MARIANA ROCHA SILVA

Qual o papel dos genes de metabolização de xenobióticos de fase I e genes relacionados com a ação da nicotina no risco de desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço?

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Gilka Jorge Figaro
Gattás

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na biblioteca FMUSP)

SÃO PAULO

2019

MARIANA ROCHA SILVA

Qual o papel dos genes de metabolização de xenobióticos de fase I e genes relacionados com a ação da nicotina no risco de desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço?

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Gilka Jorge Figaro
Gattás

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na biblioteca FMUSP)

SÃO PAULO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Mariana Rocha

Qual o papel dos genes de metabolização de xenobióticos de fase I e genes relacionados com a ação da nicotina no risco de desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço? / Mariana Rocha Silva. -- São Paulo, 2019.

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

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Gilka Jorge Figaro Gattás.

Descritores: 1.Câncer de cabeça e pescoço
2.Polimorfismo genético 3.Xenobióticos/metabolismo
4.Receptores nicotínicos 5.Consumo de cigarros

USP/FM/DBD-406/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Suely e Antonio e ao Yago por todo amor,
incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por permitir que pudesse alcançar esse sonho e por tudo que aprendi.

À Profa. Dra. Gilka Jorge Figaro Gattás, pela orientação e os ensinamentos durante minha trajetória na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

À Dra. Fernanda de Toledo Gonçalves, por todo seu auxílio, paciência, dedicação, ensinamentos, conversas e pelas risadas.

Às minhas amigas e companheiras de bancada Juliana De Antonio e Isabela Firigato, alunas com quem pude aprender muito e dividir grandes momentos.

À Daniela de Oliveira, minha grande amiga desde a Graduação, por todos os desabafos, palavras de incentivo e por nossa amizade que nos ajudou a continuar nossos caminhos acadêmicos.

Ao Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho da FMUSP. Principalmente aos funcionários Valtair, Liliane e Fátima pela ajuda e companhia diária.

À minha irmã, Juliana, pelo apoio, carinho e auxílio de sempre e ao meu primo, Robson, pela ajuda e amizade.

Ao Dr. Otávio Alberto Curioni por auxiliar o desenvolvimento do trabalho e ao departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis - São Paulo e aos pacientes do Hospital heliópolis que aceitaram participar da presente pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao serviço de Biblioteca e Documentação da FMUSP.

A todos, familiares e amigos, que me incentivaram, acreditaram e colaboraram para a minha formação acadêmica.

Normalização Adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Sumário

Lista de siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de quadros

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O câncer de cabeça e pescoço	1
1.2 Fatores de risco do CCP	2
1.3 Genes envolvidos na metabolização do tabaco	6
1.3.1 <i>CYP1A1</i>	7
1.3.2 <i>CYP2D6</i>	8
1.3.3 <i>CYP3A4</i>	11
1.4 Genes codificadores de receptores nicotínicos	12
1.4.1 <i>CHRNA5</i>	14
1.4.2 <i>CHRNA3</i>	14
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
4. MÉTODOS	18
4.1 Casuística	18
4.2 Metodologia de coleta do material e análise dos polimorfismos	20
4.3 Análise estatística	23
5. RESULTADOS	26
6. DISCUSSÃO	44
6.1 Dados sociodemográficos e hábitos de consumo	44
6.2 Genes envolvidos na metabolização do cigarro	49
6.3 Genes codificadores de receptores nicotínicos	54
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59

8. CONCLUSÃO	60
9. ANEXOS	62
Anexo A - Termos de Consentimento Livre e Esclarecido	62
Anexo B - Aprovações dos Comitês de Ética em pesquisa das instituições envolvidas	69
Anexo C - Questionário aplicado no projeto	72
Anexo D - Artigo referente à dissertação aceito para publicação na revista Molecular Genetics and Genomic Medicine (DOI: 10.1002).....	77
Anexo E – Tabelas de comparação entre as variáveis sociodemográficas nos grupos de indivíduos com a neoplasia de cavidade oral, laringe e orofaringe e o grupo de controles:.....	83
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE SIGLAS

ADH: enzima álcool desidrogenase

ALDH: enzima aldeído desidrogenase

CCP: câncer de cabeça e pescoço

CHRN: família de genes que codificam os receptores nicotínicos de acetilcolina (colinérgico)

CHRNA3: receptor nicotínico de acetilcolina (colinérgico) subunidade $\alpha 3$

CHRNA5: receptor nicotínico de acetilcolina (colinérgico) subunidade $\alpha 5$

CYP: família de genes do citocromo p450

CYP1A1: citocromo P450 família 1 subfamília A polipeptídeo 1

CYP2D6: citocromo P450 família 2 subfamília D polipeptídeo 6

CYP3A4: citocromo P450 família 3 subfamília A polipeptídeo 4

DNA: ácido desoxirribonucleico

EM: metabolizadores extensivos

HPA: hidrocarboneto policíclico aromático

HPV: papiloma vírus humano

IM: metabolizadores intermediários

INCA: Instituto Nacional do Câncer

nAChRs: receptores nicotínicos de acetilcolina/colinérgico

NNN: nornicotinas

NNK: 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil-1-butanona)

PCR: polymerase chain reaction

PCF-RFLP: polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphisms

PM: metabolizadores pobres

RNA: ácido ribonucleico

SNP: polimorfismo de base única

UM: metabolizadores ultrarrápidos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação das variáveis sociodemográficas entre os grupos de caso e controle.....	27
Tabela 2 – Comparação dos hábitos de consumo de álcool e cigarro e intensidade do consumo de cigarros entre os grupos casos e controles.....	28
Tabela 3 – Comparação do hábito de consumo do cigarro entre os grupos de indivíduos com a neoplasia de cavidade oral (235 – 38%), laringe (149 – 24%) e orofaringe (148 – 24%) em relação ao grupo controle e intensidade do consumo de cigarros	29
Tabela 4 – Distribuição das frequência genotípicas no grupo de casos e controles para os polimorfismos <i>CYP1A1*2A</i> , <i>CYP1A1*2C</i> e <i>CYP3A4*1B</i> (modelo de genótipos e modelo dominante).....	30
Tabela 5 - Distribuição dos genótipos para os polimorfismos <i>CYP1A1*2A</i> , <i>CYP1A1*2C</i> e <i>CYP3A4*1B</i> nos grupos de pacientes com câncer na cavidade oral (235 - 38%), laringe (149 - 24%), orofaringe (148 – 24%) e controle. Modelo de genótipos e modelo dominante.....	31
Tabela 6 – Distribuição das frequências genotípicas no grupo de casos e controles para as variantes estudadas do gene <i>CYP2D6</i> (modelo de genótipos e modelo dominante).....	32
Tabela 7 – Distribuição das frequências dos polimorfismos do gene <i>CYP2D6</i> nos grupos de pacientes com câncer de cavidade oral (235 - 38%), laringe (149 - 24%) e orofaringe (148 – 24%). Modelo de genótipos e modelo dominante.....	33
Tabela 8 – Distribuição das frequências dos haplótipos do gene <i>CYP2D6</i> nos grupos de casos e controles.....	34
Tabela 9 – Comparação das combinações haplotípicas do gene <i>CYP2D6</i> com os riscos de desenvolvimento das neoplasias de cavidade oral (235 - 38%), laringe (149 - 24%) e orofaringe (148 – 24%)	35
Tabela 10 – Distribuição das classes fenotípicas do gene <i>CYP2D6</i> nos grupos de casos e controles.....	37
Tabela 11 – Comparação entre as classes fenotípicas resultantes do gene <i>CYP2D6</i> e o risco de desenvolvimento do câncer de cavidade oral (235 - 38%), laringe (149 - 24%) e orofaringe (148 – 24%).....	38

Tabela 12 – Distribuição dos genótipos do <i>CHRNA5</i> e <i>CHRNA3</i> no grupo de casos e controle (modelo de genótipos e modelo dominante).....	39
Tabela 13 – Distribuição dos genótipos do <i>CHRNA5</i> e <i>CHRNA3</i> nos grupos de indivíduos com neoplasias de cavidade oral (235 - 38%), laringe (149 - 24%) e orofaringe (148 – 24%). Modelo de genótipos e modelo dominante.....	40
Tabela 14 – Distribuição dos genótipos do <i>CHRNA5</i> e o número de cigarros/dia (modelo de genótipos e modelo dominante).....	42
Tabela 15 - Distribuição dos genótipos do <i>CHRNA3</i> e o número de cigarros/dia (modelo de genótipos e modelo dominante).....	42
Tabela 16 – Distribuição dos genótipos do <i>CHRNA5</i> e o número de maços/ano consumidos (modelo de genótipos e modelo dominante).....	43
Tabela 17 – Distribuição dos genótipos do <i>CHRNA5</i> e o número de maços/ano consumidos (modelo de genótipos e modelo dominante).....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema das possibilidades de caminhos da nicotina após sua absorção: metabolização no fígado pelos genes da família do Citocromo P450 (A) e ação direta no cérebro com a ligação aos receptores nicotínicos (B).....5

Figura 2 – Polimorfismos do gene *CYP2D6* representados pelos pares de bases alterados e com as atividades enzimáticas resultantes dessas mutações.....10

Figura 3 – Descrição dos cinco haplótipos selecionados do gene *CYP2D6* para análise com destaque para as trocas de base e atividades enzimáticas resultantes.....22

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Polimorfismos analisados no presente estudo pela técnica de qPCR, seus SNPs, transição de base e os respectivos ensaios usados para sua identificação.....	22
Quadro 2 – Descrição das classes fenotípicas segundo os haplótipos do gene <i>CYP2D6</i>	23

