SILVIA MARÇAL NUNES GARCIA

**GENES DE METABOLIZAÇÃO DO ÁLCOOL E O RISCO DE CÂNCER DE
CABEÇA E PESCOÇO**

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

Área de Concentração: Fisiopatologia
Experimental
Orientadora: Prof. Dra. Gilka Jorge Fígaro
Gattás

São Paulo

- 2009 -

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Garcia, Silvia Marçal Nunes

Genes de metabolização do álcool e o risco de câncer de cabeça e pescoço / Silvia Marçal Nunes Garcia. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Gilka Jorge Fígaro Gattás.

Descritores: 1.Álcool desidrogenase 2.Aldeído desidrogenase 3.Citocromo P-450 CYP2E1 4.Polimorfismo genético 5.Neoplasias de cabeça e pescoço 6.Acetaldeído 7.Alcoolismo 8.Fatores de risco

USP/FM/SBD-357/09

SILVIA MARÇAL NUNES GARCIA

GENES DE METABOLIZAÇÃO DO ÁLCOOL E O RISCO DE CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO.

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

Área de Concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Prof. Dra. Gilka Jorge Fígaro Gattás

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. (a) Dr. (a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos homens da minha vida,

Igor e Marcelo.

Agradecimentos

A minha orientadora Dra. Gilka Jorge Fígaro Gattás, que esteve presente nos momentos mais importantes da minha vida acadêmica. Obrigada por todos os ensinamentos.

À Dra. Cíntia Fridman, um exemplo de pesquisadora e companheira de bancada.

Aos companheiros do Hospital Heliópolis, sem os quais essa pesquisa não seria possível, Dr. Marcos Brasilino e Dr. Otávio Curioni, que demonstraram como é importante a parceria entre instituições no mundo acadêmico. Muito obrigada.

Aos companheiros da psiquiatria da Medicina da USP, André Malbergier e Adriana.Pileggi, que com essa nova união darão continuidade a este lindo trabalho

Aos colegas de pós-graduação pelo companheirismo.

Aos técnicos, Estela e Marcelo pela ajuda tão valiosa.

Às secretárias do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho, Branca, Dirce, Paula e Rosângela,

Às queridas Sonia e Tania, da Fisiopatologia Experimental.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo financiamento de meus estudos e pesquisa.

A minha família, aquela que me criou e aquela que está se formando.

As grandes mulheres da minha família, Néa, Vania, Carol e Rafa.

Ao meu marido, Celo, com seu “no pain no gain”, carinho e amor e que me proporcionou a maior felicidade de nossas vidas, nosso filho.

Ao meu filhote, Igor, que me fez entender o que é amor materno, me mostrou a plenitude da maternidade, despertando meus instintos de mamífera, mãe e mulher.

"No meio de qualquer dificuldade encontra-se a oportunidade."

Albert Einstein

Resumo

Garcia, S.M.N. **Genes de metabolização do álcool e o risco de câncer de cabeça e pescoço.** 2009. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A incidência do câncer de cabeça e pescoço (CCP) vem crescendo substancialmente nos últimos anos, inclusive no Brasil. Esse aumento está em parte relacionado com o consumo de álcool e tabaco, mas a susceptibilidade genética individual também deve ser considerada. O objetivo desse trabalho foi avaliar a frequência de polimorfismos em genes que codificam as enzimas de metabolização do álcool em pacientes com câncer de cabeça e pescoço do Hospital Heliópolis da cidade de São Paulo, comparados com um grupo de pacientes do mesmo hospital, sem diagnóstico de câncer. Foram investigados polimorfismos genéticos das enzimas álcool desidrogenase (*ADH1B Arg⁴⁸His*, *ADH1B Arg³⁷⁰Cys*, *ADH1C Ile³⁵⁰Val*) e do citocromo P450 (*CYP2E1 PstI*), pela técnica PCR-RFLP, em 451 indivíduos, sendo 207 pacientes com CCP (confirmados histopatologicamente, 184 homens e 23 mulheres, idade média 54,3 $\pm$ 7,8 anos) e 244 controles (225 homens e 19 mulheres, idade média 53,6 $\pm$ 9,3 anos). O hábito de fumar foi relatado por 80% dos pacientes com CCP e 50% dos controles o que aumentou mais de dez vezes o risco de câncer (OR=11,1; 95% IC; 4,89-25,19). Apenas 7% dos pacientes com CCP relataram nunca haver consumido álcool em comparação com 22,5% dos controles hábito que aumentou mais de quatro vezes o risco de CCP (OR=4,39 95% IC; 2,35-8,22). Verificou-se que o consumo diário acima de 30,655g/L/dia de álcool (72,5% dos pacientes com CCP e 35,2% dos controles) estava associado ao maior risco de CCP (Curva de ROC). A análise dos polimorfismos genéticos revelou que o genótipo mutado *ADH1B Arg⁴⁸His* em homozigose ou heterozigose foi mais freqüente nos controles (12,7%) do que nos pacientes com CCP (5,8%) conferindo proteção à doença (OR=0,42; 95% IC; 0,21-0,85). Resultados similares foram observados para os haplótipos *ADH1B*2* (OR=0,41; 95% IC; 0,20-0,82) ou *ADH1B*2/ADH1C*1* (OR=0,32; 95% IC; 0,13-0,79). Análise de regressão múltipla escalonada revelou que os indivíduos com o genótipo mutante *ADH1B Arg⁴⁸His* que consomem quantidades de álcool inferiores a 30g/L/dia mantém o risco diminuído de CCP

(OR=0,12; 95% IC; 0,03-0,52). Entretanto, quando o consumo diário de bebidas alcoólicas supera 30,655g/L/dia o risco de CCP é aumentado independente da presença (OR=4,42; 95% IC; 1,21-16,11).ou não do genótipo *ADH1B Arg⁴⁸His* com o alelo mutado (OR= 3,01; 95% CI, 1,90-4,78). Conclusão: Os genótipos de metabolização rápida do álcool podem proteger contra o CCP quando a quantidade de álcool ingerida for menor que 30,655 g/l/dia.

Descritores: álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase, citocromo P-450 CYP2E1, polimorfismo genético, neoplasias de cabeça e pescoço, acetaldeído, alcoolismo, fatores de risco.

Abstract

Garcia, S.M.N. **Alcohol metabolizing genes and the risk of head and neck cancer**. 2009. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The incidence of head and neck cancer (HNC) has increased substantially in the last years, including in Brazil. This increase is associated to alcohol and tobacco consumption, but genetic susceptibility also should be considered.

The aim of this study was to evaluate the frequency of the polymorphism in genes of alcohol metabolizing enzymes in patients with head and neck cancer (HNC) of the Heliópolis Hospital in São Paulo, compared with a group from the same hospital, without the diagnosis of cancer. The genetic polymorphisms of the alcohol deshydrogenase enzyme (*ADH1C* Ile³⁵⁰Val, *ADH1B* Arg⁴⁸His, *ADH1B* Arg³⁷⁰Cys) and of the P450 cytochrome enzyme (*CYP2E1* PstI) was investigated by PCR-RFLP, in 451 individuals, being 207 histopathologically confirmed HNC patients (184 male and 23 female, mean age 54,3 ± 7,8 years) and 244 controls (225 male and 19 female, mean age 53,6 ± 9,3 years) selected in the same hospital. The smoking habit was revealed by 80% of the patients with HNC and 50% of the controls, the difference between the groups increased the HNC risk more than ten times (OR=11.1; 95% IC; 4.89-25.19). Just 7% of the patients reported never alcohol use against 22.5% of the controls, increasing more than four times the risk of HNC (OR=4.39 95% IC; 2.35-8.22). The daily consumption of alcohol above 30.655g/L/day (72.5% of the patients with HNC and 35.2% of the controls) was associated with increased risk of the HNC. The analysis of the genetic polymorphisms revealed that the mutate genotype *ADH1B* Arg⁴⁸His was more frequent in the controls (12.7%) than in the patients with HNC (5.8%) conferring protection to the disease (OR=0.42; 95% IC; 0.21-0.85). Similar results were observed for individuals with *ADH1B**2 (OR=0.41; 95% CI; 0.20-0.82) or *ADH1B**2/*ADH1C**1 (OR=0.32; 95% CI; 0.13-0.79) haplotypes. Multiple regression analyses showed that the mutant genotype *ADH1B* Arg⁴⁸His was associated to HNC protection for those that consumed alcohol lower than 30 g/l/day (OR=0.12; 95% IC; 0.03-0.52). However, when the daily alcohol consumption exceeded 30.655g/L/day

the HNC risk was higher in the presence (OR=4.42; 95% IC; 1.21-16.11) or not of the genotype *ADH1B Arg⁴⁸His* with the mutate allele (OR= 3.01; 95% CI, 1.90-4.78).The fast alcohol metabolizing genotypes seams to prevent HNC when the amount of alcohol intake is lower than 30.655 g/L/day.

Descriptors: alcohol dehydrogenase, acetaldehyde dehydrogenase, cytochrome P-450 CYP2E1, head and neck neoplasms, acetaldehyde, alcoholism, risk factors.

Lista de Figuras

Figura 1- Representação esquemática do processo de metabolização do álcool..... **9**

Figura 2- Representação esquemática da localização dos genes da família da álcool desidrogenase (ADH), modificado de EDENBERG, 2007 **13**

Figura 3- Identificação do polimorfismo do gene *ADH1B* Arg⁴⁸His após digestão com a enzima *Msl*I e eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. As linhas 1 e 2 representam indivíduos homozigotos para *ADH1B48* Arg/Arg; linha 3 indivíduo heterozigoto para a variante alélica (*ADH1B48* Arg/His); linha 4 indivíduo homozigoto para a mutação, *ADH1B48* His/His. Na identificação dos fragmentos gerados foi utilizado marcador de peso molecular (*ladder*) de 100pb **25**

Figura 4- Identificação do polimorfismo do gene *ADH1B* Arg³⁷⁰Cys após digestão com a enzima *A/w*NI e eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. As linhas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 14 representam os indivíduos *ADH1B370* Arg/Arg; linhas 3 e 12 identificam os indivíduos heterozigotos para o alelo variante (*ADH1B370* Arg/Cys); linha 13 indivíduo homozigoto para a mutação, *ADH1B370* Cys/Cys. Na identificação dos fragmentos gerados foi utilizado marcador de peso molecular (*ladder*) de 50pb **26**

Figura 5- Identificação do polimorfismo do gene *ADH1C* Ile³⁵⁰Val após digestão com a enzima *Ssp*I e eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. As linhas 1, 4, 6, 7, e 8 representam indivíduos *ADH1C* Ile/Ile, selvagens para a mutação; linhas 2, 3, e 5 indivíduos heterozigotos para o alelo variante (*ADH1C* Ile/Val); linha 9 ao indivíduo homozigoto para a mutação, *ADH1C* Val/Val. Na identificação dos fragmentos gerados foi utilizado marcador de peso molecular (*ladder*) de 100pb..... **27**

Figura 6- Identificação do polimorfismo do gene *CYP2E1* após digestão com a enzima *Pst*I e eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. As linhas 1, 2, 3, 5, 6, 7 e 8 representam indivíduos *CYP2E1* *c1/c1*, homozigotos selvagens; linha 4 indivíduos heterozigotos para a mutação *CYP2E1* *c1/c2*. Um ladder de 100bp foi utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos (LD).. **28**

Figura 7- Curva ROC para identificação do ponto de corte para consumo diário de álcool que maximiza o risco de CCP..... **35**

Lista de Tabelas

Tabela 1- Apresentação das classes de enzimas ADH identificadas em humanos, segundo sua nomenclatura, suas propriedades físico- químicas, e distribuição no organismo (Modificado de CRABB et al, 2004)	14
Tabela 2- Polimorfismos genéticos presentes nos diferentes haplótipos da enzima ADH, bem como localização gênica, subunidades formadas e propriedades físico-químicas da mesma. (modificado de Edenberg, 2007)	16
Tabela 3- Apresentação das classes de enzimas ALDH identificadas em humanos, segundo sua nomenclatura, suas propriedades físico-químicas, e distribuição no organismo (modificado de Crabb et al. 2004).	18
Tabela 4- Descrição das variáveis sócio-demográficas e de hábitos segundo 207 pacientes com CCP e 244 controles, e a contribuição no risco da doença..	34
Tabela 5- Avaliação do risco de CCP quando considerado em separado o consumo maior ou menor que 30,655 g/L/dia de álcool pelos pacientes com câncer controles .	35
Tabela 6- Avaliação da associação entre o consumo de álcool e de tabaco considerando-se em conjunto os 207 pacientes com CCP e os 244 controles	36
Tabela 7- Avaliação da associação entre o consumo maior ou menor que 30,655 g/L/dia de álcool e o habito de fumar considerando-se em conjunto os 207 pacientes com CCP e os 244 controles.	36
Tabela 8- Associação entre o hábito de fumar e de consumir bebidas alcoólicas relatado pelos 207 pacientes e com CCP e 244 controles e o risco do câncer de cabeça e pescoço controles.....	37
Tabela 9- Distribuição da freqüência (%) de polimorfismos nos genes de metabolização do álcool <i>ADH1B Arg⁴⁸His</i> , <i>ADH1B Arg³⁷⁰Cys</i> , <i>ADH1C Ile³⁵⁰Val</i> e <i>CYP2E1</i> nos pacientes portadores de CCP e nos controles.....	39
Tabela 10- Frequências alélicas e distribuição genotípica de <i>ADH1B Arg⁴⁸His</i> , <i>ADH1B Arg³⁷⁰Cys</i> , <i>ADH1C Ile³⁵⁰Val</i> e <i>CYP2E1</i> no grupo controle.....	40
Tabela 11- Frequências alélicas e distribuição genotípica de <i>ADH1B Arg⁴⁸His</i> , <i>ADH1B Arg³⁷⁰Cys</i> , <i>ADH1C Ile³⁵⁰Val</i> e <i>CYP2E1</i> no grupo de pacientes de CCP.....	41
Tabela 12- Distribuição da freqüência (%) dos haplótipos <i>ADH1B*1</i> , <i>ADH1B*2</i> e <i>ADH1B*3</i> e da combinação dos mesmos nos pacientes portadores de CCP e nos controles.....	42
Tabela 13- Avaliação da contribuição gene-ambiente por meio de análise de regressão logística múltipla, incluindo no modelo variáveis com p<0,02, como idade, uso de tabaco, cor de pele e consumo de álcool maior ou menor que 30,655 g/L/dia e o polimorfismo genético em <i>ADH1B Arg⁴⁸His</i>	44

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O álcool e o Câncer	3
1.2 Metabolização do álcool.....	7
1.3 Acetaldeído	11
1.4 Genes de metabolização do álcool	12
1.4.1 Álcool desidrogenase (ADH).....	12
1.4.2 Aldeído desidrogenase (ALDH)	17
1.4.3 Citocromo P450 (CYP2E1)	19
2. OBJETIVOS.....	21
3. MÉTODOS	22
3.1 Casuística	22
3.2 Material e Métodos.....	22
3.2.1 Análise Laboratorial	23
3.3 Análise Estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	30
4.1 Caracterização das populações estudadas.....	30
4.2 Padrões de consumo: álcool, fumo e dieta	31
4.3 Análise dos polimorfismos genéticos	37
5. DISCUSSÃO	45
5.1 Genes de metabolização do álcool e dependência.....	45
5.2 Genes de metabolização do álcool e câncer de cabeça e pescoço	49
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

O consumo de bebidas alcoólicas é um hábito socialmente aceito e o seu uso, crônico e abusivo, observado em praticamente 10% da população mundial. O metabolismo do álcool ocorre em paralelo com o de outros nutrientes, e a ingestão de pequenas quantidades parece gerar efeitos benéficos para o organismo, em especial o sistema cardiovascular. Por outro lado, o consumo crônico de grandes quantidades de bebidas alcoólicas pode levar a alterações indesejáveis no fígado, coração, pâncreas e no sistema nervoso, além de outras doenças como o câncer.

