPD (rs13181) (Tabela 7 e11), não observou-se significância estatística entre a presença do polimorfismo e o risco de câncer oral; os mesmos resultados encontrados por Sturgis *et al.* em 2000 e posteriormente reproduzidos por Ji *et al.* em 2010, estes autores estudaram pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço na população coreana. O fato do polimorfismo Lys751Gln (XPD) não estar associado ao risco de câncer oral, poderia dever-se a outras vias de reparo de DNA, outros fatores de transcrição que podem estar atuando no mecanismo de reparo das mutações genômicas promovidas pelo acetaldeído, interferindo nos resultados. Ou como relatam Sturgis *et al.*, o hábito etilista ou tabagista pode ter um impacto maior neste processo do que a presença do polimorfismo. Assim, investigamos entre os pacientes que possuíam o hábito tabagista se haveria diferenças estatísticas (tabela 11), entretanto não observamos tal correlação. Alguns estudos relatam a presença do alelo polimórfico do gene XPD Gln751Gln, como fator de risco entre alguns tipos de câncer. Entretanto são controversos, pois muitos deles não encontram tal associação (Sturgis *et al.* 2000; Ji, TAE, & al., 2010)

Em nossos estudos, devido à casuística ainda limitada e a inclusão somente de pacientes portadores de câncer bucal, houve prejuízo na obtenção de resultados mais significativos e análises futuras poderão contribuir para a compreensão do papel do polimorfismo do gene XPD (rs13181) na associação ou não com o câncer bucal.

6. CONCLUSÃO

O consumo de etanol maior que 63g/dia é fator e risco para o câncer oral;

Os polimorfismos nos genes ADH1C Ile350Val, ADH1B Arg369Cys e XPD Lys751Gln não estavam associados ao câncer bucal;

O polimorfismo de inserção do gene CYP2E1 e ADH1B Arg47His apresentam caráter de proteção ao câncer oral, quando comparados aos não portadores;

O portador heterozigoto para o polimorfismo do gene ALDH2 (G/A), em nosso estudo, apresentou caráter de proteção ao câncer oral, resultados contraditórios do que é encontrado em literatura, entretanto estudos *in vitro* (*camundongos*) sugerem que a baixa atividade da enzima ALDH2 possa interferir na expressão do gene CYP2E1, fato que deve ser melhor investigado e testado se ocorre o mesmo efeito em humanos ou que altere a expressão de outros genes como por exemplo os de reparo de DNA.

7. REFERÊNCIAS

- ASAKAGE, T., YOKOYAMA, A., HANEDA, T., *et al.* (2006). Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases, and drinking, smoking and diet in Japanese men with oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 865-874.
- BRENNAN, P.; *et al.* (2004). Pooled analysis of alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer. *Am J Epidemiology*, 159:1-16.
- CRABB, D. W., MATSUMOTO, M., & CHANG, D. *et al.* (2004). Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63, 49-63.
- FORASTIERE, A.; *et al.* (2001). Head Neck Cancer. *N. Engl. J. Med.*, 345 (26): 1890-1990, .
- GARCIA, S. M., CURIONI, O. A., CARVALHO, M. B., GATTÁS, G. F., *et al.* (2010). Polymorphisms in Alcohol Metabolizing Genes and the Risk of Head and Neck Cancer in a Brazilian Population. *Alcohol & Alcoholism Vol. 45*, 6-12.
- HASHIBE, M., BOFFETA, P., ZARIDZE, D., *et al.* (2006). Evidence for an Important Role of Alcohol- and Aldehyde-Metabolizing Genes in Cancers of the Upper Aerodigestive Tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* , 696-703.
- HENDRIKS, H. (2005). Handbook of experimental pharmacology. *Alcohol*, 170: 339-361.
- HOMANN, N., *et al.* (1997). High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: methodological aspects and pathogenetic implications. . *Carcinogenesis*, 18(9):1739-1743.
- HOOGSTEEEN, I. J., *et al.* (2007). Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinomas: predictive value and clinical relevance of hypoxic markers. *Head Neck* , 29 (6): 591-604.