Resumo

Silva MR. *Qual o papel dos genes de metabolização de xenobióticos de fase I e genes relacionados com a ação da nicotina no risco de desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço?* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: Os polimorfismos em genes de metabolização de xenobióticos da fase I, como os da Família do citocromo P450 (CYPs) codificam enzimas que têm sido associadas ao risco do câncer de cabeça e pescoço (CCP), pois participam do processo de biotransformação de compostos carcinogênicos do cigarro, considerado o principal fator de risco desta neoplasia. Além disso, variações nos genes codificadores dos receptores nicotínicos (*CHRNAs*), que modulam a sensação de prazer e a intensidade de consumo de cigarros, também podem contribuir para o desenvolvimento do CCP. O objetivo desse estudo foi avaliar oito polimorfismos em genes de metabolização de xenobióticos de fase I como *CYP1A1* (rs4646903 e rs1048943), *CYP2D6* (rs1080985, rs3892097, rs1065852, rs28371706 e rs28371725) e *CYP3A4* (rs2740574), e dois polimorfismos em genes codificadores de receptores nicotínicos: *CHRNA3* (rs578776) e *CHRNA5* (rs16969968) no risco de CCP. Além da associação entre intensidade de consumo de cigarros e os polimorfismos nos genes *CHRNA3* e *CHRNA5*. **MÉTODOS:** Foram avaliados 619 indivíduos com o CCP (cavidade oral - 38%, laringe - 24%, orofaringe - 24% e 14% nas demais localizações) e 448 controles, todos provenientes do Hospital Heliópolis, São Paulo, Brasil. Os polimorfismos foram identificados pelas técnicas de qPCRou PCR-RFLP. Foram estimados os *odds ratios* e os respectivos intervalos de confiança de 95% utilizando-se a análise de regressão logística multivariada ajustada para as variáveis de confusão. **RESULTADOS:** O risco de CCP foi maior para indivíduos do sexo masculino (OR= 1,72; IC 95% 1,19-2,48), com idade superior a 50 anos (OR=1,45; IC 95% 1,13 – 1,87) e baixa escolaridade (OR=1,72; IC 95% 1,16-2,56) e o risco foi menor em indivíduos que se autodeclararam como não brancos (OR= 0,67; IC 95% 0,52-0,86). O consumo de tabaco dos participantes que declararam fumar até o momento da entrevista, aumentou em praticamente nove

vezes o risco de CCP (OR=8,97; IC 95% 5,90-13,67), enquanto os indivíduos que declararam fazer uso do álcool apresentaram risco duas vezes maior (OR=1,91; IC 95% 1,37-2,65). Observou-se que o hábito tabagista nos participantes do estudo mostrou-se associado ao risco de 17 vezes de desenvolvimento de neoplasia de orofaringe (OR=17,76; IC95% 6,39-49,34) e de 7 vezes o risco de tumores na cavidade oral (OR=7,65; IC 95% 4,25-13,80) e na laringe (OR=7,85; IC 95% 3,69-16,67). Os polimorfismos genéticos estudados não foram associados significativamente com o risco de CCP, nem com os diferentes sítios tumorais. Por outro lado, os indivíduos homozigotos para a variante do gene *CHRNA5*, independentemente da doença, apresentaram o risco duas vezes maior de consumir 20 ou mais cigarros por dia (OR=1,93; IC95% 1,05–3,58). CONCLUSÃO: O hábito tabagista seguido do consumo de bebidas alcoólicas foram os principais fatores de risco para o CCP. Os dez polimorfismos estudados na presente investigação não mostraram associação significativa com o risco de CCP, mesmo quando os sítios tumorais foram considerados em separado. Como fator de risco indireto ao CCP verificamos que a presença do polimorfismo *CHRNA5* (rs16969968) no gene que codifica o receptor de nicotina se mostrou associado com o aumento do risco de um alto consumo de cigarros.

Descritores: Câncer de cabeça e pescoço; Polimorfismo genético; Xenobióticos/metabolismo; Receptores nicotínicos; Consumo de cigarros.

Abstract

Silva MR. *What is the role of phase I xenobiotic metabolizing genes and nicotine act related genes in the risk of developing of head and neck cancer?* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

INTRODUCTION: Polymorphisms in phase I xenobiotic metabolizing genes, such as those from cytochrome Family (P450), encode proteins have been associated with the risk of head and neck cancer (HNC), because they participate in the biotransformation process of cigarettes carcinogenic compounds, considered the main factor risk of this cancer. In addition, variation in nicotinic receptors coding genes (*CHRNAs*), which modulate the sensation of pleasure and intensity of cigarette smoking, may also contribute to the development of HNC. The aim of this study was to evaluated eight phase I polymorphic genes for xenobiotic metabolism as *CYP1A1* (rs4646903 and rs1048943), *CYP2D6* (rs1080985, rs3892097, rs1065852, rs28371706 and rs28371725) and *CYP3A4* (rs2740574), and two polymorphisms genes encoding for nicotinic receptors: *CHRNA3* (rs578776) and *CHRNA5* (rs16969968) in HNC risk. The association between the cigarette smoking intensity and genes polymorphism in *CHRNA3* and *CHRNA5* was also investigate. **METHODS:** Were evaluated 619 individuals with HNC (oral cavity – 38%, larynx – 24%, oropharynx – 24% and 14% in the other localizations) and 448 controls all coming from Heliópolis Hospital, São Paulo, Brazil. The polymorphisms were identified by qPCR technique or PCR-RFLP technique. *Odds ratios* and 95% confidence intervals were estimated using adjusted multivariate logistic regression analysis. **RESULTS:** HNC risk were increased in male subjects (OR= 1.72; IC95% 1.19-2.48), over 50 years old (OR=1.45; IC 95% 1.13 – 1.87) and with low education level (OR=1.72; IC 95% 1.16-2.56) and in relation to skin color, the risk was lower in individuals who declare themselves as non-white (OR= 0,67; IC 95% 0,52-0,86). The tobacco consumption among participants who declared smoking until the time of the interview, increased the risk of HNC by almost nine times (OR=8.97; IC 95% 5.90-13.67), while individuals who declared used alcohol consumption as twice as risk (OR=1.91; IC 95% 1.37-2.65). It was also observed that smoking in the

participants of the study increased the risk of developing oropharyngeal cancer (OR=17.76; IC 95% 6.39-49.34) and more than 7 times the risk of tumors in the oral cavity (OR=7.65; IC 95% 4.25-13.80) and in the larynx (OR=7.85; IC 95% 3.69-16.67). None of the genetics polymorphisms studied shown to be significantly associated with the risk of HNC, as in different tumor sites. On the other hand, homozygous individuals for the *CHRNA5* variant, regardless of the disease, were twice as likely to smoke 20 or more cigarettes per day. CONCLUSION: Smoking followed by alcohol consumption were the main risk factor for HNC. The ten polymorphisms studied in the present investigation showed no significant association with the risk of HNC, even when the tumor sites were considered separately. As an indirect risk factor to the HNC, we found the presence of the *CHRNA5* (rs16969968) polymorphism in the gene encoding the nicotinic receptor has been shown to be associated with an increase of high cigarette consumption.

Descriptors: Head and neck cancer; Polymorphism, genetic; Xenobiotics/metabolism; Receptors, nicotinic; Cigarette consumption.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O câncer de cabeça e pescoço

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é um conjunto de neoplasias que atingem diferentes sítios anatômicos das vias aéreo-digestivas superiores, que compreendem a cavidade oral (lábios, língua, mucosa bucal, assoalho da boca, gengivas, trígono retromolar e palato duro), faringe (orofaringe, nasofaringe e hipofaringe), laringe (supraglote, glote e subglote), cavidades nasais, seios paranasais e glândulas salivares (Colombo e Rahal, 2009). O CCP é considerado o sexto tipo de neoplasia mais comum no mundo, sendo que a maioria dos casos ocorre na cavidade oral (40%), seguidos da laringe (25%) e faringe (15%). O tipo histológico mais frequente é o carcinoma de células escamosas ou espinocelular, que têm origem nas células epiteliais superficiais não queratinizadas e que acomete cerca de 90% dos casos (Döbrossy, 2005; Marcu e Yeoh, 2009; Simard et al., 2014; Leoncine, et al., 2015).

Esse grupo de neoplasias ocorre mais frequentemente em indivíduos do sexo masculino, apresentando proporções de dois a quatro homens para cada mulher com a doença, dependendo da população estudada (Campana e Goiato, 2013). Entretanto, o diagnóstico em mulheres tem se tornado cada vez mais frequente, o que se deve, essencialmente, ao aumento do consumo de álcool e cigarro por parte delas (Marcu e Yeoh, 2009; Casati, et al., 2012; Vilar e Martins, 2012). A incidência da doença aumenta de acordo com a idade, e a taxa de sobrevida após o diagnóstico do CCP é baixa, principalmente devido a sua detecção tardia (Döbrossy, 2005; Colombo e Rahal, 2009; Casati, et al., 2012). Para o ano de 2018 foram calculados cerca de 887 mil novos casos de CCP e cerca de 453 mil mortes em todo o mundo (Globocan, 2018). Já para o biênio de 2018 - 2019, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou para o Brasil cerca de 14.700 novos casos de câncer oral, sendo 11.200 em homens e 3.500 em mulheres e cerca de 7.670 novos casos para a neoplasia de laringe, sendo 6.390

em indivíduos do sexo masculino e 1.280 do feminino. Com essas estimativas o câncer oral ocuparia a 5ª posição dentre as neoplasias mais frequentes do sexo masculino e o de laringe a 8ª posição dentre os homens (INCA, 2018).