Parecem existir componentes biológicos, psicológicos, sócio-culturais e genéticos que predispõe ao consumo excessivo de bebidas alcoólicas chegando ao quadro clínico definido como alcoolismo. O componente genético tem sido investigado em estudos com gêmeos e adotados os quais parecem demonstrar que cerca de 40-60% da vulnerabilidade individual ao alcoolismo é herdada.

Embora se saiba que o consumo crônico e intensivo de bebidas alcoólicas é um fator de risco para o desenvolvimento de alguns tipos de câncer como da cavidade oral, faringe, laringe, esôfago e fígado, os mecanismos pelos quais o álcool está associado ao câncer no homem, ainda não estão definitivamente esclarecidos.

O álcool pode atuar como carcinógeno químico, e iniciar diretamente o câncer, pode funcionar como co-carcinógeno potencializando a ação de outras substâncias, ou mesmo atuar depois do processo carcinogênico inicial e servir como promotor do crescimento tumoral. O álcool parece aumentar a permeabilidade das células da mucosa oral a agentes carcinogênicos; presentes inclusive nas bebidas alcoólicas entre elas, as nitrosaminas e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; provoca agressão celular por meio de seus metabólitos como os aldeídos, além de estar

associado com deficiências nutricionais secundárias ao seu próprio consumo e diminuição dos mecanismos locais de defesa.

O principal agente carcinogênico do álcool parece ser o acetaldeído, um produto de sua metabolização que pode formar adutos de DNA e proteínas resultando na inativação de enzimas e alterações no sistema de reparo do DNA.

A suscetibilidade individual aos efeitos do consumo do álcool pode ser decorrente de complexas interações entre os genes e o meio ambiente, incluindo o próprio álcool e sua interação com outros nutrientes.

Alguns estudos têm apontado as variações polimórficas nos genes que codificam enzimas de metabolização do álcool para explicar a suscetibilidade ao alcoolismo e às doenças relacionadas ao seu consumo, inclusive o câncer. As enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH) são as principais responsáveis pela metabolização do álcool, por meio da oxidação do etanol em acetaldeído e acetato, no fígado. Também a enzima microsomal CYP2E1 desempenha um papel fundamental como segunda via de metabolização do álcool.

A avaliação da contribuição de polimorfismos de genes que codificam as enzimas de metabolização do álcool no risco de câncer de cabeça e pescoço é objeto de estudo da presente investigação.

1.1. O álcool e o câncer

Neoplasia (do Grego “novo crescimento”) é a proliferação anormal e incontrolada das células em um tecido ou órgão. A proliferação celular pode levar a formação de tumores malignos com alto grau de anaplasia, capacidade de invadir estruturas celulares vizinhas e habilidade de se espalhar pelo sistema linfático e pela corrente sanguínea para outros órgãos (ROBBINS, 2000).

O termo câncer é um sinônimo comum para neoplasmas, é usado como um termo geral. Os mais freqüentes são carcinomas, tumores malignos que acometem células epiteliais, sarcomas que são derivados de tecidos moles (músculo, vasos sanguíneos e tecidos adiposos) e ossos e gliomas que resultam da transformação de células da glia no sistema nervoso central (THOMPSON & THOMPSON, 1993).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, IARC 2008 (*International Agency for Research on Cancer*) estimou para o ano de 2008, 12,4 milhões de novos casos de todos os tipos de câncer (6.672.000 em homens e 5.779.000 em mulheres), 7,6 milhões de mortes em decorrência da doença (4.293.000 dos homens e 3.300.000 das mulheres) e 28 milhões de pessoas vivendo com câncer nos cinco primeiros anos após o diagnóstico da doença. A IARC (2008) também estimou que mais da metade dos casos de câncer e dois terços das mortes causadas pela doença surgem nos países de média e baixa renda. Em geral, o câncer está associado com a maior expectativa de vida e crescimento populacional. Estimativas publicadas recentemente no documento “World Cancer Report” (IARC, 2008) indicam que países de alta renda tendem a crescer 4% nos próximos 20 anos enquanto que em países de média e baixa renda o crescimento esperado é de 30% sendo de 5% a 10% a proporção de indivíduos com idade maior que 65 anos. Em

vista da forte associação entre taxas de câncer e idade, esses fatores poderão aumentar a incidência da doença nesses países, inclusive no Brasil.

Existem diferenças entre os países na frequência com que os vários tipos de câncer ocorrem, principalmente entre os países ricos e de média e baixa renda. Nos países de alta renda os cânceres de pulmão, seio, próstata e coloretal predominam, sendo um terço deles causados pelo uso de tabaco e 10% por infecção crônica (STEWART e KELIHUES, 2003). Nos países de média e baixa renda os cânceres mais comuns são o de estômago, fígado, cavidade oral e cérvix (BOYLE, 2006; PARKIN, 2006), sendo um quarto deles causado por infecções crônicas e 12% pelo uso do tabaco (IARC, 2008).

Câncer de cabeça e pescoço (CCP) é um termo amplo que engloba malignidades epiteliais, originárias do epitélio de revestimento das vias aerodigestivas superiores, que surgem nos lábios e cavidade oral, identificado pelo Código Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O/2), como sendo CID-O C00, C02-C06; cavidade nasal e seios paranasais, CID-O C30.0, 31.0,1; faringe, CID-O C01, C05.1,2, C09, C10.0,2,3, C11-13; laringe, CID-O C32.0, 1,2, C10.1; glândulas salivares, CID-O C07, C08 e glândula tireóide, CID-O C73 (MINISTÉRIO DA SAÚDE e INCA, 2004). Estimativas mundiais revelam que, 644.000 novos casos de CCP são diagnosticados por ano com dois terços ocorrendo em países em desenvolvimento, com incidência três vezes maior nos homens do que nas mulheres (HIRAKI, 2007).

Em especial o câncer de cavidade oral é o quinto mais incidente entre os homens e o sétimo entre as mulheres no Brasil. As estimativas de 2008 para o Brasil foram de 10.380 novos casos para os homens e 3.780 para as mulheres por 100.000 habitantes (INCA, 2009). Para o estado de São Paulo as estimativas para 2008

foram de 3.490 homens e 1.020 mulheres e na cidade de São Paulo 1.040 casos novos em homens e 290 em mulheres, por 100.000 habitantes (INCA, 2009).

Alguns autores têm apontado uma maior incidência de câncer de boca e de laringe dentro de determinadas famílias (NEGRI, 2009). Estudos realizados no Brasil mostraram um aumento duas vezes maior no risco de câncer de laringe em indivíduos que relataram câncer em outros membros da família, independente da localização, sendo que o risco foi ainda maior quando o parente relatou câncer de cabeça e pescoço (FOULKES, et al 1995). O risco aumentado nessas famílias pode ser decorrente de mutações herdadas, em genes promotores ou supressores de câncer, associado ou não com a capacidade individual de metabolizar substâncias potencialmente carcinogênicas (NEGRI, 2009).

Durante a última década, a incidência do câncer na base da língua e nas tonsilas aumentou, especialmente entre pessoas com idades abaixo dos 45 anos (ARGIRIS et al, 2008) . Essa mudança pode estar associada ao aumento na prevalência da infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) nos países em desenvolvimento, principalmente associado à prática de sexo oral, e o maior número de parceiros sexuais (ARGIRIS et al, 2008; SOUZA E GONÇALVES, 2009).

O HPV tem sido identificado em tumores de diversos sítios da cabeça e pescoço, entretanto diferente do câncer de colo uterino, não existem dados confirmando o papel da carcinogênese do HPV no CCP (SOUZA e GONÇALVES, 2009).

A dieta também pode modificar o risco de CCP. O consumo excessivo de carnes vermelhas e alimentos ricos em gorduras animais e a não ingestão de frutas e verduras aumentam os riscos de CCP (NAVARRO SILVERA et al, 2008).

O uso crônico e intenso de tabaco aumenta de cinco a 20 vezes o risco de desenvolvimento do CCP, sendo que o álcool parece contribuir de forma sinérgica para o risco da doença. Uma pessoa que fuma mais de 40 maços por ano e consome cinco doses de álcool por dia, tem um risco 40 vezes maior de desenvolver o CCP (MARUR e FORASTIERE, 2008).

O sinergismo entre consumo de álcool e tabaco foi primeiramente relatado nos anos 70 e desde então se tornou um paradigma da interação de dois fatores ambientais na carcinogênese humana. O efeito carcinogênico do álcool, independentemente do tabaco (risco aumentado para não fumantes), foi primeiramente relatado em 1961 (IARC 1988; NG et al., 1993; BOSETTI et al., 2002) e tem sido reproduzido desde então (BOFFETTA e HASHIBE, 2006).

Estes estudos mostraram a relação consistente entre dose-resposta e o risco de câncer no trato aerodigestivo superior. Outros autores verificaram que o risco por sítio anatômico, com equivalentes níveis de consumo de álcool, não mostrou diferença estatisticamente significativa, não havendo um sítio anatômico considerado de maior risco (CASTELLSAGUÉ et al., 2004).

Em fevereiro de 2007 um grupo de epidemiologistas e pesquisadores de diversos países reuniu-se para avaliar o papel do álcool e seu primeiro metabólito, acetaldeído, como potenciais carcinógenos em animais de experimentação e em humanos. Este grupo concluiu através de dados epidemiológicos que a ocorrência de tumores malignos na cavidade oral, faringe, laringe, esôfago, fígado, colo do reto e seio estão relacionados com o consumo de bebidas alcoólicas, portanto o álcool poderia ser considerado carcinogênico para estes órgãos (BAAN et al, 2007).

Algumas hipóteses para explicar a associação entre álcool e câncer têm sido discutidas na literatura (SEITZ e STICKEL, 2007). Parte delas evidencia a

contribuição da ação direta do álcool com o trato superior gastrointestinal, outras consideram os efeitos do álcool como solvente para os agentes carcinogênicos presentes inclusive no cigarro, sendo também discutido o papel das enzimas microssomais do citocromo P450, que são induzidas na presença do álcool e estão envolvidas no processo de carcinogênese, geração de radicais livres de oxigênio e produtos de peroxidação de lipídeos (SEITZ e STICKEL, 2007; IARC, 2008). Além disso, deficiências nutricionais, especialmente vitaminas e minerais, além de supressão ou diminuição da imunidade observada em alcoólicos crônicos também pode contribuir com o maior risco de câncer (NAVARRO SILVERA, 2008).

1.2. Metabolização do álcool

O álcool etílico ou etanol, cuja fórmula química é $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, é uma molécula pequena, de peso molecular 46,07, sendo um composto orgânico derivado de um único grupo hidroxila, pertencente à classe dos alcoóis alifáticos, tais como o álcool metílico, propílico e outros (WHITE, 1988).

O etanol utilizado na fabricação de bebidas geralmente é produzido por meio da fermentação por fungos, de diferentes carboidratos. Concentrações que variam de 12 a 14% de álcool são capazes de interromper o processo de fermentação. Os vinhos contêm em média 10-12% de álcool, as cervejas de 4-6% e a maior parte dos destilados de 20-50% de etanol (HENDRIKS, 2005).

Após a ingestão o etanol é totalmente absorvido pelas membranas do trato digestivo, principalmente pelo estômago e porção proximal do intestino delgado. A velocidade de absorção depende de diversos fatores como plenitude gástrica, quantidade, tipo e concentração da bebida ingerida, intervalos de tempo entre as

doses, entre outros. Por ser um solvente bem mais solúvel em água do que em gorduras, a sua distribuição em todos os líquidos do organismo, quer no ambiente celular ou extracelular, vai depender diretamente da quantidade de água existente no tecido. A passagem do álcool, por um simples processo de difusão, é livre em todos os órgãos, podendo ultrapassar facilmente a barreira placentária (CRABB et al, 2004).

Uma vez ingerido, somente de 5 a 15% do etanol é excretado de forma inalterada pelos pulmões, rins, suor e saliva. O restante é metabolizado basicamente no fígado, na proporção aproximada de 7 g de etanol por hora (HENDRIKS, 2005).

A principal via de eliminação do etanol ocorre por meio de oxidação à acetaldeído e posterior transformação em ácido acético e água. Estas reações são catalisadas pelas enzimas ADH e ALDH respectivamente, ambas as enzimas NAD⁺ (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) dependentes.

A primeira etapa de oxidação do etanol em acetaldeído (AA) ocorre principalmente no fígado por meio da ADH, existente no citosol do sistema microssomal oxidante do etanol (SMOE), localizado no retículo endoplasmático liso e por meio de catalases existentes nos peroxissomas. Na segunda etapa, a conversão do acetaldeído em acetato e água, é feita principalmente pela ALDH presente no citosol e na matriz mitocondrial do hepatócito (BRENNAN et al, 2004), conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1- Representação esquemática do processo de metabolização do álcool

A capacidade de regeneração do NAD⁺, as propriedades catalíticas e a quantidade de ADH no fígado, além da variabilidade na expressão do *ADH*, constituem fatores importantes na velocidade de oxidação do etanol (BRENNAN et al, 2004).

O processo inicial do metabolismo (*First Pass Metabolism-FPM*) é a diferença entre a quantidade de droga administrada oralmente e a quantidade de droga que alcança a circulação sistêmica e, conceitualmente, é o resultado do metabolismo da droga pelas vísceras e pelo fígado durante a fase de absorção. O FPM é importante, pois reduz a quantidade de droga que atinge os órgãos alvo, mas pode também predispor os tecidos viscerais às injúrias decorrentes do metabolismo do álcool. O trato gastrointestinal, semelhante ao fígado, contém enzimas do citocromo P450, envolvidas na metabolização de xenobióticos, além da ADH. (CRABB et al, 2004)

O etanol ingerido é absorvido vagarosamente pelo estômago, órgão no qual, ocorre o processo de oxidação. Após deixar o estômago, o etanol é rapidamente absorvido pela parte proximal do intestino delgado. O etanol absorvido através da

mucosa das vísceras é carregado para o fígado pela veia porta, onde uma pequena porção é metabolizada antes de deixar o órgão (CRABB et al, 2004).

O grupo de LIEBER (1986), pioneiro no estudo de FPM, mostrou ser mais fácil detectar FPM com baixas doses de etanol (0.3 g/Kg, equivalente à aproximadamente 20 g de etanol ou duas doses) quando o esvaziamento gástrico é diminuído devido à presença de alimento. Assim sendo, quando grandes doses de etanol são ingeridas em condições que o esvaziamento gástrico ocorre rapidamente, a diferença entre as curvas de concentração álcool no sangue são muito pequenas para que sejam medidas com precisão. Enquanto o fenômeno de FPM está bem estabelecido, o órgão em que ele ocorre não está, sendo o estômago considerado o principal candidato (LIM et al, 1993).

Alguns estudos sugerem que também ocorre FPM no fígado. A FPM hepática é dependente da taxa pela qual o etanol é absorvido (CRABB et al, 2004). O FPM gástrico parece proteger o fígado e outros órgãos de baixas doses de etanol, e por certas drogas de bloqueio do FPM (ROINE et al, 1990; CABALLERIA et al, 1991), resultando em intoxicação por doses menores do que esperadas de etanol. Além do mais, esse processo parece ser decorrente da interseção que ocorre entre o tipo de dieta e o tempo entre as refeições e o consumo de etanol (CRABB et al, 2004).