- HOWARD, L. A., AHLUWALIAB, J. S., *et al.* (2003). CYP2E1_1D regulatory polymorphism: association with alcohol and nicotine dependence. *Pharmacogenetics* , 13:321–328.
- INCA- Acesso em 10 de Agosto de 2011, disponível em INCA-Instituto Nacional do Câncer.: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2011>
- JI, Y. B., *et al.* (2011). ADH1B and ALDH2 polymorphisms and their associations with increased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck in the Korean population. *Oral Oncology*, 583-587.
- JI, Y. B., TAE, K., LEE, Y. S., *et al.* (2010). XPD Polymorphisms and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck in a Korean Sample. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology*, 42-47.
- KIM, S. K., *et al.* (2010). The Genetic Factors Affecting Drinking Behaviors of Korean Young Adults with Variant Aldehyde Dehydrogenase 2 Genotype. Korean Society of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery Investig. *Surgery Investig*, Dec;7(4):270-7.
- KIM, Y. D., EOM, S. Y., OGAWA, M., *et al.* (2007). Ethanol- Induced Oxidative DNA Damage and CYP2E1 Expression in liver Tissue of Aldh2 knockout Mice. *Journal of Occupational Helth*, 363-369.
- LEE *et al.* (2009). Genetic modulation of ADH1B and ALDH2 polymorphisms with regard to alcohol and tobacco consumption for younger aged esophageal squamous cell carcinoma diagnosis, *Int. J. Cancer*: 125, 1134–1142
- LIU, G., *et al.* (2007). XRCC1 and XPD polymorphisms and esophageal adenocarcinoma risk. *Carcinogenesis* . , 28:1254–1258.
- NAYAK, J. K., SARKAR, B. N., DAS, P. K., & RAO, V. R. (2008). Genetics of Alcohol Use in Humans: An Overview *Int. J Hum Genet.*, 8(1-2): 181-197.
- NEVILLE, B. W., & DAY, T. A. (2002). Oral cancer and precancerous lesions. . *CA Cancer J. Clin.* , 52: 195-215.
- NISHIMOTO, I. N., *et al.* (2004). Alcohol dehydrogenase 3 genotype as a risk factor for upper aerodigestive tract cancers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 130:78-82.

- OLSHAN, A.F., WEISSLER, M., WATSON, M., & BELL, D. (2001). Risk of head and neck cancer and the alcohol dehydrogenase 3 genotype. *Carcinogenesis*, Jan;22(1):57-61.
- OSIER, M., *et al.* (2004). Possible Epistatic role of ADH7 in protection against alcoholism. *American journal of Medical genetics Part B*, 126B: 19-22.
- OYAMA, T., ISSE, T., NAGAWA, N., *et al.* (2005). tissue-distribution of aldehyde dehydrogenase 2 and effects of the *aldh2* gene disruption on the expression of enzymes involved in alcohol metabolism. *Frontiers in Bioscience*, 951-960.
- PETERS, E. S., *et al.* (2005). The ADH1C polymorphism modifies the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck associated with alcohol and tobacco use. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 14(2)476-82.
- POSCHL, G., & SEITZ, H. K. (2004). Alcohol and cancer. *Alcohol*, 39: 155-65.
- RUMEL, D. (1986). "Odds ratio": algumas considerações. *Rev. Saúde públ*, 251-256.
- SAMBROOK, J., & RUSSEL, D. W. (2009). *The condensed Protocols From Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- SEITZ, Helmut K. e BECKER, Peter (2007). Alcohol Metabolism and Cancer Risk. *Alcohol Research & Health*. 38-46
- SEITZ, H. K., & HEIDELBERG, P. M. (2002). The role of acetaldehyde in upper digestive tract cancer in alcoholics. *GERMANY*.
- SEITZ, H. K., & STICKEL, F. (2007). Molecular mechanisms of alcohol mediated carcinogenesis. *NATURE REVIEWS CANCER*, 599-612.
- SEITZ, H. K., & STICKEL, F. (2010). Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer. *Genes Nutr*, 121–128.
- SKJELBRED, C. F., *et al.* (2006). Polymorphisms of the XRCC1, XRCC3 and XPD genes and risk of colorectal adenoma and carcinoma, in a Norwegian cohort: a case control study. *BMC Cancer* , 6:67 doi:10.1186/1471-2407-6-67.

- STURGIS, E. M., *et al.* (2001). Alcohol dehydrogenase 3 genotype is not associated with risk of squamous cell carcinoma of the oral cavity and pharynx. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 10:273-275.
- STURGIS, E. M., ZHENG, R., LI, L., *et al.* (2000). XPD/ERCC2 polymorphisms and risk of head and neck cancer: a case-control analysis. . *Carcinogenesis*, 22:219-2223.
- SZABO, G. (1999). Consequences of alcohol consumption on the host defence. *Alcohol & Alcoholism* , Vol. 34 , 830-841.
- SZABO, G., MANDREKAR, P., OAK, S., & MAYERLE, J. (2007). Effect of Ethanol on Inflammatory Responses. *Pancreatology*, 115-123.
- VISAPÄÄ, J. P., *et al.* (2004). Increased cancer risk in heavy drinkers with the alcohol dehydrogenase 1C*1 allele, possibly due to salivary acetaldehyde. *Gut*, 53:871-876.
- WANG, D., *et al.* (2005). Alcohol Dehydrogenase 3 and risk of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 14(3).
- WANG, S. M., ZHU, A. P., LI, D., WANG, Z., ZHANG, P., ZHANG, G. L., *et al.* (2009). Frequencies of genotypes and alleles of the functional SNPs in CYP2C19 and CYP2E1 in mainland Chinese Kazakh, Uygur and Han populations. *J. Hum. Genet.*, 54: 372-375.
- WIGHT, A. J., & OGDEN, G. (1998). Possible mechanisms by alcohol may influence the development of oral cancer- a review. . *Oral oncology*, 34:441-447.
- YANG, S. J., YOKOYAMA, A., YOKOYAMA, T., *et al.* (2010). Relationship between genetic polymorphisms of ALDH2 and ADH1B and esophageal cancer risk: A meta-analysis. *World J Gastroenterol*, 4210-4220.
- YOKOYAMA, A., *et al.* (2001). Alcohol and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms and oropharyngolaryngeal, esophageal and stomach cancers in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis*, 22(3):433-439.