1.2 Fatores de risco do CCP

As causas do desenvolvimento do CCP ainda não são bem compreendidas, mas as evidências indicam que vários fatores contribuem de forma individual ou combinada para o aumento do risco da neoplasia, e que tais fatores podem estar relacionados com os diferentes sítios de ocorrência do tumor. Dessa forma, o CCP é considerado uma doença multifatorial, sendo influenciada, por exemplo, pela má higiene bucal, nutrição, exposição aos químicos potencialmente carcinogênicos, infecções por HPV, alterações genéticas e principalmente pela exposição ao tabaco e pelo consumo de álcool (Döbrossy, 2005; Colombo e Rahal, 2009; Lacko et al., 2014).

A má higiene bucal, principalmente em consumidores de álcool, provoca além da proliferação bacteriana, o aumento do tempo de contato do indivíduo com compostos carcinogênicos, como por exemplo, o acetaldeído, considerado o principal composto proveniente da metabolização do álcool (Kawakita e Matsuo, 2017; Lee WT et al., 2019). O acetaldeído é derivado do etanol e quando presente no ambiente oral por um longo período pode interferir na atividade das células epiteliais, ligando-se a macromoléculas, contribuindo para o desenvolvimento da neoplasia. Sendo assim, a má higiene é considerada um fator de risco para a neoplasia que pode estar associada de maneira combinada com outros, como, por exemplo, o consumo simultâneo de tabaco e álcool (Döbrossy, 2005).

O tipo de dieta tem sido associado com o risco do desencadeamento do CCP, sendo que alguns estudos demonstraram que uma alimentação rica em vitaminas A e C, em betacarotenos e vegetais confere proteção ao desenvolvimento da neoplasia. De acordo com os autores desses estudos, as vitaminas e componentes dos vegetais atuam como agentes antioxidantes e conferem proteção ao material genético, evitando mutações no DNA causadas

por espécies reativas de oxigênio (ROS) (Döbrossy, 2005; Reska et al., 2006; Colombo e Rahal, 2009, Marchioni et al., 2011).

A infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) também é considerado um fator de risco de alguns tipos de neoplasias, como por exemplo no colo uterino, porém diversos estudos também têm observado a associação, principalmente dos tipos virais HPV16 e 18, com o aumento do risco de desenvolvimento do CCP, em especial na orofaringe (base da língua e tonsilas) e na cavidade oral em adultos jovens. Investigações apontam que em algumas regiões desenvolvidas do mundo, como na Austrália, América do Norte e norte da Europa, o HPV chega a estar relacionado com cerca de 60% dos casos de CCP, porém tais achados variam bastante conforme a população e o sítio do tumor estudado (Döbrossy, 2005; Simard et al., 2014; Alsbeih et al., 2019).

O álcool é considerado uma droga psicoativa, sendo que seu consumo é globalmente permitido e suas taxas de ingestão têm aumentado em todo o mundo nos últimos anos (Vanskike et al., 2016; Kawakita e Matsuo, 2017). Apesar de seu papel no desenvolvimento do CCP não ser ainda totalmente esclarecido, acredita-se que ele possa ocorrer de duas formas, direta e indireta. A atuação direta considera a ação do álcool sobre as células da mucosa oral, a qual pode modificar a permeabilidade desse tecido, facilitando a entrada de carcinógenos ambientais, como as substâncias do cigarro, o que pode levar a alterações celulares que favorecem o processo carcinogênico. Já a atuação indireta do álcool no risco da neoplasia, é atribuída ao seu processo de metabolização, o qual resulta na produção de acetaldeído, que é considerado uma substância carcinogênica (Carrard et al., 2008; Kawakita e Matsuo, 2017; Lee WT et al., 2019). Quando consumido, parte do álcool é absorvido e metabolizado na mucosa bucal, sendo transformado em acetaldeído, através da atividade da enzima álcool-desidrogenase (ADH), e depois é convertido em acetato pela enzima aldeído-desidrogenase (ALDH). O acetato pode ir para diferentes partes do organismo, sofrer outras transformações e participar da formação de diferentes moléculas, como, por exemplo, ácidos graxos, moléculas de colesterol e corpos cetônicos (Carrard et al., 2008). Na região da boca a ALDH possui baixa atividade, e assim o acetaldeído pode ser acumulado e se ligar a

macromoléculas (proteínas e DNA) o que pode ocasionar mudanças no ambiente oral alterando os mecanismos de transcrição, reparo do DNA, síntese proteica, entre outros (Seitz et al., 2004; Jelski e Szmitkowski, 2008).

O consumo de cigarros é considerado o principal fator de risco para o CCP, podendo aumentar de cinco a 25 vezes a probabilidade de desenvolvimento do tumor (Vilar e Martins, 2012). O cigarro é um composto formado por uma mistura de mais de 5.000 substâncias químicas, sendo cerca de setenta delas consideradas carcinogênicas ou que podem adquirir esse potencial após sofrerem metabolização hepática. Dentre essas substâncias destacam-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), aldeídos, alcalóides, aminas aromáticas, polifenóis e as nitrosaminas que são provenientes da metabolização da nicotina pelas enzimas pertencentes a família do citocromo P450 (Colombo e Rahal, 2009; Almeida et al., 2014; Singh et al., 2015; Vanskike et al., 2016; Yalcin e De La Monte, 2016; Siqueira, 2017).

O hábito de fumar tem sido associado a 33% dos casos de CCP em países da América do Norte, América Latina e Europa (Hashibe et al., 2009; Simard et al., 2014) e de acordo com Döbrossy (2005) 60% dos cânceres orais em homens e 30% em mulheres têm sua causa relacionada ao uso do cigarro, mesmo que esse seja de baixa quantidade diária (Döbrossy, 2005). Sabe-se que fumantes passivos, que ficam expostos durante anos à fumaça dessa substância, também apresentam risco duas vezes maior para o desenvolvimento de CCP em relação aos indivíduos não expostos (Bandeira et al., 2014).

A dependência do cigarro é definida como um comportamento complexo que sofre influências ambientais, sociais e genéticas (Almeida, et al., 2014) e é considerada uma doença crônica pela Organização Mundial de Saúde. A nicotina, principal responsável pela dependência do cigarro, é uma substância de caráter básico ($\text{pH} > 7$) e sua absorção no organismo ocorre de forma dependente do pH. Diferentes tipos de cigarro contêm em sua composição variadas formas da nicotina. Na América em geral, a forma predominante (*flue cured*) utiliza a nicotina ionizada, a qual não ultrapassa as membranas celulares da boca com rapidez, por ser uma área mais ácida, porém, consegue ultrapassar facilmente a região dos alvéolos, que são áreas mais alcalinas, e atinge assim a

circulação sistêmica do indivíduo sem passar antes pelo fígado. Dessa forma, estima-se que, depois de inalada, a substância chega até o cérebro em menos de 7 segundos, desencadeando o processo de reforço positivo cerebral do consumo (Siqueira, 2017). Quando chega ao cérebro, a nicotina, age ligando-se a receptores específicos que medeiam as respostas do organismo relacionadas às sensações de prazer e recompensa após o consumo (Siqueira, 2017). Assim, a nicotina pode ser metabolizada pelos genes da família CYP e originar compostos intermediários com potencial de ocasionar danos ao material genético ou pode ir diretamente para a região do cérebro e se ligar aos seus receptores mediando respostas do sistema de reforço/recompensa (Yalcin e De La Monte, 2016), como esquematizado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema das possibilidades de caminhos da nicotina após sua absorção: metabolização no fígado pelos genes da família do Citocromo P450 (A) e ação direta no cérebro com a ligação aos receptores nicotínicos (B)

Quando o tabaco e o álcool são consumidos conjuntamente, apesar de serem considerados fatores de risco independentes, apresentam um efeito sinérgico (Colombo e Rahal, 2009), aumentando em cerca de 15 vezes o risco de desenvolvimento da neoplasia (Döbrossy, 2005; Colombo e Rahal, 2009;

Marcu e Yeoh, 2009). Ainda que o CCP seja considerado uma doença multifatorial, esses dois fatores têm sido cada vez mais estabelecidos em diversas populações sendo responsáveis por cerca de 80% dos casos de CCP e quando considerados fatores individuais de risco, são os principais associados a neoplasia (Lee YA et al., 2019).

A influência genética na metabolização de compostos presentes no cigarro, tem se mostrado cada vez mais relevante no risco de desenvolvimento do CCP. Sabe-se que nem todos os indivíduos que estão expostos a fatores considerados de risco vão desenvolver a doença, possivelmente devido a diferença interindividual do processo de metabolização dessas substâncias. Essa variação se dá devido ao grande número de polimorfismos que podem ocorrer nos genes envolvidos nesse processo, podendo provocar aumento ou diminuição do risco de desenvolvimento do câncer (Döbrossy, 2005; Zhang et al., 2012; Bandeira et al., 2014). O principal polimorfismo que ocorre nesses genes é o de base única (SNP- *single nucleotide polymorphism*), no qual apenas uma base do DNA é trocada por outra. Tal mudança pode acarretar na produção de uma proteína com atividade aumentada, diminuída ou até mesmo ausente (Colombo e Rahal, 2009; Lacko et al., 2014). Quando o organismo entra em contato com substâncias potencialmente mutagênicas e/ou carcinogênicas, como as provenientes do cigarro, parte delas, ao passar por um processo de ativação se torna genotóxica. Esse processo ocorre durante a metabolização de xenobióticos ou também chamado de processo de biotransformação (Colombo e Rahal, 2009) que é dividido em duas etapas: Fase I ou de ativação e a Fase II ou de detoxificação.