Depois da absorção e a passagem pelo estômago, o etanol é distribuído na circulação sanguínea sendo depois metabolizado no fígado e transformado em acetaldeído pela enzima ADH presente no citosol e pela enzima do citocromo P450 2E1 (CYP2E1), presente nos microsomos. Posteriormente o acetaldeído formado é convertido em acetato e água pela enzima ALDH, especialmente a isoenzima mitocondrial ALDH2. O produto final é liberado do fígado e metabolizado pelo coração e músculos (SEITZ e PÖSCHL, 1997). A velocidade no metabolismo do

etanol, que ocorre pela ADH e ALDH2 pode ser crítica na determinação de sua toxicidade, pois o próprio percurso do metabolismo é potencialmente tóxico. A atividade máxima da ADH e ALDH no fígado é similar, sendo que cada enzima contribui de igual forma para o controle da taxa de oxidação do álcool (BRENNAN et al, 2004).

1.3. Acetaldeído (AA)

O acetaldeído (AA) não ocorre apenas como resultado da oxidação do álcool mas é também encontrado no cigarro, na produção de alimentos e na indústria. O AA tem seus efeitos na saúde investigados desde o início da década de 50 e sua relação com o câncer desde a década de 70 (LACHENMEIER et al., 2009).

De acordo com o IARC (1999), evidências indicam que o acetaldeído (AA) deve ser considerado um agente carcinogênico, pelo menos em animais de experimentação. A inalação de AA por ratos e hamsters resulta em câncer na mucosa nasal e na laringe destes animais. A administração, a longo prazo, do AA na água dos animais leva ao crescimento excessivo das células da mucosa do trato digestivo superior. Essas alterações são similares com aquelas observadas após a ingestão crônica do álcool em seres humanos (IARC, 1999). O AA também induz o processo inflamatório e a transformação das células da traquéia, interfere na reprodução normal das células e provoca lesão da mucosa gastrointestinal, associado ao crescimento excessivo das células (SEITZ e STICKEL, 2007).

Uma das maneiras pela qual o AA parece induzir o câncer é interferindo no processo de replicação do DNA, de células em divisão, e acarretando alterações pontuais no DNA, por exemplo troca de um único par de bases, ou mesmo

alterações maiores que envolvem extensas regiões do DNA (OBE et al, 1986, DEMIRHAN e TASTEMIR, 2008).

O AA também parece alterar as funções de reparo do DNA, impedindo que algumas enzimas específicas desse processo atuem de forma adequada, gerando adutos de DNA, ou de proteínas. Como resultado final os adutos formados podem levar a erros de replicação e/ou mutação também em oncogenes ou em genes supressores tumorais (SEITZ e BECKER, 2007).

Embora a maior parte do AA encontrado no organismo seja resultante do metabolismo do álcool uma parte dele parece ser oriunda de bactérias que vivem no trato gastrointestinal. Na falta de oxigênio as bactérias existentes na boca e estômago podem converter carboidratos em AA e etanol. Além do AA ser produzido por enzimas celulares ou bactérias gastrointestinais, ele pode também ser encontrado em algumas bebidas alcoólicas como o calvados (destilado de maçã) e no cigarro (SEITZ e BECKER, 2007).

1.4. Genes de metabolização do álcool

1.4.1. Álcool desidrogenase (ADH)

A enzima álcool desidrogenase (ADH) é produzida a partir de uma família de genes do mesmo nome, localizada em uma pequena região (~ 365 Kb) do cromossomo 4 (4q21-q23) conforme ilustrado na Figura 1. Esses genes codificam enzimas que metabolizam uma variedade de substratos, incluindo, etanol, retinol, outros alcoóis alifáticos, hidroxisteróides e produtos de peroxidação de lipídeos (AGARWAL, 2001; BRENNAN et al, 2004).

Figura 2- Representação esquemática da localização dos genes da família da álcool desidrogenase (ADH), modificado (EDENBERG, 2007)

As enzimas codificadas pelo *ADH* são diméricas com subunidades moleculares de peso de 40 Kda. Essas enzimas são classificadas em relação às propriedades enzimáticas e na extensão das similaridades de suas seqüências de nucleotídeos. Apenas subunidades das enzimas pertencentes à mesma Classe podem formar heterodímeros (AGARWAL, 2001).

Existem pelo menos sete *loci* gênicos que codificam ADH em humanos, formados pelas associações de diferentes tipos de subunidades estruturais. As enzimas primárias na conversão de etanol em acetaldeído são codificadas por dois genes da Classe I dos ADH's (OSIER et al, 2004). As classes I, II e possivelmente IV participam da oxidação do etanol *in vivo*. As propriedades das enzimas em cada uma de suas classes estão resumidas na Tabela 1 (CRABB et al, 2004, modificado).

As isoenzimas da classe I são formadas pela associação aleatória de qualquer dos três tipos de subunidades do polipeptídeo, α , β e γ , que são controlados por três *loci* gênicos separadamente, *ADH1A*, *ADH1B*, *ADH1C*, (antigos *ADH1*, *ADH2* e *ADH3*), respectivamente. Essas isoenzimas tem baixo Km, e são consideradas as

mais importantes no metabolismo do etanol além de serem abundantes no fígado (AGARWAL, 2001).

Tabela 1: Apresentação das classes de enzimas ADH identificadas em humanos, segundo sua nomenclatura, suas propriedades físico-químicas, e distribuição no organismo (Modificado de CRABB et al, 2004).

Gene	Nova nomenclatura	Subunidade	Km (etanol)*	V max**	Distribuição
Classe I					
<i>ADH 1</i>	<i>ADH1A</i>	α	4	54	Fígado
<i>ADH 2</i>	<i>ADH1B</i>	β	0.05-34.0	-	fígado, pulmão
<i>ADH 3</i>	<i>ADH1C</i>	γ	0.6-1.0	-	fígado, estômago
Classe II					
<i>ADH 4</i>	<i>ADH4</i>	π	34	40	fígado, córnea
Classe III					
<i>ADH 5</i>	<i>ADH5</i>	χ	1000	-	maioria dos tecidos
Classe IV					
<i>ADH 6</i>	<i>ADH6</i>	σ, μ	20	1510	estômago, esôfago, outras mucosas
Classe V					
<i>ADH 7</i>	<i>ADH7</i>	-	30	nd	fígado, estômago
Classe VI					
<i>ADH 8</i>	<i>ADH8</i>	-	-	-	não detectado no homem

***Km -Constante de Michaelis-** indica a concentração do etanol na qual a enzima trabalha em 50% de sua capacidade(μ M); ** **V Max-** velocidade máxima (μ moles/minuto); nd: não descrita

Existem por volta de 240 SNP's (*Single Nucleotide Polymorphisms*) na região onde estão localizados os sete genes *ADH*, a maior parte em regiões não codificadoras, alguns nas regiões flangeadoras dos genes modificando sua expressão, e alguns em regiões codificadoras, que resultam na produção de enzimas com propriedades cinéticas diferentes. *ADH1B* e *ADH1C* tem alguns desses SNP's nas regiões codificadoras, modificando a seqüência de aminoácidos que codifica a proteína (EDENBERG, 2007).

Existem dois sítios polimórficos para o *ADH1B*, chamados de Arg⁴⁸His (anteriormente Arg⁴⁷His) no exon 3 (rs1229984) e Arg³⁷⁰Cys (anteriormente Arg³⁶⁹His) no exon 9 (rs2066702). A proximidade desses genes faz com que eles

sejam herdados em conjunto, sem que haja recombinação entre eles, formando os chamados haplótipos.

O *ADH1B* possui três haplótipos diferentes sendo que o haplótipo *ADH1B*1*, considerado referência, codifica a subunidade β que possui o aminoácido arginina (Arg) tanto na posição 48 como na posição 370 da sequência de DNA. O *ADH1B*2* codifica a subunidade β_2 , onde o aminoácido histidina (His) encontra-se na posição 48 e o aminoácido (Arg) na posição 370 e o *ADH1B*3* codifica a subunidade β_3 e tem uma (Arg) na posição 48 e uma cisteína (Cys) na posição 370 (Tabela 2).

O haplótipo *ADH1B*2* codifica enzimas que tem a taxa de metabolização de 70 a 80 vezes maior do que o haplótipo *ADH1B*1*, sendo mais freqüente em indivíduos de origem Asiática (EDENBERG, 2007). O haplótipo *ADH1B*1* é predominante em Caucasianos e populações Afro-Americanas e o *ADH1B*3* aparece em 25% da população Afro-Americana (EDENBERG, 2007; CRABB et al, 2004; BRENNAN et al, 2004).

Os sítios polimórficos para o *ADH1C* são Ile³⁵⁰Val (anteriormente Ile³⁴⁹Val) no exon 8 (rs698), e Arg²⁷²Gln no exon 6, (rs1693482). O haplótipo *ADH1C*1* codifica a subunidade γ_1 que tem uma isoleucina (Ile) na posição 350 e uma (Arg) na posição 272. O haplótipo *ADH1C*2* codifica a subunidade γ_2 , que corresponde a uma valina (Val) na posição 350 e um glutamina (Gln) na posição 272. O haplótipo *ADH1C*1* que produz duas subunidades γ_1 tem uma taxa de metabolização de aproximadamente 70% maior do que a enzima $\gamma_2 \gamma_2$ (HO et al, 2007). O haplótipo *ADH1C*1* é predominante em Japoneses, Chineses e Afro-Americanos, mas também ocorre em Caucasianos (RAMCHANDANI et al, 2001; BRENNAN et al, 2004).

Tabela 2. Polimorfismos genéticos presentes nos diferentes haplótipos da enzima ADH, bem como localização gênica, subunidades formadas e propriedades físico-químicas da mesma. (modificado de Edenberg, 2007).

Gene/Polimorfismo	Exon	Haplótipos	Subunidades	Km*	Turnover**
ADH1B					
ADH1B Arg⁴⁸His	3	ADH1B*1- Arg48, Arg370	β1	0,05	4
ADH1B Arg³⁷⁰Cys	9	ADH1B*2- His48, Arg370	β2	0,9	350
		ADH1B*3- Arg48, Cys370	β3	40,0	300
ADH1C					
ADH1C Arg²⁷²Gln	8	ADH1C*1- Arg272, Ile350	γ1	1,0	90
ADH1C Ile³⁵⁰Val	6	ADH1C*2- Gln272, Val350	γ2	0,6	40

Km Constante de Michaelis**- indica a concentração do etanol na qual a enzima trabalha em 50% de sua capacidade (μM). *Turnover** - indica quantas moléculas de etanol a enzima transforma em acetaldeído em 1min em concentrações de saturação de etanol

Na avaliação da freqüência de polimorfismos nos genes *ADH* os alelos mais freqüentes são os presentes no haplótipo *ADH1B*1* e *ADH1C*1*, sendo que os homozigotos para os alelos referência de ambos os haplótipos são capazes de oxidar cerca de 70% do total do álcool do fígado. Os indivíduos homozigotos para o alelo referência *ADH1B*1* e para os alelos mutantes do *ADH1C*2*, a capacidade total de oxidação do álcool é de 80% aproximadamente. Por outro lado, indivíduos homozigotos para as variantes alélicas *ADH1B*2* e homozigoto para os alelos referência *ADH1C*1*, a capacidade de oxidação é quase oito vezes maior. Também a associação dos haplótipos *ADH1B*3* e *ADH1C*1*, parece aumentar praticamente duas vezes a capacidade de oxidação do álcool quando comparado com indivíduos que possuem os alelos referência para os dois haplótipos. Portanto resumindo podemos dizer que os haplótipos *ADH1B*2* e *ADH1B*3* estão associados à maior capacidade oxidativa do álcool, enquanto que o haplótipo *ADH1C*2* parece estar associado a uma redução dessa capacidade de oxidação (EDENBERG, 2007).

1.4.2 Aldeído desidrogenase (ALDH)

O gene ALDH localiza-se no braço longo do cromossomo 12 (12q24.2) e é composto por 13 exons. Suas enzimas têm um vasto substrato, específico para aldeídos alifáticos e aromáticos, os quais são oxidados irreversivelmente para as suas formas correspondentes em ácidos carboxílicos (CRAB et al., 2004).

Os ALDH's são expressos numa maior quantidade de tecidos do que as isoenzimas ADH's. A nomenclatura para o ALDH tem sido revisada. A classificação é baseada nas suas propriedades cinéticas e similaridades nas seqüências, da seguinte maneira: classe I, baixo Km citosólico; classe II, baixo Km mitocondrial e classe, III alto Km, como os expressos em tumores, estômago e córnea, conforme apresentado na Tabela 3.

As mais importantes enzimas para a oxidação do acetaldeído são a citosólica ALDH1 e a mitocondrial ALDH2 (GREENFIELD & PIETRUSZKO, 1977), ambas enzimas tetraméricas compostas de subunidades de 54 KDa. A ALDH1 tem um baixo Km para o acetaldeído e é sensível ao disulfiram *in vitro* (GREENFIELD & PIETRUSZKO, 1977; DICKINSON & KITSON, 1981). A ALDH2 tem um Km submicromolar para o acetaldeído e é menos sensível ao disulfiram *in vitro*. (CRABB et al, 2004).

Tabela 3. Apresentação das classes de enzimas ALDH identificadas em humanos, segundo sua nomenclatura, suas propriedades físico-químicas, e distribuição no organismo (modificado de Crabb et al. 2004).

Gene	Subunidade	Km*	Distribuição
CLASSE I <i>ALDH1</i> (citossólico)	$\alpha 4$	30	alguns tecidos, fígado > rim
CLASSE II <i>ALDH2</i> (mitocondrial) <i>ALDH 5</i>	$\alpha 4$ nd	1 nd	baixos níveis em diversos tecidos baixos níveis na maioria dos tecidos
CLASSE III <i>ALDH3</i>	$\alpha 2$	11	estômago, fígado, córnea

*Km Constante de Michaelis- indica a concentração do etanol na qual a enzima trabalha em 50% de sua capacidade (μM); nd: não descrito

Similar à Classe I do ADH, o gene *ALDH2* é polimórfico e suas variações demonstram um papel vital do ALDH2 na oxidação do etanol. O consumo de álcool causa *flushing*, ou seja, vermelhidão facial, numa grande quantidade de Japoneses, Chineses e Coreanos (BROOKS et al, 2009). A reação tem sido observada em crianças asiáticas que entram em contato com o álcool, sugerindo uma base genética. Estudos de famílias de alcoólicos indicam que a reação de *flushing* se manifesta como um traço dominante (SCHWITTERS et al, 1982) e parece ser decorrente do acúmulo de acetaldeído (BROOKS et al, 2009). Indivíduos que não apresentam esta manifestação quando bebem álcool revelam um pequeno aumento nos níveis de acetaldeído (5-10 μM). Entretanto, naqueles que apresentam vermelhidão no rosto os níveis de acetaldeído são variados, e podem inclusive exceder 100 μM (ENAMOTO et al, 1991). A reação de *flushing* causada pelo dissulfiram (Antabuse), um medicamento para o tratamento da dependência do álcool, é a mesma que ocorre nos Asiáticos, sugerindo que deficiência da enzima ALDH2 é responsável pela reação de *flushing* nessa população. (HO et al, 2007)

Em uma grande porcentagem (cerca de 40%) de Japoneses tem sido achada a falta de atividade da ALDH2 em amostras da raiz do cabelo e do fígado (HARADA et

al, 1982,1983) e a maioria desses indivíduos tem a reação de *flushing* quando bebem, novamente sugerindo que ALDH2 deve ter um papel crucial na manutenção dos baixos níveis de acetaldeído durante a oxidação do álcool.

A mutação responsável pela deficiência da enzima é uma substituição G→A que resulta na troca de um glutamato por uma lisina na posição 504 (anteriormente acreditava-se que o polimorfismo encontrava-se na posição 487 do *ALDH2* (LI, 2009).