- YOKOYAMA, A., OMORI, T., & YOKOYAMA, T. (2010). Alcohol and aldehyde dehydrogenase Polymorphisms and a New Strategy for Prevention and Screening for Cancer in the Upper Aerodigestive Tract in East Asians. *Keio J Med*, 115—130.
- YUAN, L., CUI, D., ZHAO, E.-J., *et al.* (2011). XPD Lys751Gln polymorphism and esophageal cancer risk: A meta-analysis involving 2288 cases and 4096 controls. *World J Gastroenterol*, 17(18): 2343–2348.
- ZEE, R. Y., *et al.* (2004). Prospective Evaluation of the Alcohol Dehydrogenase γ 1/ γ 2 Gene Polymorphism and Risk of Stroke. *Stroke*, 35:e39-e42.
- ZHANG, G. H., MAI, R. Q., & HUANG, B. (2010). Meta-analysis of ADH1B and ALDH2 polymorphisms and esophageal cancer risk in China. *World J Gastroenterol*, 6020-6025.
- ZYGOGIANNI, A., KYRGIAS, G., MYSTAKIDOU, K., *et al.* (2011). Potential Role of the Alcohol and Smoking in the Squamous Cell Carcinoma of the Head And Neck: Review of the Current Literature and New Perspectives. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 339-344.

8. ANEXO

Anexo 1: Carta de aprovação do comite de ética

MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18.08.10 **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 167/10 intitulado: "AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DE METABOLIZAÇÃO DO ÁLCOOL, ACETALDEÍDO E GENES DE REPARO DO DNA, EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA", e seus anexos, apresentado pelo Departamento de Radiologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa .

Pesquisador (a) Responsável: Marcos Brasilino de Carvalho
Pesquisador (a) Executante: Jean Tetsuo Takamori

CEP-FMUSP, 18 de agosto de 2010.

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

Anexo 2: Características histopatológicas da população em estudo.

Características histopatológicas	
Tamanho do tumor (pT)	N (%)
pT1	15 (7%)
pT2	58 (28%)
pT3	36 (17%)
pT4	99 (48%)
pT1+2	73 (35%)
pT3+4	135 (65%)
Linfonodo acometido	
Ausente	97 (47%)
Presente	111 (53%)
Invasão extracapsular	
Ausente	73 (66%)
Presente	38 (34%)
Grau de diferenciação	
Bem diferenciado	87 (42%)
Moderadamente	108 (52%)
Pouco diferenciado	12 (5,5%)
Não avaliável	1 (0,5%)
Embolização vascular sanguínea	
Ausente	180 (86%)
Presente	15 (8%)
Não avaliável	13 (6%)
Embolização vascular linfática	
Ausente	122 (59%)
Presente	72 (35%)
Não avaliável	14 (6%)
Invasão perineural	
Ausente	117 (56%)
Presente	79 (38%)
Não avaliável	12 (6%)
Infiltrado inflamatório peritumoral	
Ausente	1 (0,5%)
Presente	190 (91,5%)
Não avaliável	17 (8%)
Escasso	85 (45%)
Moderado	87 (46%)
Intenso	18 (9%)
Total	208 (100%)

Entre as características histopatológicas avaliadas, os tumores pT4 apresentam maior frequência, 48% dos casos. A frequência de acometimento de linfonodos foi de 53%, sendo que entre eles, 34% apresentavam invasão extracapsular. Quanto ao grau de diferenciação, foi predominante os moderadamente diferenciados e 52% dos tumores avaliados apresentavam invasão até o plano muscular. Pode-se observar também que foi predominante a ausência de embolização vascular sangüínea e linfática, em 87% e 59%, respectivamente. O infiltrado inflamatório estava presente na maioria das avaliações, 91% dos casos e foi caracterizado como apresentando intensidade moderada em 46% das amostras (Anexo 2).