1.3 Genes envolvidos na metabolização do tabaco

Durante a primeira fase da biotransformação, os compostos do cigarro sofrem processos de oxidação e redução, podendo produzir intermediários eletrofílicos, que apresentam afinidade de ligação por macromoléculas, como o DNA, RNA ou mesmo proteínas. As substâncias eletrofílicas podem formar ligações covalentes com as bases nitrogenadas do material genético, resultando

em adutos, que estão relacionados com o aparecimento de mutações (Loureiro et al., 2002; Valente et al., 2017). Essas alterações podem ser corrigidas por diversos mecanismos de reparo, porém, se as mesmas não forem corrigidas, podem resultar em erros de transcrição da molécula de DNA ou tradução das proteínas, favorecendo assim o aparecimento de neoplasias (Hiyama et al., 2008; Lacko et al., 2009; Leme et al., 2010).

As enzimas pertencentes à família do Citocromo P450 (CYP) possuem papel de destaque durante a primeira fase do processo de biotransformação, sendo encarregadas por cerca de 70% a 80% do metabolismo e ativação de xenobióticos (Ingelman-Sundberg, 2004; Nebert e Dalton, 2006). Elas participam das reações de oxidação, redução e hidrólise, sendo responsáveis principalmente pelas reações de oxidação, atuando com atividade de monooxigenases, ou seja, inserindo átomos de oxigênio nos seus substratos, tornando-os mais hidrossolúveis e podendo formar intermediários reativos (Rodriguez-Antona e Ingelman-Sundberg, 2006). Dentre os genes da família CYP alguns recebem destaque por participarem da metabolização de compostos provenientes do cigarro, como as nitrosaminas e os HPAs. Esses genes apresentam polimorfismos que podem resultar na codificação de enzimas que tenham alterações na sua atividade, podendo reduzir, aumentar ou não transformar tais compostos, o que pode influenciar a quantidade de substâncias com potencial mutagênico no organismo. São exemplos desses genes o *CYP1A1*, *CYP2D6* e o *CYP3A4*.

1.3.1 *CYP1A1*

O gene *CYP1A1* está localizado no cromossomo 15q24 e codifica uma enzima que é considerada a principal envolvida na fase I da biotransformação, ativando diversos compostos, como as nitrosaminas, os HPAs, alcaloides e aminas heterocíclicas presentes no cigarro (Cadoni et al., 2012; Yousef et al., 2012; Singh et al., 2015). Esse gene é considerado relativamente bem conservado (Ingelman-Sundberg, 2004), mas já foram descritos cerca de 14 polimorfismos segundo o *The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele*

Nomenclature Database (<https://www.pharmvar.org/htdocs/archive/cyp1a1.htm> acesso em: 05/02/2019). Dois desses polimorfismos (rs4646903 e rs1048943) foram relacionados com o aumento do risco de desenvolvimento do CCP em estudos que avaliaram amostras populacionais Asiáticas como Japão, China e Índia (Tanimotoa et al. 1999; Sato et al., 2000; Ho et al., 2007; Singh et al., 2014; Yu et al., 2014; Zeng et al., 2016). Porém tais associações são controversas em alguns estudos. Nosso grupo, por exemplo, realizou investigações anteriores com indivíduos da população de São Paulo não encontrando associações significativas entre o gene e o risco de desenvolvimento da neoplasia (Gattás et al., 2006). O mesmo ocorreu em outros estudos que abordaram a análise da população brasileira (Gattás et al., 2006; Marques et al., 2006; Losi-Guembarovski et al., 2008; Monteiro et al., 2012) e também a alemã (Hahn et al., 2002) e não encontraram associações significativas dos polimorfismos com o desenvolvimento do CCP.

O polimorfismo *CYP1A1*2A* (rs4646903) caracteriza-se pela troca de uma timina para uma citosina (T→C) (Colombo e Rahal, 2009; Yousef et al., 2012), na posição 3801 (Losi-Guembarovski et al., 2008), que resulta na codificação de uma enzima com atividade aumentada, tem sido associado com o aumento dos níveis de compostos carcinogênicos ativados, o que elevaria o risco de CCP (Tanimotoa et al. 1999; Yu et al., 2014; Singh et al., 2015).

A variante *CYP1A1*2C* (rs1048943), que corresponde à troca da base A pela G, com alteração do aminoácido isoleucina para valina (Colombo e Rahal, 2009; Yousef et al., 2012), produz também uma enzima de atividade aumentada, que tem sido associada ao aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias da cavidade oral e da laringe em populações Asiáticas (Sato et al., 2000; Zeng et al., 2016).

1.3.2 *CYP2D6*

O gene *CYP2D6* apresenta 4.2 kb, distribuídos em nove éxons e oito introns e está localizado no cromossomo 22q13.1 (Sistonen, 2008; Friedrich,

2014). Ele é predominantemente expresso no fígado, no cérebro e no coração e está envolvido na metabolização de diversas substâncias (Bhat e Gandhi, 2018), como, por exemplo, a nitrosamina NNK = 4 - (metilnitrosamina) -1- (3-piridil-1-butanona). Essa substância é considerada uma das nitrosaminas mais carcinogênicas presentes no cigarro e é formada a partir da metabolização da nicotina (Agúndez et al., 2001; Silveira et al., 2009). Além disso, esse gene é considerado um dos principais envolvidos na metabolização de drogas e medicamentos, incluindo os usados nos tratamentos de neoplasias (Bernard et al., 2006).

O *CYP2D6* é um gene altamente polimórfico, tendo mais de 100 variações já descritas pelo *The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database* (<https://www.pharmvar.org/htdocs/archive/cyp2d6.htm>, acesso em: 11/02/2019). Esse grande número de variações se dá por mutações de ponto, duplicações, deleções, rearranjos e principalmente SNPs que podem ocorrer ao longo de sua extensão, podendo resultar na codificação de enzimas com atividade nula, diminuída, normal ou aumentada (Sistonen, 2008). O *CYP2D6* pode ser tratado como um único bloco não recombinante, sendo que cada combinação de polimorfismos localizados em sua sequência resulta em um dos mais de seus 100 haplótipos distintos. A figura 2 demonstra alguns dos haplótipos existentes neste gene e a atividade enzimática resultante em cada uma dessas combinações (Figura 2).

Para determinar a velocidade de metabolização resultante de um indivíduo em relação ao gene *CYP2D6* é preciso analisá-lo com abordagem haplotípica, observando a combinação das atividades enzimáticas dos dois haplótipos de seus cromossomos. Essa combinação resulta em uma de suas quatro classes fenotípicas: metabolizadores lentos ou metabolizadores pobres (PM), metabolizadores intermediários (IM), metabolizadores extensivos (EM) e metabolizadores ultrarrápidos (UM) (Rodriguez-Antona e Ingelman-Sundberg, 2006; Friedrich, 2014). Essa classificação é bem controversa entre os autores e nesse trabalho foi adotada a seguinte definição: os indivíduos com fenótipo PM possuem duas variantes que codificam a enzima sem sua função, ou que sejam deletadas. Os IM apresentam duas variantes que codificam enzimas com função

diminuída ou uma que a codifica sem função ou deletada e a outra com função diminuída. Os indivíduos classificados com o fenótipo EM, tem pelo menos um alelo funcional e os UM tem a duplicação do alelo funcional ou alguma mutação que aumente a atividade enzimática (Sistonen et al., 2007; Sistonen, 2008; Friedrich, 2014).

FONTE: Extraída e modificada de Sistonen et al., 2007.

Figura 2- Polimorfismos do gene *CYP2D6* representados pelos pares de bases alterados e com as atividades enzimáticas resultantes dessas mutações

Dentre os estudos realizados em diferentes países, sabe-se que a frequência dos diferentes fenótipos varia de acordo com a população analisada (Bernard et al., 2006), de maneira geral, o fenótipo mais predominante é o EM, que inclui os indivíduos que possuem pelo menos um alelo com função normal (Sistonen et al., 2007; Agúndez et al., 2001). De acordo com a pesquisa de Friedrich et al., (2014) alguns dos haplótipos mais frequentes na população Brasileira são os *CYP2D6**2, *CYP2D6**4, *CYP2D6**10, *CYP2D6**17 e *CYP2D6**41 (Friedrich, et al., 2014).

Algumas variantes do gene *CYP2D6* já foram relacionadas isoladamente com diferentes tipos de neoplasias, porém de maneira controversa. Haplótipos que possuem polimorfismos que resultam na codificação de enzimas com maior atividade e o fenótipo UM já foram associados com o câncer de pulmão em

indivíduos da população Espanhola (Agúndez et al., 2001). Já a presença da variante *CYP2D6*4* e o fenótipo PM já foram associados com o aumento do risco de desenvolvimento do câncer de laringe em indivíduos da população Polonesa (Gajecka et al., 2005). Estudos realizados por Shukla e colaboradores (2012), encontraram associações entre os haplótipos *CYP2D6*4* e *CYP2D6*10*, os quais resultam na codificação de enzimas com atividade nula ou diminuída, respectivamente, e pacientes com CCP em amostra da população Indiana. Porém tais associações não foram encontradas em amostras de populações não asiáticas (Han et al., 2014). Aparentemente não existem trabalhos na população brasileira que abordam o gene *CYP2D6* em relação ao risco de desenvolvimento do CCP.