O alelo normal é chamado de *ALDH2*1* e o alelo mutante de *ALDH2*2*. O *ALDH2*2* homozigoto não tem atividade enzimática, enquanto o heterozigoto apesar da redução ainda possui uma atividade enzimática detectável (CRABB et al, 1989, 2004; OOTA et al, 2004).

Medições feitas na atividade do ALDH2 sugeriram que cerca de 40% da atividade total da enzima ALDH é a ALDH2 e os outros 60% são as outras formas da enzima (CRABB et al, 2004).

Outro polimorfismo gênico, localizado na região promotora do *ALDH2* foi simultaneamente descrito na literatura (HARADA et al,1999; CHOW et al,1999). Os autores mostraram que o alelo A era menos comum num grupo de alcoólicos com a ALDH2 ativa. Essas variações foram observadas em todos os grupos étnicos estudados. Em pesquisas de transfecção de gene, o alelo A foi menos ativo que o alelo G (HARADA et al,1999).

1.4.3. Citocromo P450 2E1 (CYP2E1)

Uma pequena, porém significativa parte do etanol ingerido (10% ou menos) é metabolizado por vias alternativas. O metabolismo do álcool pela enzima

microsomal CYP2E1 é considerado a segunda maior via, no fígado, depois da ADH, principalmente quando existe o consumo crônico de bebidas alcoólicas (AGARWAL, 2001).

O gene *CYP2E1* possui dois polimorfismos identificados pelas enzimas de restrição *Pst*I e *Rsa*I que estão em desequilíbrio de ligação e alteram a atividade de transcrição do gene. A variante genética identificada pela enzima de restrição *Pst*I, na região que margeia o gene, demonstra uma atividade de transcrição quase dez vezes maior quando comparada com o alelo selvagem, fato esse que resulta em uma maior concentração de AA no sangue, após ingestão de álcool (PÖSCHL e SEITZ, 2004).

A enzima CYP2E1 atua também na metabolização de outros xenobióticos que não o álcool, participando da chamada fase I de metabolização, que ocorre principalmente com as enzimas do citocromo P450. Dentre os compostos metabolizados pela CYP2E1 incluem-se procarcinógenos como as nitrosaminas, afloxinas, vinilclorados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e hidrozaminas, que podem ser transformados em carcinógenos, provavelmente modificando o risco de câncer (PÖSCHL e SEITZ, 2004).

Como anteriormente apresentado, a frequência de polimorfismos em genes de metabolização do álcool pode modificar o risco de câncer de cabeça e pescoço, associado com outros hábitos de consumo, como, por exemplo, o cigarro. O conhecimento da frequência destes polimorfismos em nossa população, bem como a avaliação da contribuição destes polimorfismos no risco de câncer pode ser um indicativo importante na prevenção e acompanhamento de populações de risco.

2. OBJETIVOS

1. Investigar a contribuição de polimorfismos de genes responsáveis pela metabolização do álcool (*ADH1B*, *ADH1C* e *CYP2E1*) na susceptibilidade ao câncer de cabeça e pescoço.

2. Analisar a interação destes polimorfismos genéticos com os principais fatores de risco reconhecidos para o câncer de cabeça e pescoço como o tabaco e álcool.

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

A seleção dos participantes deste estudo teve início em dezembro de 2000 e parte dos pacientes continua ainda em atendimento. Foram considerados casos elegíveis pacientes maiores de 18 anos de idade, moradores na região metropolitana da cidade de São Paulo e com diagnóstico histopatológico confirmado de carcinoma epidermóide da cavidade bucal, faringe (orofaringe e hipofaringe) ou laringe, admitidos no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis, São Paulo.

O grupo controle foi composto de pacientes do mesmo hospital sem história de câncer, com idade superior a 18 anos, também moradores da região metropolitana da cidade de São Paulo. Todos os controles foram selecionados em diferentes clínicas do Hospital Heliópolis, no mesmo período no qual os pacientes com câncer foram avaliados. Na seleção dos controles procuramos ajustar as idades e o sexo em relação aos casos, variando no máximo cinco anos entre os grupos. Os controles foram selecionados principalmente nos serviços de gastroenterologia e cardiologia.

3.2. Material e Métodos

Todos os pacientes deste estudo foram entrevistados por meio de um questionário padronizado que permitiu avaliar hábitos de tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, hábitos alimentares e tipos de ocupações. O mesmo questionário foi aplicado aos pacientes com CCP e aos controles.

Na análise do consumo de tabaco considerou-se a medida maços/ano – uma variável que incluiu tanto a intensidade como a duração de consumo. Ao final considerou-se o número de maços de cigarros fumado por dia pelo número de anos que a pessoa fumou, sendo que um maço/ano correspondeu a fumar um maço de 20 cigarros por dia por um ano.

Informações sobre a frequência e a quantidade de álcool consumido foram coletadas considerando-se em separado os diferentes tipos de bebidas, de acordo com o teor de álcool, incluindo cervejas (5%), vinhos (20%), destilados (45%) ou mesmo bebidas com alto teor alcoólico como a cachaça com 41% de álcool.

Na avaliação da cor de pele houve uma constatação subjetiva do entrevistador embora tenha sido incluído no questionário informações sobre a cor de pele dos parentes em primeiro grau do paciente. Na entrevista o paciente relatava a sua cor de pele (auto definição) e de seus pais e avós. Foram considerados de cor de pele branca ou negra aqueles que relataram a mesma cor de pele nas três gerações e mulatos ou pardos quando havia mistura na cor de pele nas gerações.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa dos respectivos centros envolvidos bem como o termo de Consentimento Informado assinado pelos indivíduos participantes.

3.2.1 Análise Laboratorial

Amostras de 5 ml de sangue periférico foram coletadas em EDTA e transportadas para o Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do

Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da USP (LIM-40), para análise dos polimorfismos genéticos.

Primeiramente o DNA foi extraído dos linfócitos, com solução salina saturada (MILLER et al., 1988) e as amostras foram conservadas em freezer -20⁰ C.

Foram analisados os polimorfismos dos genes de metabolização do álcool, *ADH1B* Arg⁴⁸His no exon 3, *ADH1B* Arg³⁷⁰Cys no exon 9, *ADH1C* Ile³⁵⁰Val no exon 8, e *CYP2E1* na região 5' de regulação do gene.

A genotipagem realizada por PCR-RFLP consistiu na amplificação da região do gene de interesse por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*), procedendo-se em seguida a digestão com enzimas de restrição específicas para identificação de mutações em um único nucleotídeo (SNPs).

As reações de PCR para amplificação das seqüências contendo os SNPs partiram de 50 a 100 ng de DNA genômico, em reações com tampão para PCR 10X concentrado, 50 mM MgCl₂, 10 pmol de cada *primer*, 10 mM de dNTPs, 1,25 a 2,5 U de *Taq* DNA polimerase em um volume final de 12.5 µl de reação. Após a amplificação das regiões de interesse do DNA a identificação da presença ou não da mutação foi feita com enzimas de restrição específicas, e os resultados analisados em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV.

A genotipagem, dos genes *ADH1B* e *ADH1C*, foi feita seguindo os métodos descritos por XU et al (1998), com algumas modificações. Os *primers* utilizados para amplificar o gene *ADH1B* Arg⁴⁸His foram: 5' - ATT CTA AAT TGT TTA ATT CAA GAA G- 3' (*foward*) e 5' - ACT AAC ACA GAA TTA CTG GAC- 3' (*reverse*). A amplificação do DNA genômico foi realizada por 30 ciclos, sendo um minuto a 94°C para a denaturação, dois minutos a 58°C para o anelamento e dois minutos a 72°C para a

extensão. O alelo variante na posição 48 do gene *ADH1B* foi reconhecido após 12 horas de digestão com 2,5 unidades da enzima *Msl* (New England Biolabs) a 37°C. Os fragmentos formados foram de 685, 443 e 242 pares de bases (pb). Nos indivíduos homozigotos selvagens, *ADH1B*48 Arg/Arg a enzima *Msl* não reconheceu o sítio de restrição, gerando fragmentos de 685pb e nos indivíduos homozigotos para a mutação, *ADH1B*48 His/His fragmentos de 443pb e 242pb foram formados. Os indivíduos heterozigotos para a mutação apresentaram fragmentos de 685pb, 443pb e 242pb (Figura 3).

Figura 3: Identificação do polimorfismo do gene *ADH1B* Arg⁴⁸His após digestão com a enzima *Msl* e eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. As linhas 1 e 2 representam indivíduos homozigotos para *ADH1B*48 Arg/Arg; linha 3 indivíduo heterozigoto para a variante alélica (*ADH1B*48 Arg/His); linha 4 indivíduo homozigoto para a mutação, *ADH1B*48 His/His. Na identificação dos fragmentos gerados foi utilizado marcador de peso molecular (*ladder*) de 100pb

Para o gene *ADH1B* Arg³⁷⁰Cys utilizamos os *primers* 5'- TGG ACT TCA CAA CAA GCA TGT- 3' (*sense*) e 5'- TTG ATA ACA TCT CTG AAG AGC TGA- 3' (*antisense*) e as mesmas condições de amplificação do gene *ADH1B* Arg⁴⁸His. O alelo variante na posição 370 do gene *ADH1B* foi reconhecido após 12 horas, a 37°C, de digestão com 2,5 unidades da enzima *AlwNI* (New England Biolabs). Os fragmentos formados foram de 201pb, 130pb e 71 pb. Nos indivíduos homozigotos selvagens, *ADH1B*370 Arg/Arg, a enzima *AlwNI* não reconheceu o sítio de restrição,

gerando fragmentos de 201pb e nos indivíduos homozigotos para a mutação, *ADH1B370* Cys/Cys fragmentos de 130pb e 71pb. Os indivíduos heterozigotos para a mutação, *ADH1B* Arg³⁷⁰Cys apresentaram fragmentos de 201pb, 130pb e 71pb (Figura 4).

Figura 4: Identificação do polimorfismo do gene *ADH1B* Arg³⁷⁰Cys após digestão com a enzima *A/wNI* e eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. As linhas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 14 representam os indivíduos *ADH1B370* Arg/Arg; linhas 3 e 12 identificam os indivíduos heterozigotos para o alelo variante (*ADH1B370* Arg/Cys); linha 13 indivíduo homozigoto para a mutação, *ADH1B370* Cys/Cys. Na identificação dos fragmentos gerados foi utilizado marcador de peso molecular (*ladder*) de 50pb

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar o polimorfismo do gene *ADH1C* Ile³⁵⁰Val foram 5'- TTG TTT ATC TGT GAT TTT TTT TGT- 3' (*sense*) e 5'- CGT TAC TGT AGA ATA CAA AGC- 3' (*antisense*). A amplificação foi feita com DNA genômico por 30 ciclos, sendo um minuto a 94°C para a denaturação, um minuto a 51°C para o anelamento e trinta segundos a 72°C para a extensão. O alelo selvagem na posição 350 do gene *ADH1C* foi reconhecido após 12 horas a 37°C de digestão com 1,25 unidades da enzima *SspI* (New England Biolabs). Os fragmentos formados foram de 378pb, 274pb e 104pb. Nos indivíduos homozigotos selvagens, *ADH1C350* Ile/Ile, a enzima *SspI* reconheceu o sítio de restrição, gerando fragmentos de 274pb e 104pb e nos indivíduos homozigotos para a mutação, *ADH1C350* Val/Val, verificou-se

apenas a presença do fragmento de 378pb. Os indivíduos heterozigotos para a mutação, *ADH1C*350 Ile/Val, apresentaram os fragmentos de 378pb, 274pb e 104pb (Figura 5).

Figura 5: Identificação do polimorfismo do gene *ADH1C* Ile³⁵⁰Val após digestão com a enzima *SspI* e eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. As linhas 1, 4, 6, 7, e 8 representam indivíduos *ADH1C* Ile/Ile, selvagens para a mutação; linhas 2, 3, e 5 indivíduos heterozigotos para o alelo variante (*ADH1C* Ile/Val); linha 9 ao indivíduo homozigoto para a mutação, *ADH1C* Val/Val. Na identificação dos fragmentos gerados foi utilizado marcador de peso molecular (*ladder*) de 100pb

A genotipagem do polimorfismo do gene *CYP2E1* foi feita segundo protocolo proposto por ANWAR et al. (1996), com algumas modificações: os oligonucleotídeos utilizados foram, 5'-CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA-3' (*sense*) e 5'-TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG-3' (*antisense*). A amplificação foi feita com DNA genômico por 30 ciclos, sendo um minuto a 95°C para a denaturação, um minuto a 55°C para o anelamento e um minuto a 72°C para a extensão. O alelo variante do gene *CYP2E1* foi reconhecido após 12 horas, a 37°C, de digestão com 10 unidades da enzima *PstI* (*New England Biolabs*). Os fragmentos formados foram de 410pb, 290pb e 120pb. Nos indivíduos homozigotos selvagens, *CYP2E1* c1/c1, a enzima *PstI* não reconheceu o sítio de restrição, gerando fragmentos de 410pb, não foram encontrados indivíduos homozigotos para a mutação (*CYP2E1* c2/c2) que seriam identificados pela presença dos fragmentos de tamanho 290pb e 120pb. Os

indivíduos heterozigotos para a mutação, *CYP2E1* c1/c2, apresentaram fragmentos de 410pb, 290pb e 120pb (Figura 6).

Figura 6: Identificação do polimorfismo do gene *CYP2E1* após digestão com a enzima *PstI* e eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. As linhas 1, 2, 3, 5, 6, 7 e 8 representam indivíduos *CYP2E1* c1/c1, homozigotos selvagens; linha 4 indivíduos heterozigotos para a mutação *CYP2E1* c1/c2. Um ladder de 100bp foi utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos (LD)

3.3. Análise estatística

Para responder ao objetivo do estudo foram utilizadas tabelas cruzadas, entre os grupos estudados (casos e controles), as variáveis sócio-demográficas, de hábitos de vida e dos polimorfismos genéticos, calculando-se as frequências absolutas e relativas (Bussab e Morettin, 1987). Foram testadas as associações entre os grupos e as variáveis de interesse com uso de testes Qui-Quadrado (Teste Exato de Fisher ou Teste da Razão de Verossimilhanças, quando necessário - Agresti, 1990) e regressões logísticas univariadas tendo como medidas de associação o *odds ratio* (OR) e seu respectivo intervalo com 95% de confiança

(Neter, et. al., 1996). A idade foi descrita com uso de médias e desvios padrões e comparada entre os grupos com uso de teste t-Student (Bussab e Morettin, 1987).

Foram testadas as associações entre os grupos e os polimorfismos com uso de teste Qui-Quadrado (Teste Exato de Fisher ou Teste da Razão de Verossimilhanças, quando necessário - Agresti, 1990) estratificado por diversas categorias de consumo de álcool de acordo com a dose estimada de gramas de álcool por dia, sendo que o ponto de risco para o consumo de álcool foi identificado pela curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*).

As variáveis, que apresentaram níveis de significância no teste univariado com o grupo abaixo de 0,2 ($p < 0,02$), foram utilizadas para criação de um modelo de regressão logística múltipla para verificar quais delas que conjuntamente estavam associadas à doença, ou seja, verificar se os polimorfismos e o consumo de álcool estão associados à doença quando controladas as demais variáveis. Foi criado um modelo para os genes e um modelo para os haplótipos.

Os testes estatísticos foram realizados ao nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das populações estudadas

Os dados referentes à caracterização das populações estudadas encontram-se descritos na Tabela 4. Foram coletadas amostras de sangue periférico e realizadas entrevistas em 207 pacientes, sendo 23 indivíduos do sexo feminino (11,1%) e 184 do sexo masculino (88,9%), com idades que variaram de 24 a 81 anos (média = 54,3 $\pm$ 7,8 anos). Os pacientes foram na sua maioria (149) classificados como sendo da cor branca (72%), sendo o restante classificado como da cor mulata ou parda (38 - 18,4%) e negra (20 - 9,7% - Tabela 4).

O grupo controle foi composto por 244 pacientes do hospital, sendo 225 homens (92,2%) e 19 mulheres (7,8%), com idades que variaram de 20 a 82 anos (média = 53,6 $\pm$ 9,3 anos). Destes, 147 (59,8%) foram identificados como da cor branca, 68 (27,5%) como mulatos ou pardos, 29 indivíduos (11,9%) como negros, conforme apresentado na Tabela 4. As causas de hospitalização entre os controles foram agrupadas entre as grandes categorias diagnósticas (segundo a versão 10 da Classificação Internacional de Doenças - CID 10): doenças do sistema digestivo (44%) e doenças cardiovasculares (33%) representaram as causas mais comuns.

Os controles foram selecionados para pareamento com os casos, segundo sexo e idade ($\pm$ 5 anos), portanto não houve diferença estatística significativa em relação a essas variáveis quando comparados os grupos (Tabela 4). É interessante ressaltar que o número de indivíduos de cor de pele branca foi mais freqüente entre os pacientes com CCP (72%) quando comparado aos controles (59,8%). Em nossa amostra indivíduos classificados como mulatos ou pardos apresentaram risco menor

de CCP (OR= 0,56; 95% IC, 0,35- 0,88), embora a interpretação destes resultados deva ser avaliada com cautela (Tabela 4).

Entre os 207 pacientes com CCP em 92 deles (44%) o câncer foi diagnosticado na boca, seguido por 50 (24,2%) indivíduos com câncer de orofaringe, 48 (23,2%) com câncer de laringe e por fim 17 (8,2%) com câncer localizado no recesso piriforme.

4.2. Padrões de consumo de álcool e fumo

As informações quanto ao consumo de álcool e fumo, tanto no grupo de pacientes com CCP quanto nos controles, estão na Tabela 4. Verificamos que grande parte dos pacientes com câncer era fumante (79,7%), ou ex-fumante (16,9%), sendo que somente sete pacientes (3,4%) nunca haviam consumido tabaco. A amostra de não fumantes e ex-fumantes foi maior no grupo controle (23,4% - $X^2 = 31,53$; 1gl; $p < 0,0001$; 27% - $X^2 = 6,44$; 1gl; $p < 0,01$), enquanto o número de fumantes foi menor nos controles em comparação com os casos (49,6% - $X^2 = 39,43$; 1gl; $p < 0,0001$). A média maços/ano de cigarros consumido foi maior nos casos (35 maços/ano) do que nos controles (24 maços/ano), conforme apresentado na Tabela 4.

O consumo de tabaco aumentou de forma significativa o risco de CCP quando comparados os 165 pacientes fumantes e os 121 controles ($p < 0,001$) aumentando em mais de dez vezes o risco de câncer (OR= 11,1; 95% IC, 4,89- 25,19). É interessante ressaltar que esta diferença manteve-se significativa quando comparados os 35 pacientes que fumaram só no passado e os 66 controles

($p=0,001$) aumentando cerca de quatro vezes o risco de CCP (OR= 4,32; 95% IC, 1,78-10,47), conforme apresentado na Tabela 4.

Comparações semelhantes entre os grupos foram feitas em relação ao consumo de bebidas alcoólicas, conforme apresentado na Tabela 4. Quanto ao uso de álcool, verificou-se uma frequência maior de abstêmios entre os controles (22,5%) quando comparados com os pacientes com CCP (7,2% - $X^2 = 18,74$; 1gl; $p < 0,0001$). Foi relatado consumo atual de bebidas alcoólicas por 127 (61,4%) pacientes e 106 (43,4%) controles, diferença esta também estatisticamente significativa ($X^2 = 13,05$; 1gl; $p < 0,0003$). O consumo de bebidas alcoólicas no passado foi relatado por 65 (31,4%) pacientes e 83 (34%) controles. Verificou-se que em média os pacientes com CCP consumiram 157 g/L/dia quando comparados com os controles com 58 g/L/dia, conforme apresentado na Tabela 4.

A análise univariada para verificar a associação isolada do álcool no risco de CCP revelou diferença altamente significativa quando comparados os grupos de consumidores atuais, ex-consumidores, e os não consumidores (Tabela 4). Verificou-se que o risco de câncer foi praticamente quatro vezes maior nos alcoólicos quando comparados com os não alcoólicos (OR = 4,39; IC de 95%: 2,35-8,22). Também o consumo de álcool só no passado aumentou de forma significativa o risco de CCP (OR = 2,87; IC de 95%: 1,49-5,54), conforme descrito na Tabela 4.

Considerando-se que o álcool é consumido de forma socialmente aceita em diferentes países, inclusive no Brasil, seria interessante avaliar a partir de qual concentração haveria modificação no risco de CCP. Por meio de uma curva ROC foi possível estimar em 30,655 g/L/dia a quantidade de álcool que maximizou a sensibilidade ao câncer de cabeça e pescoço (Figura 7). A partir deste valor avaliamos o risco de CCP comparando os casos e controles que consumiram

quantidades superiores e inferiores a 30,655 g/L/dia de álcool (Tabela 5). Verificou-se que indivíduos que relataram consumir acima de 30,655 g/L/dia de álcool (72,5% dos pacientes com CCP e 35,2% dos controles) apresentavam risco aproximadamente cinco vezes maior de desenvolver CCP (OR= 4,83; 95% IC, 3,23-7,23) quando comparados com controles, conforme apresentado na Tabela 5. É interessante ressaltar que desta forma, o risco do consumo de álcool no CCP fica semelhante ao de ex-fumantes (OR= 4,32; 95% IC, 1,78-10,47), conforme apresentado na Tabela 4.

A associação entre álcool e fumo no CCP também foi observada na nossa amostra, conforme apresentado na Tabela 6. Verificamos que a associação entre o consumo de tabaco e álcool foi estatisticamente significativa pelo teste do Qui-Quadrado ($p < 0,001$), revelado em 39,5% dos indivíduos estudados, considerando-se em conjunto casos e controles (Tabela 6).

Na Tabela 7 controlamos o uso conjunto de tabaco e álcool separando os consumidores acima de 30,655 g/L/dia de álcool das demais categorias. Verificamos que 189 indivíduos (41,9% da nossa amostra) relataram fumar e consumir álcool acima de 30,655 g/L/dia e apenas 11 indivíduos (2,4%) relataram nunca fumar mas consumir álcool em concentrações superiores a 30,655 g/L/dia de álcool (Tabela 7). A associação desses dois hábitos manteve-se estatisticamente significativa ($p < 0,001$), conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 4. Descrição das variáveis sócio-demográficas e de hábitos segundo 207 pacientes com CCP e 244 controles, e a contribuição no risco da doença.

Variável	Grupos				OR	IC (95%)		P
	CCP N=207		Controles N=244			Inferior	Superior	
	N	%	N	%				
Sexo								
Masculino	184	88,9	225	92,2	1,00			
Feminino	23	11,1	19	7,8	1,48	0,78	2,80	0,228
Idade								
Média ± dp	54,3 ± 7,8		53,6 ± 9,3					
Cor da pele								
Branca	149	72,0	147	59,8	1,00			
Mulata ou parda	38	18,4	68	27,5	0,56	0,35	0,88	0,012
Negra	20	9,7	29	11,9	0,68	0,37	1,25	0,211
Tabaco								
Fuma	165	79,7	121	49,6	11,10	4,89	25,19	<0,001
Nunca fumou	7	3,4	57	23,4	1,00			
Só no passado	35	16,9	66	27,0	4,32	1,78	10,47	0,001
Maços/ano	35		24					
Álcool								
Bebe	127	61,4	106	43,4	4,39	2,35	8,22	<0,001
Nunca bebeu	15	7,2	55	22,5	1,00			
Bebeu no passado	65	31,4	83	34,0	2,87	1,49	5.54	0,002
Gramas/litros/dia	157		58					

Em negrito, valores de p estatisticamente significantes (<0.05) pelo teste de Fisher

Figura 7: Curva ROC para identificação do ponto de corte para consumo diário de álcool que maximizou o risco de CCP

Tabela 5. Avaliação do risco de CCP quando considerado em separado o consumo maior ou menor que 30,655 g/L/dia de álcool pelos pacientes com câncer controles.

Consumo de álcool (g/L/dia)	Grupo				Total		OR	IC (95%)		P
	CCP		Controle					Inferior	Superior	
	n	%	n	%	n	%				
<30,655	57	27,5	158	64,8	215	47,7	1,00			<0,001
≥30,655	150	72,5	86	35,2	236	52,3	4,83	3,23	7,23	
Total	207	100	244	100	451	100				

Em negrito, valores de p estatisticamente significantes (<0.05) pelo teste de Fisher

Tabela 6. Avaliação da associação entre o consumo de álcool e de tabaco considerando-se em conjunto os 207 pacientes com CCP e os 244 controles.

Tabaco	Álcool						Total	p	
	Consome		Nunca		Só no passado				
	n	%	n	%	n	%			
Fuma	179	39,5	24	5,3	84	18,5	287	63,4	<0,001
Nunca fumou	17	3,8	35	7,7	13	2,9	65	14,3	
Só no passado	37	8,2	12	2,6	52	11,5	101	22,3	
Total	233	51.4	71	15.7	149	32.9	453	100	

Em negrito, valores de p estatisticamente significantes (<0.05) pelo teste de Fisher

Tabela 7. Avaliação da associação entre o consumo maior ou menor que 30,655 g/L/dia de álcool e o hábito de fumar considerando-se em conjunto os 207 pacientes com CCP e os 244 controles.

Tabaco	Consumo de álcool (g/L/dia)				Total		P
	<30,655		≥30,655				
	n	%	N	%	N	%	
Fuma	97	21,5	189	41,9	286	63,4	<0,001
Nunca fumou	53	11,8	11	2,4	64	14,2	
Só no passado	65	14,4	36	8,0	101	22,4	
Total	215	47,7	236	52,3	451	100	

Em negrito, valores de p estatisticamente significantes (<0.05) pelo teste de Fisher

O consumo associado de álcool e de tabaco parece alterar também o risco de CCP conforme apresentado na Tabela 8. Na nossa amostra somente um dos pacientes com CCP relataram nunca haver fumado ou bebido em comparação com 33 (13,5%) dos controles (Tabela 8). Indivíduos que consomem álcool e fumam (54,1% dos casos e 27,5% dos controles) têm risco oito vezes maior de desenvolver câncer (OR= 7,8; 95% IC, 2,16- 28,15) conforme apresentado na Tabela 8. Por outro lado, indivíduos que nunca beberam, mas relataram fumar atualmente (4,3% dos

casos e 6,1% dos controles) ou no passado (2,4% dos casos e 2,9% dos controles) apresentaram risco 20 vezes maior de desenvolver a doença (OR= 19,8; 95% IC, 2,30-170,70 para os fumantes e OR= 23,57; 95% IC, 2,37- 234,34 para ex-fumantes), conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Associação entre o hábito de fumar e de consumir bebidas alcoólicas relatado pelos 207 pacientes e com CCP e 244 controles e o risco de câncer de cabeça e pescoço.

Álcool	Tabaco	Grupo				OR	IC (95%)		P
		CCP		Controle			Inferior	Superior	
		N	%	n	%				
Ingere	Nunca fumou	3	1,4	14	5,7	1,00			
	Fuma	112	54,1	67	27,5	7,80	2,16	28,15	0,002
	Só no passado	12	5,8	25	10,2	2,24	0,54	9,31	0,267
Nunca bebeu	Nunca fumou	1	0,5	33	13,5	1,00			
	Fuma	9	4,3	15	6,1	19,80	2,30	170,70	0,007
	Só no passado	5	2,4	7	2,9	23,57	2,37	234,34	0,007
Só no passado	Nunca fumou	3	1,4	10	4,1	1,00			
	Fuma	44	21,3	39	16,0	3,76	0,96	14,66	0,056
	Só no passado	18	8,7	34	13,9	1,76	0,43	7,24	0,430
Total		207	100	244	100				

Em negrito, valores de p estatisticamente significantes (<0.05) pelo teste de Fisher

4.3. Análise dos polimorfismos genéticos

A pesquisa de polimorfismos dos genes *ADH1B Arg⁴⁸His*, *ADH1B Arg³⁷⁰Cys*, *ADH1C Ile³⁵⁰Val* e *CYP2E1* foi possível nos 207 pacientes com CCP e nos 244 controles. A Tabela 9 apresenta a distribuição das freqüências genotípicas observadas para cada um destes grupos.

Alguns polimorfismos foram encontrados em baixa freqüência somente em alguns grupos analisados como é o caso dos genótipos *ADH1B48 His/His* e *ADH1B370 Cys/Cys* que estiveram ausentes nos pacientes com CCP (Tabela 9). O

genótipo homozigoto para o polimorfismo *CYP2E1* não foi detectado na amostra estudada (Tabela 9).

A análise estatística revelou diferença significativa quando comparadas as frequências do genótipo *ADH1B48 Arg/His*, presente em 11,9% dos controles e 5,8% dos pacientes com CCP, sugerindo ser este um marcador de proteção no risco de CCP (OR = 0,45; 95% IC, 0,22- 0,91) mesmo quando considerado em conjunto indivíduos homozigotos ou heterozigotos para a mutação (OR = 0,42; 95% IC, 0,21- 0,85), conforme apresentado na Tabela 9.

O equilíbrio de Hardy Weimberg foi calculado para todos os alelos e genótipos no grupo controle e no grupo de casos separadamente, com intuito de avaliarmos se as frequências alélicas não estavam fora do esperado em uma população em panmixia (Hardy, 1908). Em ambas as amostras as frequências alélicas e a distribuição genotípica de todos os polimorfismos estudados, com exceção dos controles do *CYP2E1*, estavam em equilíbrio, como mostrado nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 9. Distribuição da frequência (%) de polimorfismos nos genes de metabolização do álcool *ADH1B Arg⁴⁸His*, *ADH1B Arg³⁷⁰Cys*, *ADH1C Ile³⁵⁰Val* e *CYP2E1* nos pacientes portadores de CCP e nos controles.

Variável	Grupo				OR	IC (95%)		P
	CCP		Controle			Inferior	Superior	
	N	%	n	%				
ADH1B Arg⁴⁸His								
Arg/Arg	195	94,2	213	87,3	1,00			
Arg/His	12	5,8	29	11,9	0,45	0,22	0,91	0,026
His/His	0	0,0	2	0,8	#			
Arg/His + His/His	12	5,8	31	12,7	0,42	0,21	0,85	0,015
ADH1B Arg³⁷⁰Cys								
Arg/Arg	197	95,2	225	92,2	1,00			
Arg/Cys	10	4,8	17	7,0	0,67	0,30	1,50	0,332
Cys/Cys	0	0,0	2	0,8	#			
Arg/Cys + Cys/Cys	10	4,8	19	7,8	0,60	0,27	1,32	0,206
CYP2E1								
Gly/Gly	188	90,8	227	93,0	1,00			
Gly/Ser	19	9,2	15	6,1	1,53	0,76	3,09	0,237
Ser/Ser	0	0,0	2	0,8	#			
Gly/Ser + Ser/Ser	19	9,2	17	7,0	1,35	0,68	2,67	0,389
ADH1C Ile³⁵⁰Val								
Ilê/Ile	99	47,8	136	55,7	1,00			
Ilê/Val	89	43,0	91	37,3	1,34	0,91	1,99	0,138
Val/Val	19	9,2	17	7,0	1,54	0,76	3,10	0,232
Ilê/Val + Val/Val	108	52,2	108	44,3	1,37	0,95	1,99	0,094
Total	207	100	244	100				

Não foi possível a análise estatística

Em negrito, valores de p estatisticamente significantes (<0.05) pelo teste de Fisher

Tabela 10. Frequências alélicas e distribuição genotípica de *ADH1B Arg⁴⁸His*, *ADH1B Arg³⁷⁰Cys*, *ADH1C Ile³⁵⁰Val* e *CYP2E1* no grupo controle.