1.3.3 *CYP3A4*

O gene *CYP3A4* está localizado no cromossomo 7q21.1 (Yousef et al., 2012), no mesmo *locus* onde se encontra o gene *CYP3A5* e o *CYP3A7*, sendo responsável pela codificação de uma grande variedade de enzimas envolvidas na metabolização de xenobióticos, compostos endógenos e de drogas medicamentosas (Rodriguez-Antona e Ingelman-Sundberg, 2006). Além disso, a enzima codificada por esse gene é responsável pela metabolização das nitroso nornicotinas (NNN), que são nitrosaminas específicas do cigarro (Azarpira et al., 2011). O *CYP3A4* é considerado o maior gene em relação a sua quantidade expressa e em sua importância na metabolização de drogas (Ingelman-Sundberg, 2004). A expressão deste gene é induzida por vários compostos, como, por exemplo, alguns presentes na dieta e agentes terapêuticos (Ingelman-Sundberg, 2004), sendo a enzima expressa predominante no fígado durante a vida adulta com atividade maior do que os outros genes do seu *cluster* (Rodriguez-Antona e Ingelman-Sundberg, 2006). O *CYP3A4* pode variar sua expressão em decorrência da idade, de níveis hormonais, estímulos ambientais, entre outros fatores. (Rodriguez-Antona e Ingelman-Sundberg, 2006). Já foram descritos mais de 40 polimorfismos nesse gene pelo The Human Cytochrome

P450 (CYP) Allele Nomenclature Database (<https://www.pharmvar.org/htdocs/archive/cyp3a4.htm>, acesso em: 11/02/2019), sendo que o mais prevalente e que parece ter maior variabilidade nos níveis de expressão é o *CYP3A4*1B* (rs2740574) que envolve a transição de A>G (Yousef et al., 2012; Monteiro et al., 2016). Esse polimorfismo é frequente nas populações Africanas e aparece em cerca de 5% da população Caucasiana, ele já foi relacionado com o câncer de pulmão, leucemia e câncer de próstata em alguns estudos (Rodriguez-Antona e Ingelman-Sundberg, 2006), porém tais resultados são controversos (Nogal et al., 2007; Voso et al., 2007). Além disso, a função *in vivo* da enzima por ele codificada ainda não é muito bem estabelecida, sendo que estudos *in vitro* identificaram atividade enzimática dobrada em relação ao alelo selvagem (Azarpira, et al., 2011). Até o presente momento parece não haver estudos sistemáticos que relacionem esse polimorfismo com o CCP, uma vez que apenas um grupo avaliou a associação desse SNP em um estudo caso-controle de pacientes com câncer de laringe na população Iraniana, não encontrando associações significantes (Azarpira et al., 2011).

1.4 Genes codificadores de receptores nicotínicos

A nicotina quando age diretamente no organismo, sem ser antes metabolizada, liga-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina (colinérgicos) – nAChRs - que estão distribuídos pelo sistema nervoso central, periférico (Anantharaman, 2014), em células musculares, endoteliais e do sistema imunológico (Siqueira, 2017). Esses receptores são canais iônicos dependentes de ligante e são constituídos por cinco subunidades ao redor de um poro central. Essas subunidades podem ser formadas por 12 diferentes isoformas, sendo que nove são chamadas de α subunidades e três de β subunidades, cada uma delas sendo codificada por um gene da família dos *CHRN*. A união de diferentes subunidades presentes em um receptor confere a ele propriedades farmacológicas e respostas distintas (Siqueira, 2017). Os receptores respondem a acetilcolina, a nicotina e seus agonistas equando uma dessas substâncias se liga a um receptor, desencadeia a mudança na conformação da membrana

celular, tornando o poro permeável a cátions (sódio e/ou cálcio), os quais vão provocar a excitação da célula, mediando as transmissões sinápticas (Changeux, 2010; Vanskike et al., 2016). Dessa forma, quando os receptores nicotínicos estão localizados em neurônios pré-sinápticos, podem modular a liberação de alguns neurotransmissores, como por exemplo, o GABA, a dopamina, a acetilcolina e o glutamato (Wen et al., 2016).

A exposição contínua a nicotina causa um aumento no número dos nAChRs, o que ocorre provavelmente, em resposta a dessensibilização dos mesmos (Siqueira, 2017). Estudos demonstram que indivíduos fumantes apresentam cerca de 90% dos seus receptores ligados a nicotina e quando esse número diminui, eles passam a sentir a necessidade do consumo (Wen et al., 2016; Herman et al., 2014; Vanskike et al., 2016). Uma vez que a exposição repetida a nicotina dessensibiliza os receptores e aumenta o número de nAChRs, os indivíduos fumantes precisam consumir maior número de cigarros para que a mesma porcentagem de receptores permaneça ligada a nicotina e para que eles tenham a mesma resposta ocasionada por seu consumo (Changeux, 2010; Vanskike et al., 2016; Siqueira, 2017). Um dos neurotransmissores que a nicotina aumenta o nível de liberação é a dopamina, a qual está relacionada com o sistema de recompensa e prazer, o que explica a necessidade do aumento de consumo de cigarros (Siqueira, 2017). Dessa forma, o indivíduo pode tornar-se um “fumante intenso/pesado” (“heavy smoking”), classificação essa que considera as pessoas que fumam 20 ou mais cigarros por dia, ou seja mais de um maço por dia (Saconne et al., 2010; Almeida et al., 2014).

Na região do cromossomo 15q existe um cluster de 3 genes, chamado de *CHRNA5/A3/B4*, que codificam as subunidades, $\alpha 5$, $\alpha 3$ e $\beta 4$, respectivamente. Essa região tem sido estudada em diferentes populações, e foram encontrados dois polimorfismos principais (rs16969968 e rs578776) que têm sido relacionados com a quantidade de cigarros consumidos, com a dependência do cigarro e/ou com o desenvolvimento de algumas neoplasias, como, por exemplo, a de pulmão e o CCP, porém os resultados encontrados ainda são controversos (Stevens et al., 2008; Changeux, 2010; Lips, et al., 2010; Anantharaman et al., 2014; Wen et al., 2016).

1.4.1 *CHRNA5*

O primeiro polimorfismo desta região refere-se ao SNP presente no gene *CHRNA5* (rs16969968) decorrente de uma troca do aminoácido ácido aspártico, codificado pelo alelo G, para asparagina, codificada pelo alelo A, na posição 398 da proteína (Bierut et al., 2008). O alelo polimórfico deste gene já foi associado com o aumento do risco de desenvolvimento do câncer do trato aero digestivo superior (cavidade oral, laringe, faringe) em amostras provenientes da América Latina e Europa (Lips et al., 2010; Chen et al., 2011) e também com aumento do risco de desenvolvimento do câncer de pulmão em pessoas com ancestralidade Européia e Caucasiana (Munafò et al., 2012; Fowler et al., 2014; Wen et al., 2016; Xu et al., 2015). Outras doenças que parecem ter associação com a variante são doença arterial periférica e a pulmonar crônica obstrutiva (Lips et al., 2010; Chen et al., 2011).

Além disso, outros estudos revelaram associação do polimorfismo com o aumento do consumo de tabaco (Lips et al., 2010; Munafó et al., 2012; Pérez-Morales et al., 2018). E que o *CHRNA5* é considerado o principal polimorfismo associado com o aumento da dependência da nicotina (Bierut et al., 2008; Saccone et al., 2009), sendo que a presença de seus dois alelos polimórficos podem aumentar cerca de duas vezes o risco dessa dependência (Wen et al., 2016). Porém nem todos estudos que envolvem a variante encontram tais resultados e ela ainda é pouco explorada na população Brasileira em relação ao CCP.

1.4.2 *CHRNA3*

Outro SNP do *cluster CHRNA5/CHRNA3/CHRNA4* estudado é o do *CHRNA3* (rs578776), que ocorre na região 3' UTR, com a mudança de uma base C para uma T (Stevens et al., 2008; Wen et al., 2016). A presença do alelo

polimórfico tem sido associado com a menor susceptibilidade de desenvolvimento da neoplasia da cavidade oral em indivíduos da população Indiana (Anantharaman et al., 2014) e do câncer de pulmão em uma metanálise feita por Qu et al., (2016).

A presença do alelo T pode também influenciar a quantidade de cigarros consumidos, pois ele pode estar relacionado com o déficit do efeito de recompensa do consumo de tabaco e portanto já foi associado com a diminuição da quantidade de cigarros consumidos (Qu et al., 2016). O alelo polimórfico também já apresentou efeito protetivo em relação ao desenvolvimento da dependência da nicotina em estudos com indivíduos de ancestralidade Européia-Americana (Stevens et al., 2008; Saccone et al., 2009). Entretanto, os resultados ainda são contraditórios, uma vez que alguns estudos não encontraram relações significativas entre a presença da variante com o desenvolvimento de neoplasias ou com a intensidade do consumo de cigarros (Bierut et al., 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Uma vez que polimorfismos presentes em genes envolvidos na metabolização do cigarro e também em genes relacionados com a ação direta da nicotina podem influenciar o risco de desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço foram escolhidos dez polimorfismos (oito envolvidos na primeira fase da metabolização de compostos do cigarro e dois envolvidos com a metabolização de subunidades dos receptores nicotínicos) para análise em indivíduos da população brasileira com o objetivo de observamos o comportamento de tais variantes dentro do grupo amostral, uma vez que os estudos dessas ainda são escassos e muitas vezes contraditórios entre as populações estudadas. Além disso, sabe-se que nem todo indivíduo que se expõe aos fatores de risco da doença vão desenvolvê-la, porque apresentam composições genéticas que fazem com que seus corpos reajam de maneiras distintas frente à exposição a tais compostos, e compreender o comportamento dessas variantes genéticas na nossa população pode ajudar no encaminhamento de pacientes a diferentes tratamentos e programas relacionados ao consumo do tabaco e de bebidas alcoólicas.