Genótipo	Frequências Genotípicas		χ^2	P	Alelo	Frequências Alélicas	
	Observado	Esperado				Observado	Frequência
<i>ADH1B</i> Arg⁴⁸His							
Arg/Arg	213	212,12	0,14	>0,05	Arg	227,05	0,97
Arg/His	29	30,77			His	160,5	0,03
His/His	2	1,12					
<i>ADH1B</i> Arg³⁷⁰Cys							
Arg/Arg	225	223,45	5,83	>0,05	Arg	233,5	0,96
Arg/Cys	17	20,10			Cys	10,50	0,04
Cys/Cys	2	0,45					
<i>CYP2E1</i>							
Gly/Gly	227	225,37	7,77*	>0,05	Gly	234,45	0,96
Gly/Ser	15	18,26			Ser	9,50	0,04
Ser/Ser	2	0,37					
<i>ADH1C</i> Ile³⁵⁰Val							
Ile/Ile	136	135,01	0,11	>0,05	Ile	181,5	0,74
Ile/Val	91	92,98			Val	62,5	0,26
Val/Val	17	16,01					

2 graus de liberdade

*valor superior ao p 5%= 5,991

Tabela 11. Frequências alélicas e distribuição genotípica de *ADH1B Arg⁴⁸His*, *ADH1B Arg³⁷⁰Cys*, *ADH1C Ile³⁵⁰Val* e *CYP2E1* no grupo de pacientes com CCP.

Genótipo	Frequências Genotípicas		χ^2	p	Alelo	Frequências Alélicas	
	Observado	Esperado				Observado	Frequência
ADH1B Arg⁴⁸His							
Arg/Arg	195	195,17	0,18	>0,05	Arg	201	0,97
Arg/His	12	11,65			His	6	0,03
His/His	0	0,17					
ADH1B Arg³⁷⁰Cys							
Arg/Arg	197	197,12	0,13	>0,05	Arg	202	0,98
Arg/Cys	10	9,76			Cys	5	0,02
Cys/Cys	0	0,12					
CYP2E1							
Gly/Gly	188	188,44	0,48	>0,05	Gly	197,50	0,95
Gly/Ser	19	18,13			Ser	9,50	0,05
Ser/Ser	0	0,44					
ADH1C Ile³⁵⁰Val							
Ile/Ile	99	99,48	0,02	>0,05	Ile	143,50	0,69
Ile/Val	89	88,04			Val	63,50	0,31
Val/Val	19	19,48					

2 graus de liberdade

Em decorrência da proximidade dos genes ADH na molécula de DNA os mesmos são avaliados também quanto às suas frequências haplotípicas. Na presente investigação a distribuição da frequência dos haplótipos *ADH1B*1*, *ADH1B*2*, *ADH1B*3*, e da associação dos mesmos com *ADH1C*1* e *ADH1C*2*, nos 244 controles e 207 pacientes com CCP encontra-se descrita na Tabela 12.

O haplótipo *ADH1B*2* foi mais freqüente nos controles (12,7%) do que nos pacientes com CCP (5,8%) sugerindo ser o mesmo um fator de proteção no risco de CCP (OR = 0,41; 95% IC, 0,20 - 0,82), conforme apresentado na Tabela 12. Resultados semelhantes foram observados na associação entre os haplótipos *ADH1B*2* e *ADH1C*1* que também foram mais freqüentes nos controles (8,2%) do que nos pacientes com câncer (3,4%), sugerindo que indivíduos com estes haplotipos tem menor risco de desenvolver CCP (OR = 0,32; 95% IC, 0,13-0,79), conforme apresentado na Tabela 12.

Tabela 12. Distribuição da freqüência (%) dos haplótipos *ADH1B*1*, *ADH1B*2* e *ADH1B*3* e da combinação dos mesmos nos pacientes portadores de CCP e nos controles.

Variável	Grupo				OR	IC (95%)		P
	CCP		Controle			Inferior	Superior	
	n	%	n	%				
Haplótipos								
ADH1B*1	185	89,4	195	79,9	1,00			
ADH1B*2	12	5,8	31	12,7	0,41	0,20	0,82	0,012
ADH1B*3	10	4,8	18	7,4	0,59	0,26	1,30	0,189
Haplótipos combinados								
ADH1B*1/ADH1C*2	98	47,3	89	36,5	1,00			
ADH1B*2/ADH1C*1	7	3,4	20	8,2	0,32	0,13	0,79	0,013
Outras combinações	102	49,3	135	55,3	0,69	0,47	1,01	0,055
Total	207	100	244	100				

Em negrito, valores de p estatisticamente significantes (<0.05) pelo teste de Fisher

Na avaliação conjunta dos fatores de risco ambientais e genéticos, por meio de análise de regressão logística múltipla, a contribuição de cada um destes fatores no risco de CCP foi considerada. Entraram no modelo de regressão somente as variáveis que apresentaram probabilidade menor que 0,02 ($p < 0,02$) no teste univariado. O modelo foi ajustado, por idade e sexo, e o álcool e o tabaco foram considerados variáveis de hábito.

A Tabela 13 apresenta o resultado da análise de regressão múltipla que considerou em seu modelo as variáveis como a idade, cor de pele, consumo de tabaco e consumo de álcool maior ou menor que 30,655 g/L/dia, associado com o polimorfismo *ADH1B* Arg⁴⁸His em homozigose ou heterozigose (Tabela 13).

A análise de regressão múltipla escalonada confirmou as associações anteriormente mencionadas como o uso de tabaco (OR= 8,31; 95% IC, 3,49- 19,75) mesmo para ex-fumantes (OR= 3,82; 95% IC, 1,52-9,61) no risco de CCP, conforme apresentado na Tabela 13. Confirmamos novamente a diferença observada entre a cor de pele predominante nos pacientes com CCP e nos controles, aparentemente conferindo um risco maior de câncer para os pacientes com cor de pele branca, na amostra estudada (OR= 2,22; 95% IC, 1,32-3,74), dado este também apresentado na Tabela 13.

Quanto à associação entre o consumo de álcool e os polimorfismos estudados verificamos que os indivíduos com a variante alélica para o genótipo *ADH1B* Arg⁴⁸His, em homozigose ou heterozigose apresentam riscos diferentes dependendo da quantidade diária de álcool que é ingerida. Nesse caso, a presença da variante alélica *ADH1B* Arg⁴⁸His se mantém como um fator de proteção somente para os indivíduos que consomem menos que 30,655g/L/dia de álcool (OR= 0,12; 95% IC, 0,03-0,52), conforme apresentado na Tabela 13.

Por outro lado, o consumo diário de doses acima de 30,655 gramas de álcool aumentou mais de três vezes o risco de desenvolver CCP, independente da presença da variante alélica do *ADH1B* Arg⁴⁸His, mesmo para homozigotos selvagens (OR= 3,01; 95% IC, 1,90-4,78) ou quando da associação de heterozigotos e homozigotos para a mesma mutação (OR= 4,42; 95% IC, 1,21-16,11), dado este também apresentado na Tabela 13.

Tabela 13. Avaliação da contribuição gene- ambiente por meio de análise de regressão logística múltipla, incluindo no modelo variáveis com $p < 0,02$, como idade, uso de tabaco, cor de pele e consumo de álcool maior ou menor que 30,655 g/L/dia e o polimorfismo genético em *ADH1B* Arg⁴⁸His.

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Idade	1,02	1,00	1,04	0,106
Tabaco				
Nunca fumou	1,00			
Fuma	8,31	3,49	19,75	<0,001
Fumou no passado	3,82	1,52	9,61	0,004
Cor de pele				
Mulato	1,00			
Branco	2,22	1,32	3,74	0,003
Negro	1,14	0,53	2,44	0,736
Consumo de álcool/Genótipo				
< 30,655 / <i>ADH1B</i> Arg ⁴⁸ Arg	1,00			
≥ 30,655 / <i>ADH1B</i> Arg ⁴⁸ Arg	3,01	1,90	4,78	<0,001
< 30,655 / <i>ADH1B</i> Arg ⁴⁸ His ou <i>ADH1B</i> His ⁴⁸ His	0,12	0,03	0,52	0,005
≥ 30,655 / <i>ADH1B</i> Arg ⁴⁸ His ou <i>ADH1B</i> His ⁴⁸ His	4,42	1,21	16,11	0,024

Em negrito, valores de p estatisticamente significantes (<0.05) pelo teste de Fisher

5. DISCUSSÃO

Na presente avaliação foram estudados 207 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, comparados com um grupo controle, de base hospitalar, composto por 244 pacientes de diferentes clínicas do mesmo hospital, quanto à presença dos polimorfismos nos genes de metabolização de álcool como *ADH1B Arg⁴⁸His*, *ADH1B Arg³⁷⁰Cys*, *ADH1C Ile³⁵⁰Val* e *CYP2E1*. As frequências genotípicas observadas foram comparadas entre os grupos para avaliar o risco de câncer de cabeça e pescoço, levando-se em consideração também alguns fatores individuais como o hábito de fumar e o consumo de bebidas alcoólicas.

Os resultados desta investigação indicaram que o genótipo *ADH1B Arg⁴⁸His* (Arg/His ou His/His), foi mais freqüente entre os controles do que entre os pacientes com câncer de cabeça e pescoço, sugerindo uma maior proteção para a doença. Resultados similares foram observados para o haplótipo *ADH1B*2* o qual se caracteriza também pela presença do alelo mutante na posição 48. Esse fator protetor do genótipo *ADH1B Arg⁴⁸His* (Arg/His ou His/His) parece estar associado ao consumo de doses diárias de álcool inferiores a 30,655g/L/dia.

5.1. Genes de metabolização do álcool e dependência

Os genes de metabolização do álcool são os principais fatores associados com o risco de dependência ao álcool. Artigos de revisão parecem ser unânimes em mostrar o menor risco de dependência em portadores de polimorfismos nos genes *ADH1B*, *ADH1C* e *ALDH2* (MAYFILED, 2008; PENG, 2009). A reação individual ao acúmulo de acetaldeído, decorrente da velocidade de metabolização do álcool

ingerido (*ADH1B*, *ADH1C*) ou de excreção do acetaldeído (*ALDH2*) parece influir de forma significativa no menor risco de dependência alcoólica (TOLSTRUP et al, 2007). Essa correlação foi observada principalmente em Asiáticos (PENG, 2009).

O alelo mutado do gene *ADH1B* Arg⁴⁸His é mais freqüente em Asiáticos (60-80%) quando comparados com Caucásios (de 0 a 10%) e negros Africanos, cuja freqüência do genótipo mutado não ultrapassa 15% da população (GOEDDE et al, 1992; DRUESNE-PECOLLO, 2009). De acordo com LI e colaboradores (2008), o alelo mutado do gene *ADH1B* Arg⁴⁸His é presente em mais de 80% da população da Ásia Oriental. Assim, a população de risco para o alcoolismo ou consumo pesado de álcool, associado ao genótipo selvagem do *ADH1B* Arg⁴⁸His, é de nove a 24% em orientais em comparação a população branca (62 e 67%) (TOLSTRUP et al, 2007).

Na presente investigação 5,8% dos casos contra 12,7% dos controles tinham pelo menos um alelo mutado para *ADH1B* Arg⁴⁸His (apenas dois controles (0,8%) possuíam essa mutação em homozigose). As freqüências genotípicas observadas no presente estudo estão de acordo com as relatadas em outras populações Latinas ou Européias (HASHIBE et al, 2008).

Os genes *ADH1B* Arg³⁷⁰Cys e *ADH1C* Ile³⁵⁰Val são estudados em associação ao *ADH1B* Arg⁴⁸His. O polimorfismo do gene *ADH1B* Arg³⁷⁰Cys é muito raro na população e o *ADH1C* Ile³⁵⁰Val tem uma distribuição mais homogênea. Ambos os genes podem ser herdados na forma de haplótipos que incluem o *ADH1B* Arg⁴⁸His ou com a outra forma polimórfica do *ADH1C* Arg²⁷²Gln, a qual não foi estudada na presente investigação (EDENBERG, 2007).

A relação do gene *ADH1C* Ile³⁵⁰Val com o desenvolvimento da dependência ao álcool é estudada na literatura, porém os dados são controversos. Alguns estudos relacionam o alelo de metabolização lenta do álcool (alelo mutado) com a

dependência e outros não identificam essa associação (HOMANN et al, 2006; MAYFIELD, 2008; MACGREGOR et al, 2009; DRUESNE-PECOLLO, 2009).

Em alguns trabalhos os autores avaliaram a associação entre a variante *ADH1C* Ile³⁵⁰Val de metabolização lenta do álcool com o alelo selvagem do *ADH1B* Arg⁴⁸His, também de metabolização lenta. Nesses casos foi verificada associação dos genótipos com a dependência ao álcool, indicando que o *ADH1C* Ile³⁵⁰Val sozinho não modifica de forma significativa o risco à dependência mas, a sua forma variante, associada com polimorfismos em outros genes de metabolização do álcool pode ser um agravante (MACGREGOR et al, 2009).

A frequência dos alelos do gene *ADH1C* Ile³⁵⁰Val na população é diferente dos outros *ADH*'s. Nos caucasianos encontramos de 45 a 70% da população com genótipo heterozigoto e de 75 a 90% da população Africana e 85 a 100% dos Asiáticos com genótipo selvagem, indicando que o alelo selvagem do gene *ADH1C* Ile³⁵⁰Val pode ser mais um fator que influencia na reação de *flushing* dos Asiáticos. (DRUESNE-PECOLLO et al, 2009).

O gene *ALDH2* produz uma enzima que metaboliza o AA em acetato, e o alelo mutado deste gene produz uma enzima não funcional que gera o acúmulo de AA, levando a reações clínicas desagradáveis como calor, vermelhidão da face e taquicardia, entre outras (YOKOYAMA e OMORI, 2003). Aparentemente, a associação entre as manifestações clínicas e o alelo mutado do *ALDH2* interferem no risco destes indivíduos virem a ser dependentes do álcool (KUO et al, 2008). A frequência do alelo *ALDH2* mutado na população caucasiana é muito baixa (não excede 5%) mas, o mesmo ocorre em altas taxas na população Asiática (maior que 40%) conforme relatado na literatura (DRUESNE-PECOLLO et al, 2009). Assim sendo, a proteção ou predisposição à dependência do álcool parecem ser em parte

decorrentes de polimorfismos nos genes de metabolização do álcool e do acetaldeído (DRUESNE-PECOLLO et al, 2009). Pesquisas nesse sentido vêm sendo desenvolvidas pelo nosso grupo incluindo o estudo de diferentes polimorfismos em genes de metabolização do álcool em diferentes grupos de consumidores crônicos de bebidas alcoólicas, ou seja, dependentes, com ou sem câncer.

A dependência do álcool também parece estar relacionada com a presença de haplótipos que resultam em baixa metabolização do álcool, como *ADH1B*1* e *ADH1C*2* (HASHIBE et al, 2006; DRUESNE-PECOLLO et al, 2009). Indivíduos homozigotos para os haplótipos *ADH1B*2* e *ADH1C*1* tem uma capacidade de oxidar o álcool cerca de oito vezes maior quando comparados com indivíduos portadores dos haplótipos referência, *ADH1B*1* e *ADH1C*1* (EDENBERG, 2007).