3. OBJETIVOS

Avaliar a contribuição de oito polimorfismos em genes da fase I associados com a metabolização de compostos presentes no cigarro (*CYP1A1* - rs4646903 e rs1048943; *CYP2D6* - rs1080985, rs3892097, rs1065852, rs28371706 e rs28371725 e *CYP3A4*- rs2740574) no risco de desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço.

Avaliar a contribuição dos haplótipos do gene *CYP2D6* e suas variantes fenotípicas no risco de desenvolvimento do CCP.

Avaliar a contribuição de dois polimorfismos nos genes codificadores de receptores nicotínicos (*CHRNA3* - rs578776 e *CHRNA5* - rs16969968) no risco de desenvolvimento do CCP e na intensidade do consumo de cigarros.

4. MÉTODOS

4.1 Casuística

O presente estudo caso-controle, retrospectivo, não randomizado está vinculado ao Projeto de Pesquisa Regular FAPESP (Processo: 2014/16092-4), intitulado “Os Polimorfismos Genéticos podem contribuir na prevenção e tratamento do câncer de cabeça e pescoço?”, sob coordenação da Professora Doutora Gilka Jorge Fígaro Gattás.

Os participantes da pesquisa foram constituídos por 619 indivíduos, de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos com diagnóstico histopatológico de carcinoma de células escamosas na região da cabeça e pescoço confirmado (cavidade oral, laringe, orofaringe, hipofaringe, nasofaringe e cavidade nasossinusal), atendidos pelo Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis do Estado de São Paulo, no período entre Outubro de 2000 e Julho de 2011.

E por 448 indivíduos, sem o diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço, formando o grupo controle, que foram recrutados de diferentes clínicas (cirurgia geral, cirurgia vascular, neurocirurgia, neurologia, clínica médica, gastroenterologia, ortopedia, endocrinologia, dermatologia e emergência) do mesmo hospital e dentro do mesmo período de tempo e pareados aos casos dentro de uma mesma faixa etária (± 5 anos). O grupo controle incluía apenas indivíduos recentemente diagnosticados com doenças que não tinham relação com o consumo de álcool e/ou tabaco, como por exemplo, distúrbios, lesões ou doenças do sistema digestivo, lesões e doenças do sistema musculoesquelético, do sistema genitourinário, sistema circulatório e no tecido conjuntivo. Os pacientes que possuíam doenças relacionadas com o consumo destas substâncias foram excluídos deste grupo.

Todos os sujeitos de pesquisa (grupos de caso e controle) assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A), aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pelo comitê

de ética do Hospital Heliópolis (Anexo B), e responderam individualmente a um questionário padronizado (Anexo C) com dados sociodemográficos pessoais (idade, sexo, nome, endereço, cor de pele) e dados familiares (histórico de doenças, tratamentos, parentesco). Dados relacionados ao histórico clínico dos pacientes com tumor (sintomas, sítios de lesão, tratamento, estadiamento da doença, acompanhamento clínico e informações de óbito) foram obtidos por meio dos prontuários desses indivíduos.

Informações referentes ao consumo de bebidas alcoólicas e de cigarros também foram respondidas nos questionários individuais (idade de início, padrão de consumo, tempo de uso e abstinência).

Os hábitos de consumo de álcool e tabaco foram classificados da seguinte forma: indivíduos que declararam nunca beber/fumar foram classificados como “nunca bebeu e/ou nunca fumou”. Os indivíduos que pararam de beber ou de fumar a pelo menos 12 meses foram classificados como indivíduos que “beberam/fumaram somente no passado” e aqueles que tinham parado a menos tempo ou que ainda consumiam no momento da entrevista, foram classificados dentro do grupo de indivíduos que “ainda bebem/fumam”. Depois dessa classificação, informações sobre o consumo foram obtidas daqueles que responderam consumir ou ter consumido tabaco e/ou álcool. Essas informações incluíam dados de idade de início do consumo, tempo de uso e de abstinência, tipo de substância utilizada e quantidade consumida.

O padrão de consumo de cigarros foi estabelecido em cigarros/dia de acordo com as declarações dos participantes e em seguida categorizado em indivíduos que fumavam até 20 cigarros e indivíduos que fumavam 20 ou mais cigarros/dia, que são considerados fumantes pesados/intensos. Além disso, foi possível estabelecer o consumo em maços/ano utilizando a seguinte fórmula: número de cigarros/dia multiplicado pelos anos que o indivíduo consumiu a substância e o valor resultante é dividido por 20 (número de cigarros em um maço). Para essa categoria, os indivíduos foram divididos em dois grupos: consumiam de 1-20 maços/ano; consumiam ≥ 20 maços/ano.

4.2 Metodologia de coleta do material e análise dos polimorfismos

Todos os participantes do estudo cederam 5mL de amostra de sangue periférico, que foram coletados em tubos contendo EDTA. O DNA destas amostras foi extraído pelo método de *Salting-out*, seguindo o protocolo de Miller, et al., (1988), quantificados no NanoDrop, diluídos em soluções de trabalho de 20ng/μL e posteriormente armazenados em freezer -80°, cada um com sua identificação numérica. Foi montada uma tabela com os números de identificação das amostras, sem distinção daqueles que eram classificados como caso e controle. Somente no final das análises dos polimorfismos é que foram identificadas quais amostras pertenciam a cada grupo.

Os genes estudados foram escolhidos devido a participação na metabolização de compostos presentes no cigarro e também por constituírem receptores nicotínicos. Os genes analisados apresentavam polimorfismos do tipo SNP e foram os seguintes: oito variantes relacionadas com o processo de biotransformação denominados *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C*, *CYP2D6*2*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*10*, *CYP2D6*17* e *CYP2D6*41* e duas variantes envolvidas na formação dos receptores nicotínicos - *CHRNA5* e *CHRNA3*.

O primeiro polimorfismo estudado é chamado de *CYP1A1*2A* (rs4646903) que possui a troca de uma base T>C. Ele foi analisado por meio da técnica PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms*) segundo o protocolo de Hayashi, et al. (1991). Os primers utilizados foram: (5' – 3') CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT e (3' – 5') TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT e para que o DNA das amostras fosse amplificado, foi iniciado no termociclador o processo de desnaturação do mesmo em 95°C por 1 minuto, seguido do processo de anelamento dos primers com 65°C por 1 minuto e 72°C por um minuto para a extensão dos fragmentos. Esta sequência foi repetida por 30 ciclos e os produtos obtidos foram digeridos pela enzima *MspI* e posteriormente analisados em gel de agarose. Os tamanhos dos fragmentos que poderiam ser observados no gel foram de 340pb para o genótipo TT, o qual não teve restrições, um fragmento de 140pb e outro de 200pb para o

genótipo CC, indicando a restrição pela enzima nos dois alelos e para o genótipo TC um fragmento de 340pb, um de 140pb e um de 200pb, indicando a fragmentação em um dos alelos (C).

Para a análise da presença do polimorfismo *CYP1A1*2C* (rs1048943) foi utilizada a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) com uso de ensaios TaqMan® SNP genotyping, com sondas marcadas com corantes fluorescentes (VIC/FAM), na plataforma de instrumentação *Step One Plus*™ (*Applied Biosystem*). A mesma técnica foi utilizada para o estudo dos polimorfismos *CYP2D6*2* (rs1080985), *CYP2D6*4* (rs3892097), *CYP2D6*10* (rs1065852), *CYP2D6*17* (rs28371706), *CYP2D6*41* (rs28371725), *CYP3A4*1B* (rs2740574), *CHRNA3* (rs578776) e *CHRNA5* (rs16969968) sendo que os números dos ensaios usados para essas análises encontram-se descritos no Quadro 1.

Para cada reação foi utilizado 5,0 µL de *TaqMan Universal Master Mix* (*Life Technologies*, EUA), 0,5 µL de ensaio (com as sondas e primers – concentração 20X) ou 0,25 µL (concentração 40X), 1 µL de DNA e água totalizando o volume final de 10 µL. A reação foi submetida a protocolo de ciclos, seguindo as orientações do fabricante: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e para finalizar, a extensão 3 minutos a 60°C. Em todas as placas analisadas foram incluídas controles positivos e negativos para garantir que não houvesse contaminação nas reações.

Para a análise do gene *CYP2D6* foram selecionados cinco SNPs (rs1080985, rs3892097, rs1065852, rs28371706 e rs28371725) que permitiam a definição de cinco diferentes haplótipos (*CYP2D6*2*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*10*, *CYP2D6*17* e *CYP2D6*41*). As cinco trocas de base única escolhidas para estudo estão marcadas na Figura 3 com diferentes cores e a genotipagem dos polimorfismos foi realizada por qPCR utilizando-se ensaios TaqMan SNP, descritos no Quadro 1.