Aparentemente, a frequência do haplótipo *ADH1B*2* em nossa população foi investigada por um único grupo (SANTOS et al., 1997) que avaliou 44 indivíduos sendo 22 Caucasoídes, 4 Negros, 9 Mulatos e 9 descendentes de Japoneses. Os autores verificaram que o haplótipo *ADH1B*2* estava presente em 20,5% da população estudada, incluindo os descendentes japoneses (SANTOS et al., 1997). Essa frequência foi maior do que a observada em nosso grupo controle (12,7%), embora essa comparação seja prejudicada pelo reduzido número de indivíduos estudados. Os autores verificaram também a ocorrência de *flushing* nesses indivíduos que estava associada com os genótipos selvagens para *ALDH2* e para o haplótipo *ADH1B*1* (SANTOS et al., 1997). Entre os descendentes de Japoneses, 30% deles relataram ter *flushing* sendo todos heterozigotos para a mutação no gene *ALDH2* (SANTOS et al., 1997).

5.2. Genes de metabolização do álcool e câncer de cabeça e pescoço

Os biomarcadores moleculares utilizados em estudos epidemiológicos que avaliam os fatores de risco associados ao câncer incluem biomarcadores de exposição (formação de adutos de DNA), biomarcadores de efeito (danos no DNA) e biomarcadores de suscetibilidade, representados pelos polimorfismos em genes de metabolização de drogas, inclusive álcool (GATTÁS et al., 2006; ANANTHARAMAN et al, 2007).

Os mecanismos pelos quais o consumo de álcool aumenta o risco de câncer de cabeça e pescoço ainda não foram totalmente identificados, embora essa associação tenha sido observada em estudos epidemiológicos (DRUESNE-PECOLLO et al, 2009).

Polimorfismos em genes de metabolização do álcool são fortes candidatos uma vez que atuam diretamente na via de degradação do álcool e levam ao acúmulo de acetaldeído, substância considerada mutagênica e carcinogênica em diferentes sistemas biológicos, inclusive no homem (YOKOYAMA e OMORI, 2003).

Na presente investigação a presença do polimorfismo *ADH1B* Arg⁴⁸His (Arg/His ou His/His) foi mais freqüente entre os controles do que entre os pacientes com câncer de cabeça e pescoço, sugerindo uma maior proteção para a doença.

A associação da variante alélica do gene *ADH1B* Arg⁴⁸His, que produz a enzima de rápida metabolização do álcool, com o desenvolvimento do CCP tem sido relatada em outros estudos multicêntricos de caso-controle (HASHIBE et al., 2006; HASHIBE et al, 2008; DRUESNE-PECOLLO, 2009). Hashibe e colaboradores (2006, 2007a, 2008), avaliaram mais de 3.000 pacientes com câncer de cabeça e pescoço e controles principalmente da Europa e também da América Latina, inclusive Brasil. Os

autores verificaram decréscimo de 30% - 50% no risco de câncer de laringe, cavidade oral, faringe e esôfago, associado à variante alélica do gene *ADH1B* Arg⁴⁸His. Os resultados foram semelhantes aos observados na presente investigação embora a estimativa do risco para diferentes sítios do tumor não tenha sido investigada.

Assim como a variante alélica do gene *ADH1B* Arg⁴⁸His foi mais freqüente entre os controles (12,7%) em relação aos casos (5,8%), a variante alélica do gene *ADH1B* Arg³⁷⁰Cys também foi mais freqüente nos controles (7,8%) do que nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (4,8%), embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa (OR= 0,60; 95%IC= 0,27- 1,32). Resultados semelhantes em relação à presença da mutação *ADH1B* Arg³⁷⁰Cys ou do haplótipo *ADH1B**3 em pacientes com câncer de cabeça e pescoço também foram observados em outras populações (HASHIBE, 2006). É importante salientar que a freqüência do haplótipo *ADH1B**3 é maior na população Afro-Americana (cerca de 25%) porém não é sabido o quanto esse polimorfismo é freqüente na nossa população (EDENBERG, 2007; CRABB et al, 2004; BRENNAN et al, 2004).

Diferente dos genes *ADH* e *ALDH* a ação do *CYP2E1* também está associada à conversão de outros xenobióticos, incluindo procarcinógenos como nitrosaminas, aflatoxinas e vinilclorados, em seus últimos carcinógenos, provavelmente modificando o risco de câncer (PÖSCHL e SEITZ, 2004).

O polimorfismo do gene *CYP2E1* *Pst*I é raro em nossa população (GATTÁS et al., 2006) e na presente investigação não mostrou estar associado com o risco de câncer nos pacientes estudados. Estudos prévios, com um número reduzido de pacientes, haviam identificado freqüência maior do alelo *CYP2E1* mutado no grupo com câncer de cavidade oral e faringe quando comparados com controles sem

câncer (GATTÁS et al, 2006; BOUCHARDY et al, 2000). Outros estudos de caso-controle não descreveram a mesma associação (HO et al, 2007; LI et al, 2005; LIU et al, 2001; GONZALES et al, 1998).

Os estudos colaborativos em populações europeias parecem não evidenciar a contribuição de polimorfismos no *ADH1C* Ile³⁵⁰Val no câncer do trato aerodigestivo (BRENNAN et al, 2004, HASHIBE et al, 2006 e 2008). Na presente investigação o polimorfismo no *ADH1C* Ile³⁵⁰Val, associado com a metabolização mais lenta do álcool, em homozigose ou heterozigose, foi mais freqüente nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (52,2%) do que nos controles (44,3%), embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa (OR= 1,37; 95%IC= 0,95-1,99). Esses dados poderiam indicar uma tendência para risco de CCP associado ao metabolismo mais lento do álcool, raciocínio pouco considerado pelos autores (HASHIBE et al, 2006).

Os resultados aqui descritos anteriormente mostraram que há uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando a freqüência dos haplótipos de metabolização rápida, *ADH1B*2* e *ADH1C*1*, foram consideradas em conjunto (p= 0,013) conferindo proteção ao CCP.

A associação entre polimorfismos nos genes de metabolização do álcool e câncer de cabeça e pescoço pode ser considerada em paralelo com o risco de dependência do álcool. Indivíduos que acumulam mais AA, decorrente da rápida metabolização do álcool, teriam menor risco de dependência e conseqüentemente menor risco de CCP. De fato, o acúmulo de acetaldeído ao gerar uma certa aversão a bebida contribui também para o menor risco de câncer.(YOKOYAMA, 2006; PENG, 2009).Paralelamente, indivíduos que se tornam dependentes do álcool, ingerindo cronicamente grandes quantidades de bebidas alcoólicas, independente da presença

ou não do polimorfismo genético, aumentaram o risco de CCP, sendo esse risco ainda maior em decorrência do maior acúmulo de acetaldeído (PÖSCHL e SEITZ, 2004).

Por outro lado, é interessante ressaltar que a presença do haplótipo referência *ADH1B*1* tem sido associada com risco aumentado do câncer de esôfago em populações asiáticas (GUO et al 2008; YOKOAMA, 2002; HORI et al, 1997). Os orientais devem ser considerados de forma particular uma vez que a frequência de diferentes polimorfismos dos genes de metabolização do álcool é maior nestas populações. A alta frequência do polimorfismo *ALDH2*2* em orientais pode também contribuir na maior incidência de câncer observada (YOKOYAMA e OMORI, 2009).

O AA interfere na síntese do DNA e no seu reparo em diferentes locais, causando pontos de mutação nos linfócitos humanos, induz a troca entre cromátides irmãs e entre cromossomos causando aberrações também em linfócitos humanos (SEITZ e MEIER, 2007).

O sinergismo entre o consumo de tabaco e álcool no risco do CCP tem sido relatado em alguns estudos, a interação entre os dois fatores aumenta o risco do desenvolvimento da doença (PÖSCHL e SEITZ, 2004, HASHIBE et al, 2007b; HASHIBE et al, 2007c). Na presente investigação observamos que os indivíduos que consumiam grandes quantidades de álcool eram, na maioria, indivíduos que também possuíam o hábito de fumar (189- 41,9%- dos pacientes com CPP e controles entre os 236 que possuíam hábito de alto consumo de álcool); também podemos observar estes hábitos em conjunto quando 39,5% (179), do total de indivíduos analisados, fumam e bebem contra 3,8% (17) que nunca fumaram, mas bebem ou 5,3% (24) que fumam, mas nunca beberam, sendo estatisticamente significativa a associação entre os dois hábitos ($p < 0,001$).

O consumo de tabaco e álcool foi relatado por 54,1% dos pacientes com CCP e 27,5% dos controles, estes hábitos associados sendo mais freqüentes nos casos de CCP do que nos controles geram um risco maior, de quase oito vezes, no desenvolvimento do câncer ($OR= 7,80$; $95\%IC= 2,16- 28,15$).

Existe um único trabalho onde foi avaliado o risco de CCP em pessoas que bebem, mas nunca fumaram e fumantes que nunca beberam; este tipo de estudo é raro, pois a associação dos dois hábitos é muito forte. O hábito de fumar foi associado com um aumento no risco do CPP, e existiu uma relação na freqüência, duração e quantidade de cigarros consumidos, o risco quando comparados fumantes com aqueles que nunca fumaram foi de $OR= 2,13$, 95%. O hábito de ingestão de bebidas alcoólicas também promoveu um aumento no risco de CCP, porém só quando consumido mais de três doses por dia, quando comparados aqueles que nunca beberam com os que bebem mais de três doses por dia o risco foi de $OR= 2,04$, 95% (HASHIBE et al, 2007d).

Na presente investigação isolando o tabaco como uma variável de hábito, temos um acréscimo no risco para o CCP de 8,31 vezes quando comparados aos controles. Analisando apenas o álcool como uma variável de consumo, também percebemos uma grande diferença no consumo entre casos e controles, sendo a quantidade de álcool ingerida pelos pacientes com CCP mais alta em relação aos controles.

Para determinar a quantidade de álcool que ingerida por dia tornaria o consumo um risco para o desenvolvimento do CPP, foi calculada a curva de ROC com os valores de álcool consumido entre os pacientes, chegando assim ao valor de 30, 655 g/L/dia. Foi encontrado mais pacientes com CPP (72,5%) do que controles (35,2%) que consumiam acima desse valor, determinando um aumento de mais de quatro

vezes o risco do desenvolvimento de CPP, resultados estes concordantes com outros pesquisadores (GEISLER e OLSHAN, 2001; ZAVRAS et al., 2002).

Em uma revisão da literatura, foi observado que em diversos estudos de caso-controle, o consumo de 50 g de álcool por dia aumenta de duas a três vezes o risco de desenvolvimento de CCP (SEITZ e STICKEL 2007), em um estudo Francês, o consumo de 80 g de álcool por dia aumenta o risco de desenvolvimento de câncer de esôfago e quando associado ao hábito de fumar o risco aumenta para 44 vezes (TUYNS, 1978)

A contribuição dos genes de metabolização do álcool para o risco ou proteção de desenvolvimento de CCP, parece estar associada à quantidade de álcool ingerida diariamente. A presença da variante polimórfica do gene *ADH1B* Arg⁴⁸His nos indivíduos que consomem menos de 30,655g/L/dia pode ser protetora contra o desenvolvimento da doença (OR=0,12; 95% IC, 0,03-0,52), porém independente do polimorfismo deste gene, o consumo de mais de 30,655g/L/dia de álcool aumenta por volta de quatro vezes o risco de desenvolvimento de CCP.

A eliminação dos compostos do tabaco do nosso organismo é catalizada por enzimas do fígado e de outros tecidos. Diferentes enzimas atuam modificando as ações tóxicas e potencialmente carcinogênicas de xenobióticos. A maior parte dos xenobióticos é primeiramente convertida em metabólitos eletrofílicos, altamente reativos com a molécula de DNA, por meio das enzimas da fase I, principalmente enzimas da superfamília do citocromo P450 (CYPs). Na sequência, as reações de conjugação da fase II transformam os substratos gerados em metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção por meio das enzimas da família das glutatona S-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs). Polimorfismos em enzimas das fases I e II podem alterar a dinâmica de

metabolização e excreção de carcinógenos aumentando as chances de formação de adutos de DNA, RNA ou proteínas que podem gerar mutações que se não forem corretamente reparadas podem aumentar o risco de câncer (ROSSIT e CONFORTI-FROES, 2000). A análise de 92 pacientes com câncer da cavidade oral mostrou que a deleção de *GSTM1* está associada com risco maior de câncer (OR = 2,15; 95% IC, 1,28-3,60) (CURIONI, 2008).

É difícil estabelecer precisamente uma relação direta causa-efeito quando consideradas ambas as exposições, ou seja, álcool e fumo. Em relação ao fumo parece haver diferença na composição do tabaco consumido que pode modificar o risco de CCP em indivíduos que nunca beberam (HASHIBE et al., 2007a). Esses dados parecem indicar que cigarros de diferentes países e regiões podem, de acordo com as concentrações dos diferentes carcinógenos do tabaco, bem como com os padrões de uso, modificar o risco para a doença. A mesma situação pode ocorrer com as bebidas alcoólicas. Não só o teor do álcool varia entre as bebidas como também a inclusão de conservantes e derivados impuros da destilação. Principalmente bebidas artesanais como a cachaça podem resultar em produtos com alto teor de álcool e impurezas e, portanto mais nocivos ao organismo (LACHENMEIER, 2009).

Outra possível explicação para os diferentes efeitos do fumo e do álcool dizem respeito às questões sociais que determinam práticas distintas tanto na aceitação quanto na maneira de consumir tais substâncias, num mesmo país ou na comparação de diferentes países.

O câncer de cabeça e pescoço ainda é uma grave doença em todo o mundo e, especialmente, em países menos desenvolvidos. Além da gravidade da doença, associada ao tipo de tratamento disponível (mutilante na maior parte dos casos) e

alta taxa de recorrência, a doença é quase sempre diagnosticada tardiamente. Falta de informação da população, condições sociais menos favorecidas, bem como a associação da doença com hábitos tão disseminados e socialmente aceitos como o fumo e o álcool, parecem ser os principais fatores que dificultam o melhor controle da doença. Por esta razão, fatores geneticamente herdados, que podem modificar o risco de câncer de cabeça e pescoço devem ser investigados por um maior número de pesquisadores em diferentes populações em todo mundo. A prevenção do câncer de cabeça e pescoço, que poderia ser aparentemente mais fácil do que tem se mostrado, provavelmente agregará em um futuro próximo, a informação gerada na análise de polimorfismos em genes de metabolização do álcool e do tabaco na predisposição a doença. O conhecimento da distribuição destes polimorfismos genéticos em nossa população poderá resultar em diferentes formas de prevenção às populações futuras.