Quadro 1 – Polimorfismos analisados no presente estudo pela técnica de qPCR, seus SNPs, transição de base e os respectivos ensaios usados para sua identificação

Polimorfismos	Referência SNP	Transição	Ensaio
<i>CYP1A1*2C</i>	rs1048943	A>G	C_25624888_50
<i>CYP2D6*2</i>	rs1080985	C>G	C_32407252_30
<i>CYP2D6*4</i>	rs3892097	G>A	C_27102431_D0
<i>CYP2D6*10</i>	rs1065852	C>T	C_11484460_40
<i>CYP2D6*17</i>	rs28371706	C>T	C_2222771_A0
<i>CYP2D6*41</i>	rs28371725	G>A	C_34816116_20
<i>CYP3A4*1B</i>	rs2740574	A>G	C_1837671_50
<i>CHRNA3</i>	rs578776	C>T	C_721253_10
<i>CHRNA5</i>	rs16969968	G>A	C_26000428_20

Haplótipo	Posição do nucleotídeo no gene <i>CYP2D6</i>					Atividade enzimática
	-1584	100	1023	1846	2988	
<i>CYP2D6*1</i>	C	C	C	G	G	Normal
<i>CYP2D6*2</i> (rs1080985)	G	C	C	G	G	Normal
<i>CYP2D6*4</i> (rs3892097)	C	T	C	A	G	Nula
<i>CYP2D6*10</i> (rs1065852)	C	T	C	G	G	Diminuída
<i>CYP2D6*17</i> (rs28371706)	C	C	T	G	G	Diminuída
<i>CYP2D6*41</i> (rs28371725)	C	C	C	G	A	Diminuída

Figura 3 – Descrição dos cinco haplótipos selecionados do gene *CYP2D6* para análise com destaque para as trocas de base e atividades enzimáticas resultantes
 FONTE: Extraída e modificada de Sistonen et al., 2007

Para o gene *CYP2D6*, após a análise separada dos cinco polimorfismos estudados e o risco de desenvolvimento do CCP e dos diferentes sítios tumorais, foi realizada também a análise das frequências das combinações haplotípicas

do gene nos grupos de caso e controle. Posteriormente, o genótipo dos indivíduos em relação a seus dois haplótipos possibilitou a classificação de seus fenótipos. Sendo que um mesmo fenótipo de metabolização pode ser resultante de diferentes combinações de haplótipos. Os indivíduos foram classificados de acordo com a combinação das atividades enzimáticas de cada um de seus haplótipos, como demonstrado no Quadro 2.

Quadro 2 – Descrição das classes fenotípicas segundo os haplótipos do gene *CYP2D6*

Classes Fenotípicas	Combinação das atividades enzimáticas dos haplótipos
Metabolizador Ultrarrápido	Duplicação de haplótipos que codificam enzima com atividade normal
Metabolizador Extensivo	Haplótipo que codifique enzima com atividade normal e outro com qualquer atividade resultante
Metabolizador Intermediário	Dois haplótipos que codifiquem enzimas com atividade diminuída ou um que codifique com atividade diminuída e outro sem atividade
Metabolizador Lento	Dois haplótipos que codifiquem enzimas sem atividade

FONTE: Extraído e modificado de Rodriguez-Antona e Ingelman-Sundberg, 2006; Friedrich, 2014.

4.3 Análise estatística

Os resultados provenientes das análises dos polimorfismos foram inseridos em um banco de dados contendo informações sociodemográficas dos sujeitos de pesquisa, como a idade, escolaridade, sexo e cor da pele, além dos dados relacionados aos hábitos de consumo do álcool e do cigarro, dados referentes aos históricos clínicos e anátomo-patológicos proveniente de prontuários dos indivíduos da pesquisa. Foi realizado o teste do Qui-Quadrado em programa SPSS (versão 20) para verificar se as variáveis sociodemográficas (sexo, idade, cor de pele, nível de escolaridade) e os hábitos de consumo (etilismo e tabagismo) diferiam entre o grupo de casos e controles. Sendo que

as variáveis independentemente associadas ($p < 0,05$) foram incluídas como covariáveis de ajuste nos modelos multivariados de predição.

O teste do Qui-quadrado também foi utilizado para calcular se as frequências genótípicas e alélicas de todos polimorfismos estudados (*CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C*, *CYP2D6*2*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*10*, *CYP2D6*17*, *CYP2D6*41*, *CYP3A4*1B*, *CHRNA3* e *CHRNA5*) encontravam-se em Equilíbrio de Hardy Weimberg e para verificar se a distribuição dos genótipos para cada polimorfismo diferia entre o grupo de casos e controle.

Foram estimados valores de Odds Ratio (OR, razão de chances) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%, $p < 0,05$) para as possíveis associações entre os polimorfismos avaliados e o risco de desenvolvimento da neoplasia, utilizando-se o teste de regressão logística multivariada, ajustada para as variáveis sociodemográficas (sexo, idade, cor da pele e escolaridade) e os hábitos de beber e fumar para os pacientes com CCP. Posteriormente esses pacientes foram separados em três grupos de acordo com seus sítios tumorais (cavidade oral, laringe e orofaringe) e as estimativas dos valores de Odds Ratio também foram calculadas. O genótipo homozigoto selvagem foi considerado como referência nas análises utilizando os Modelos de Genótipo e Dominante. Valores de $OR > 1$ indicam risco aumentado em apresentar o fenótipo e valores $OR < 1$ indicam proteção em relação ao fenótipo avaliado.

Para a análise das variantes *CHRNA5* e *CHRNA3* em relação a intensidade de consumo de cigarros, foram considerados todos os participantes dessa pesquisa que possuíam o hábito tabagista, tanto aqueles que declararam terem consumido cigarros somente no passado, quanto aqueles que continuaram o consumo até o momento da entrevista, independentemente da presença da neoplasia. Esses indivíduos foram divididos em dois grupos: o primeiro deles foi constituído por participantes que fumavam até 20 cigarros/dia e o segundo grupo foi composto por participantes que fumavam 20 ou mais cigarros/dia. Sendo que os indivíduos que declararam que nunca fumaram não entraram nessa análise. E os mesmos cálculos estatísticos descritos anteriormente foram utilizados para a análise da intensidade do consumo de cigarros em relação a presença dos polimorfismos *CHRNA5* e *CHRNA3*. Sendo

que esses últimos resultados já foram publicados na revista *Molecular Genetics & Genomic Medicine*: “Polymorphisms of *CHRNA3* and *CHNRA5*: Head and neck cancer and cigarette consumption intensity in a Brazilian population”, como pode ser observado no Anexo D do trabalho.

5. RESULTADOS

O grupo de pesquisados do presente estudo foi constituído de 619 indivíduos com diagnóstico histopatológico de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e 448 indivíduos sem o diagnóstico da doença. Quanto à localização do tumor, verificou-se que 235 (38%) indivíduos apresentavam-no na cavidade oral, 149 (24%) na laringe, 148 (24%) na orofaringe, 64 (10,3%) na região da hipofaringe e os 23 (3,7%) que foram classificados como “outros” (nasossinusal, nasofaringe, tegumento, etc). O grupo de indivíduos que apresentaram o tumor na cavidade oral, laringe e orofaringe também foram analisados separadamente, pois foram os três sítios tumorais com maior número de indivíduos que apresentavam poder estatístico de análise.

A distribuição das variáveis sexo, cor de pele, faixa etária e nível de escolaridade dos indivíduos do grupo de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e dos controles está descrita na Tabela 1. Embora os grupos tenham sido semelhantes quanto a essas características, verificou-se o risco 1,7 vezes maior de desenvolvimento do CCP nos indivíduos do sexo masculino (OR=1,72; IC 95%, 1,19 - 2,48), enquanto os participantes que se autodeclararam com cor de pele “não branca” apresentaram menor risco de desenvolvimento da doença (OR= 0,67, IC 95%, 0,52 – 0,86), sendo que na presente amostra não haviam representantes da população Asiática. A análise também indicou que os indivíduos com mais de 50 anos de idade apresentaram risco aumentado de desenvolvimento da neoplasia estudada (OR= 1,45; IC 95%, 1,13 – 1,87), bem como os participantes da pesquisa com escolaridade de 0 a 8 anos que apresentaram o risco elevado em 1,72 vezes e os com escolaridade de 8 a 11 anos que tiveram o aumento do risco em 1,70 vezes (Tabela 1). As variáveis sociodemográficas (sexo, cor da pele, idade e nível de escolaridade) também foram analisadas em relação aos sítios tumorais da cavidade oral, laringe e orofaringe (Anexo E).

Os indivíduos da pesquisa que relataram ainda consumir bebidas alcoólicas no momento em que foram entrevistados revelaram 1,9 vezes mais probabilidade de desenvolverem a doença quando comparados aos que nunca consumiram tais substâncias (OR=1,91; IC 95%, 1,37 – 2,65). E os participantes que declararam que pararam de consumir bebidas alcoólicas revelaram aumento do risco de desenvolvimento da doença (OR= 1,52; IC 95%, 1,08 – 2,16), porém esse risco foi menor quando comparado com os indivíduos que permaneceram com o consumo (Tabela 2).

Os participantes que declararam fumar somente no passado apresentaram risco praticamente 3,5 vezes maior de desenvolver a doença (OR=3,48; IC 95%, 2,18-5,51) quando comparados aos não fumantes. E os indivíduos da pesquisa que continuaram com o consumo até o momento das entrevistas apresentaram risco 9 vezes maior (OR=8,97; IC 95%, 5,90-13,67) em relação aos que nunca fumaram (Tabela 2).