6. CONCLUSÕES

- O consumo de álcool aumentou 4,39 vezes o risco de câncer de cabeça e pescoço.
- O uso de tabaco aumentou 11,10 vezes o risco de câncer de cabeça e pescoço.
- Somente o genótipo variante *ADH1B* Arg⁴⁸His, na sua forma heterozigota (Arg/His) ou homozigota (His/His) parece conferir proteção ao risco de câncer de cabeça e pescoço;
- A proteção do alelo variante *ADH1B* Arg⁴⁸His parece estar associada com a quantidade de álcool consumida diariamente, ou seja, inferior a 30g/L/dia.
- O consumo de bebidas alcoólicas acima de 30g/L/dia aumenta mais de quatro vezes o risco para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço, independente do polimorfismo genético *ADH1B* Arg⁴⁸His, *ADH1B* Arg³⁷⁰Cys, *ADH1C* Ile³⁵⁰Val e *CYP2E1*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal DP. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. *Pathologie- Biologie*, 2001, 49: 703-9.
- Agresti A. Categorical Data Analysis. New York. Wiley, 1990, 558p.
- Anantharaman D et al. Susceptibility to oral cancer by genetic polymorphisms at CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 loci among Indians: tobacco exposure as a risk modulator. *Pathologie- Biologie*, 2001, 49: 703-9.
- Anwar WA, Abdel- Rahman SZ, El Zein RA, Mostafa HM, Au WW. Genetic polymorphism of GSTM1, CYP2E1 and CYP2D6 in Egyptian bladder cancer patients. *Carcinogenesis*, 1996, 17, 9, 1923-1929
- Argiris A, Karamouzis MV, Ferris R L. Head and neck cancer. *The Lancet*, 2008, 371, Issue 9625, 1695-170.
- Baan R, Straif K, Grosse Y, et al. Carcinogenicity of alcoholic beverages. *The Lancet Oncology*, 2007, 8: 292-293.
- Boffetta P e Hashibe M. Alcohol and Cancer-Review. *The Lancet Oncology*, 2006, 7, 149-156.
-

Bosetti C, Gallus S, Francheschi S, Levi F, Bertuzzi M, Negri E, Talamini R, La Vecchia C. Cancer of larynx in non-smoking alcohol drinkers and in non-drinking tobacco smokers. *British Journal of Cancer*. 2002;87:516-8.

Bouchardy C, Hirvonen A, Coutelle C, Ward PJ, Dayer P, Benhamou S. Role of the alcohol dehydrogenase 3 and cytochrome P4502E1 genotypes in susceptibility to cancer of the upper aerodigestive tract. *International Journal of Cancer*, 2000, 87, 734-740.

Brennan P et al. Pooled analyses of Alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: a Huge Review. *American Journal of Epidemiology* 2004, 159: 1-16.

Brooks PJ et al. The alcohol flushing response: an unrecognized risk factor for esophageal cancer from alcohol consumption. *PLoS Medicine*, 2009, 6, 3: 258-263.

Boyle P. The globalisation of cancer. *Lancet* 2006, 368:629-630.

Bussab WO e Morettin PA. Estatística Básica. 4^a. ed. 1987, São Paulo: Atual. 1987, 321p.

Caballeria J, Barona E, Deulafeur, Hernandez- Munoz R, Rodes J & Lieber CS. Effects of H2- receptor antagonists on gastric alcohol dehydrogenase activity. *Digestive Diseases and Sciences* 1991, 36: 1673-1679

Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, Monner A, Carrera M, Agudo A, Quer M, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, Bosch FX. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *International Journal of Cancer*. 2004;108:741–9

Chow W-Y, Stewart MJ, Carr LG, Zheng D, Stewart TR, Williams A, Pinaire J & Crabb DW. An A/G polymorphism in the promoter of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2): effects of the sequence variant on transcription factor binding and the promoter strength. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 1999, 23: 963-968.

Crabb BW, Edenberg HJ, Borson WF & Li T-K. Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. The inactive ALDH2 allele is dominant. *Journal of Clinical Investigation*, 1989, 83: 314-316.

Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, You M. Symposium on alcohol nutrient and gene interactions- Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathologies. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2004, 63: 49-63.

Curioni, OA. Poliformismos genéticos no câncer de cabeça e pescoço: análise de risco e evolução clínica. Tese (doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina da USP, 2008.

Demirhan, O. and Tastemir, D. Cytogenetic effects of ethanol on chronic alcohol users. *Alcohol and Alcoholism*, January, 2008, 18, 1-10.

Dickinson FM, Hart GJ & Kitson TM. The use of pH-gradient ion-exchange chromatography to separate sheep liver cytoplasmatic aldehyde dehydrogenase from mitochondrial enzyme contamination, and observations on the interaction between the pure cytoplasmatic enzyme and disulfiram. *Biochemical Journal*, 1981, 199: 573-600.

Druesne- Pecollo N, Tehard B, Mallet Y, Gerber M, Norat T, Hercberg S, Latino-Martel P. Alcohol and genetics polymorphisms: effect on risk of alcohol-related cancer. *The Lancet Oncology*, 2009, 10, 173-80.

Edenberg, H.J. The genetics of alcohol metabolism- Role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Research and Health*, 2007, 30, 1, 5-13.

Enamoto N, Takase S, Takada N & Takada A. Alcoholic liver disease in heterozygotes of mutant and normal dehydrogenase- 2 genes. *Hepatology* 1991, 13: 11-18

Foulkes WB et al. Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case control study. *International Journal of Cancer*, 1995, 63: 769-773.

Gattás GJF, Carvalho MB, Siraque MS, Curioni AO, Kohler P, Eluf-Neto J, Wünsch-Filho V. Genetic polymorphisms of CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 associate with head and neck cancer. *Head & Neck*, 2006, 28, 819- 826.

Geisler AS, Olshan AF. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the Head and neck: a mini-HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 2001;154:95–105.

Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, Meier-Tackmann D, Singh S, Beckmann G. et al. Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Human Genetics*, 1992, 88, 344-346.

Gonzales MV, Alvarez V, Pello MF, Menendez MJ, Suarez C, Coto E. Genetic polymorphism of N-acetyl-transferase-2, glutathione s-transferase-M1, and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to the head and neck cancer. *Journal Clinical of Pathology*, 1998, 51, 294-98.

Greenfield NJ & Pietruszko R. Two aldehyde dehydrogenases from human liver: Isolation via Affinity chromatography and characterization of the isoenzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1977, 483: 35-45.

Guo Mei-Yan, Wang Q, Liu Yan-Zhen, Chen Huei-Min, Qi, Z, Guo Qing-Hong. Genetic polymorphisms in cytochrome P4502E1, alcohol and aldehyde dehydrogenases and the risk of esophageal squamous cell carcinoma in Gansu Chinese males. *World Journal of Gastroenterology*. 2008, 7, (14) 9, 1444-1449.

Harada S, Agarwal DP & Goedde HW. Aldehyde dehydrogenase deficiency as cause of facial flushing reaction to alcohol in Japanese. *Lancet* ii 1982, 827.

Harada S, Agarwal DP, Goedde HW & Ishikawa B. Aldehyde dehydrogenase isoenzyme variation and alcoholism in Japan. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1983, 18: 151-153.

Harada S, Okubo T, Nakamura T, Fujii C, Nomura F, Higuchi S & Tsutsumi M. A novel polymorphism (-357 G/A) of the ALDH2 gene: a linkage disequilibrium and an association with alcoholism. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 1999, 23: 958-962.

Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 2003, 76: 79-80. original publicado em *Science* NS, 1908, 28: 49- 50.

Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, et al. Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde- metabolizing genes in cancer of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 2006, 15 (4), 696-703.

Hashibe M 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.*, 2007a, 99: 777-89.

Hashibe M et al. Contribution of tobacco and alcohol to the high rates of squamous cell carcinoma of the supraglottis and glottis in Central Europe. *Am. J. Epidemiol.*, 2007b, 165 (7): 814- 20.

Hashibe M et al. Esophageal cancer in Central and Eastern Europe: tobacco and alcohol. *Int. J. Cancer*, 2007c, 120 (7): 1518- 22.

Hashibe M, Mckay JD, Curado MP, Oliveira JC, Koifman S. et al Multiple ADH genes are associated with upper aerodigestive cancers. *Brief Communications Nature Genetics*, 2008, 40, 6, 707-709.

Hendriks HF, van Tol A. Alcohol. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2005, 170: 339-361.

Hiraki A, et al. 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 Science*, 2007, 98, 7: 1087-1091.

Ho MP, Yo CH, Liu CM, Chen CL, Lee CC. Refractive hypotension in a patient with disulfiram-ethanol reaction. *The American Journal of the Medical Sciences*, 2007, 333 (1):53-5.

Homann et al, Alcohol dehydrogenase 1C*1 allele is a genetic marker for alcohol-associated cancer in heavy drinkers. *International Journal of Cancer*, 2006, 118: 1998- 2002.

Ho T, We Q, Sturgis EM. Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head & Neck*, 2007, July, 682- 699.

Hori H, Kawano T, Endo M, Yuasa Y. Genetic polymorphisms of tobacco and alcohol-related metabolizing enzymes and human esophageal squamous cell carcinoma susceptibility. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 1997, 25, 568-75.

INCA-Instituto Nacional de Câncer, Brasil, Available from:
<<http://www.inca.org.br>>

INCA, Incidência de Câncer no Brasil/ Estimativa 2008. Brasil, 2009, Available from: <www.inca.gov.br/estimativa/2008>

IARC-International Agency for Research on Cancer, França, Available from: <<http://www.iarc.fr>> and < <http://www-dep.iarc.fr>> last update, november, 2008.

IARC. Alcohol drinking. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 44. Lyon:IARC, 1988.

IARC, World Cancer Report 2008. Lyon, França. World Health Organization, 2008.

Lachenmeier DW, Kanteres F & Rehm J. Carcinogenicity of acetaldehyde in alcoholic beverages: risk assessment outside ethanol metabolism. *Addiction*, 2009, 104: 533-550.

Li H, et al. Ethnic Related Selection for anADH Class I Variant within East Asia. *PLoS ONE*, 2008, 3 (4): 1-13.

Li H et al, Refined geographic distribution of the oriental ALDH2*504Lys (nee 487Lys) variant. *Annals of Human Genetics*, 2009, 73: 335- 45.

Li G, Liu Z, Sturgis EM, Chamberlain RM, Spitz MR, Wei Q CYP2E1 G1532C, NQO1 Pro187Ser and CYP1B1 Val432Leu polymorphisms are not associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 2005, 14, 1034- 1036.

Lieber CS, Garro AJ, Lao MA, Mark KM, Worner TM. *Alcohol and cancer. Hepatology*, 1986, 6: 1005-1019

Lim RT, Gentry RT, Ito P, Yokoyama H, Barona E, Lieber CS. First pass metabolism of ethanol is predominantly gastric. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 1993, 17: 1337- 1344.

Liu S, Park JY, Schantz SP, Stern JC, Lazarus P. Elucidation of CYP2E1 5' regulatory RsaI/PstI allelic variants and their role in risk for oral cancer. *Oral Oncol*, 2001, 37, 437- 445.

Macgregor S, et al. Associations of ADH and ALDH2 gene variation with self report alcohol reactions, consumption and dependence: an integrated analysis. *Human Molecular Genetics*, 2009, 18 (3): 580- 593.

Mayfield RD, Harris RA, Schuckit MA. Genetic factors influencing alcohol dependence. *British Journal of Pharmacology*, 2008, 154: 275-287.

Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinical Proceedings*, 2008, 83, 4, 489-501.

Miller SA, Dykes DD, Polesk HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16,1215.

Ministério da Saúde e INCA, TNM- Classificação de tumores malignos, 6^a Ed, Rio de Janeiro, RJ, INCA, 2004.

Navarro Silvera AS, et al. Food group intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *International Journal of Cancer*, 2008, 15, 123 (4): 852-60

Negri E, et al. Family history of cancer: Pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology consortium. *International Journal of Cancer*, 2009, 124, 394-401.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ. And Wasserman W. Applied Linear Statistical Models. 4. ed. Illinois: Richard D. Irwing., 1996, 1408p.

Ng SK, Kabat CG, Wynder EL. Oral cavity cancer in non-users of tobacco. *Journal of National Cancer Institute*. 1993 ;85:743-5.

Obe G, Jonas R, Schmidt S. Metabolism of ethanol in vitro produces a compound which induces sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes in vitro: acetaldehyde not ethanol is mutagenic. *Mutation Research*, 1986, 174(1): 47- 51.

Oota H et al. The evolution and population genetics of the ALDH2 locus: random genetic drift, selection, and low levels of recombination. *Annals of Human Genetics*, 2004, 68, 93-109.

Osier MV et al. Possible Epistatic Role of ADH7 in the protection against alcoholism. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatry Genetics)* 2004, 126B: 19-22.

Parkin DM . The global health burden of infection associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*, 2006 118:3030-3044.

Peng Gila- Sheun, Yin Shih- Jiun. Effect of allelic variants of aldehyde dehydrogenase ALDH2*2 and alcohol dehydrogenase ADH1B*2 on the blood acetaldehyde concentrations. *Human Genomics*, 2009 3 (2), 121-27.

Pöschl G and Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol and Alcoholism*, 2004, 39, 3, 155- 165.

Ramchandani VA, Borson WF, Li TK. Research advances in ethanol metabolism. *Pathologie Biologie*, 2001, 49, 676-82.

Robbins et al, Patologia Estrutural e Funcional, 5ª Ed., Rio de Janeiro, R.J., Ed. Guanabara Koogan, 2000.

Roine R, Gentry RT, Hernandez- Munoz R, Barona E & Lieber CS. Aspirin increases blood alcohol concentrations in humans after ingestion of ethanol. *Journal of the American Medical Association*, 1990, 264: 2406-2408.

Rossit A, Conforti-Froes NDT, Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer. *Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia*, 2000; 3:26–30.

Santos BR, Monteiro MG and Thomasson HR. Allele frequency of ADH2 and ALDH2 among Brazilians of different ethnic groups. *Alcohol*, 1997, 14, 3, 205-207

Schwitters SY, Johnson RC, Johnson SB & Ahern Fm. Familial resemblances in flushing following alcohol use. *Behavior Genetics*, 1982, 12: 349-352.

Seitz, H.K. and Becker, P. Alcohol metabolism and cancer risk. *Alcohol Research & Health*, 2007, 30, 1, 38-47.

Seitz, H.K. and Meier, P. The role of acetaldehyde in upper digestive tract cancer in alcoholics. *Tranlational Research*, 2007, 149, 6, 293- 97

Seitz HK and Pöshl G. The role of gastrointestinal factors in alcohol metabolism. *Alcohol and Alcoholism*, 1997, 32, 5: 543- 549.

Seitz HK and Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol mediated carcinogenesis. *Nature Reviews/ Cancer*, 2007, 7, 599-612.

Stewart BW, Kelihues P . World cancer report. Lyon,France: International Agency for Research on Cancer. 2003.

Souza TRB, Gonçalves JA. Papilomavírus humano e a detecção do DNA viral no carcinoma espinocelular da cavidade oral. *Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço*, 2009, 38, 1: 62-66.

Thompson & Thompson, Genética Médica, 5ª Ed., Rio de Janeiro, R.J., Ed. Guanabara Koogan, 1993.

Tolstrup JS, et al. Alcoholism and alcohol drinking habits predicted from alcohol dehydrogenase genes. *The Pharmacogenomic Journal*, 2007, 9: 1-8.

Tuyns, A. Alcohol and cancer. *Alcohol: Health and Research World*, 1978, 2, 20–31.

Yokoama A, Kato H, Yokoama T, et al. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenase and glutathione S-transferase M1 and drinking, smoking and diet in Japanese men with esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 2002, 23, 1851-9.

Yokoyama A, Omori T. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and risk for esophageal and head neck cancers. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 2003, 33 (3): 111-121.

Yokoyama A, et al Melanosis and squamous cell neoplasms of the upper aerodigestive tract in Japanese alcoholic men. *Cancer Science*, 2006, 97 (9): 905-911.

Xu et al. Genotyping of human alcohol dehydrogenases at the ADH2 and ADH3 loci following DNA sequence amplification. *Genomics*, 1998, 2, 209-214.

White EM. Fundamentos de química para ciências biológicas, tradução, Maar JH, São Paulo, SP, Ed Edgar Blücher LTDA, 1988.

Zavras AI, Wu T, Laskaris G, Wang YF, Cartos V, Segas J, Lefantziz D, Joshipura K, Douglass CW, Diehl SR. Interaction between a single nucleotide polymorphism in the alcohol dehydrogenase 3 gene, alcohol consumption and oral cancer risk. *International Journal of Cancer*. 2002;97:526–30.