Tabela 1 – Comparação das variáveis sociodemográficas entre os grupos de caso e controle

Variáveis	Categorias	CCP		Controle		OR	p	95%IC	
		N	%	N	%				
Sexo	Feminino	61	9,9	71	15,8	1	-	-	-
	Masculino	557	90,1	377	84,2	1,72	0,004**	1,19	2,48
	Total	618*	100	448	100				
Cor de Pele	Branco	417	67,7	258	58,4	1	-	-	-
	Não branco	199	32,3	184	41,6	0,67	0,002**	0,52	0,86
	Total	616*	100	442*	100				
Idade (anos)	≤50	201	32,5	184	41,2	1	-	-	-
	>50	418	67,5	263	58,8	1,45	0,004**	1,13	1,87
	Total	619	100	447*	100				
Escolaridade	>11 anos	54	8,7	60	14,1	1	-	-	-
	8 a 11 anos	159	25,7	104	24,2	1,70	0,02**	1,10	2,64
	0 a 8 anos	405	65,5	262	61,5	1,72	0,009**	1,16	2,56
	Total	618*	100	426*	100				

*Os números totais são discrepantes em algumas variáveis por falta de informações nos questionários aplicados.

**p<0,05

Quando foi realizada a análise do consumo do cigarro dividindo-se a amostra pelos sítios tumorais cavidade oral, laringe e orofaringe, foi observado aumento do risco de desenvolvimento da doença para todas as regiões analisadas nos indivíduos que declararam terem cessado o consumo do cigarro

no momento da entrevista, conforme Tabela 3. Os pacientes que declararam que continuaram o consumo de cigarros até o momento da entrevista revelaram maiores riscos para o desenvolvimento dos tipos de cânceres, sendo o aumento de 7,65 vezes para a neoplasia da cavidade oral, 7,85 vezes para o câncer de laringe e 17,76 vezes para tumores na região da orofaringe. Em relação a intensidade do consumo de cigarros, pode-se observar que o uso dessa substância esteve associado ao risco aumentado de desenvolvimento das neoplasias dos três sítios tumorais, com excessão da região da laringe, na qual os indivíduos que declararam fumar até 20 cigarros por dia não apresentaram associação estatisticamente significante, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 2 – Comparação dos hábitos de consumo de álcool e cigarro e intensidade do consumo de cigarros entre os grupos casos e controles

	Categorias	CCP		Controle		OR	p	95%IC	
		N	%	N	%				
Etilismo	Nunca bebeu	95	15,4	107	24	1	-	-	-
	Só no passado	207	33,7	153	34,4	1,52	0,017**	1,08	2,16
	Ainda bebe	313	50,9	185	41,6	1,91	<0,001**	1,37	2,65
	Total	615*	100	445*	100				
Tabagismo	Nunca fumou	31	5,0	119	26,7	1	-	-	-
	Só no passado	112	18,2	124	27,9	3,48	<0,001**	2,18	5,51
	Ainda fuma	472	76,8	202	45,4	8,97	<0,001**	5,90	13,67
	Total	615*	100	445*	100				
Intensidade de consumo (cigarro)	0	31	5,1	119	27,0	1	-	-	-
	Até 20 cig/dia	86	14,0	140	31,7	2,36	0,0004**	1,46	3,80
	≥20 cig/dia	496	80,9	182	41,3	10,24	<0,0001**	6,72	15,64
	Total	613	100	441	100				

*Os números totais são discrepantes em algumas variáveis por falta de informações nos questionários aplicados

**p<0,05

Tabela 3 – Comparação do hábito de consumo do cigarro entre os grupos de indivíduos com a neoplasia de cavidade oral (235 – 38%), laringe (149 – 24%) e orofaringe (148 – 24%) em relação ao grupo controle e intensidade do consumo de cigarros

Substância consumida	Categorias	Câncer cavidade oral		OR (IC 95%)	Câncer laringe		OR (IC 95%)	Câncer orofaringe		OR (IC 95%)	Controle	
		N	%		N	%		N	%		N	%
Cigarro	Nunca fumou	14	6,0	1	8	5,4	1	4	2,8	1	119	26,7
	Só no passado	40	17,0	2,72(1,41-5,25)	35	23,5	4,17(1,86-9,34)	20	13,9	4,76 (1,58-14,34)	124	27,9
	Ainda fuma	181	77,0	7,65(4,25-13,80)	106	71,1	7,85(3,69-16,67)	120	83,3	17,76(6,39-49,34)	202	45,4
	Total	235	100		149	100		144*	100		445*	100
Intensidade de consumo (cigarro)	0	14	6,0	1	8	5,4	1	4	2,8	1	119	26,7
	Até 20 cig/dia	35	15,0	2,40(1,26-4,66)	18	12,1	2,15(0,88-4,90)	21	14,6	5,03(1,74-13,87)	124	27,9
	≥20 cig/dia	185	79,0	7,78(4,40-14,4)	123	82,5	9,05(4,36-18,88)	119	82,6	17,53(6,59-45,47)	202	45,4
	Total	234*	100		149	100		144*	100		445*	100

*Os números totais são discrepantes em algumas variáveis por falta de informações nos questionários.

Na análise de todos os polimorfismos genéticos nem sempre foi possível completar o número de indivíduos propostos. Isso se deu principalmente por motivos técnicos (não genotipagem ou término de amostra). A análise dos polimorfismos *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C* e *CYP3A4*1* presentes em genes envolvidos na metabolização do cigarro não revelaram variações estatisticamente significantes entre os grupos analisados (caso e controle) (Tabela 4), tanto considerando os 619 indivíduos com o CCP quanto para a análise nos sítios tumorais individualmente (cavidade oral, laringe e orofaringe – Tabela 5).

Tabela 4 – Distribuição das frequência genotípicas no grupo de casos e controles para os polimorfismos *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C* e *CYP3A4*1B* (modelo de genótipos e modelo dominante)

Polimorfismo	Genótipo	CCP		Controle		OR	p	95%IC	
		N	%	N	%				
<i>CYP1A1*2^a</i>	TT	387	62,9	294	65,6	1	-	-	-
	TC	205	33,3	145	32,4	1,022	0,885	0,76	1,37
	CC	23	3,7	9	2,0	1,268	0,574	0,56	2,90
	TC+CC	228	37,0	154	34,4	1,04	0,79	0,78	1,38
	Total	615*	100	448	100				
<i>CYP1A1*2C</i>	AA	489	79,4	351	78,3	1	-	-	-
	AG	116	18,8	90	20,1	0,914	0,610	0,65	1,29
	GG	11	1,8	7	1,6	0,664	0,422	0,24	1,80
	AG+GG	127	20,6	97	21,7	0,89	0,49	0,64	1,24
	Total	616*	100	448	100				
<i>CYP3A4*1B</i>	AA	408	66,8	297	66,6	1	-	-	-
	AG	178	29,1	121	27,1	1,23	0,199	0,90	1,69
	GG	25	4,1	28	6,3	0,845	0,618	0,44	1,64
	AG+GG	203	33,2	149	32,4	1,17	0,30	0,87	1,59
	Total	611*	100	446*	100				

*Números totais discrepantes por motivos técnicos.

Modelos de regressão logística binária ajustados para as variáveis: sexo, idade, cor de pele, nível de escolaridade, hábito etilista e tabagista.

Tabela 5 - Distribuição dos genótipos para os polimorfismos *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C* e *CYP3A4*1B* nos grupos de pacientes com câncer na cavidade oral (235 - 38%), laringe (149 - 24%), orofaringe (148 - 24%) e controle. Modelo de genótipos e modelo dominante

Polimorfismo	Genótipo	Câncer cavidade oral		OR (IC 95%)	Câncer laringe		OR (IC 95%)	Câncer orofaringe		OR (IC 95%)	Controle	
		N	%		N	%		N	%		N	%
<i>CYP1A1*2A</i>	TT	143	61,1	1	96	64,9	1	96	65,8	1	294	65,6
	TC	80	34,2	1,17 (0,80-1,69)	48	32,4	1,02 (0,66-1,58)	43	29,5	0,82 (0,52-1,30)	145	32,4
	CC	11	4,7	2,0 (0,77-5,23)	4	2,7	0,84 (0,23-3,00)	7	4,8	1,47 (0,49-4,44)	9	2,0
	TC+CC	91	38,9	1,23 (0,86-1,76)	52	35,1	1,00 (0,66-1,54)	50	34,3	0,87 (0,56-1,36)	154	34,4
	Total	234*	100		148*	100		146*	100		448	100
<i>CYP1A1*2C</i>	AA	177	75,3	1	126	85,1	1	120	82,2	1	351	78,3
	AG	52	22,1	1,21 (0,79-1,85)	21	14,2	0,64 (0,37-1,11)	22	15,1	0,68 (0,39-1,19)	90	20,1
	GG	6	2,6	1,06 (0,33-3,38)	1	0,7	0,25 (0,03-2,16)	4	2,7	0,96 (0,25-3,66)	7	1,6
	AG+GG	58	24,7	1,19 (0,79-1,80)	22	14,9	0,60 (0,35-1,03)	26	17,8	0,71 (0,42-1,20)	97	21,7
	Total	235	100		148*	100		146*	100		448	100
<i>CYP3A4*1B</i>	AA	152	65,2	1	96	66,2	1	104	71,2	1	297	66,6
	AG	71	30,5	1,32 (0,89-1,98)	44	30,3	0,40 (0,87-2,23)	34	23,3	0,90 (0,54-1,49)	121	27,1
	GG	10	4,3	0,83 (0,35-1,99)	5	3,4	0,85 (0,29-2,51)	8	5,5	1,00 (0,38-2,61)	28	6,3
	AG+GG	81	34,8	1,25 (0,85-1,84)	49	33,7	1,32 (0,84-2,08)	42	28,8	0,91 (0,56-1,48)	149	33,4
	Total	233*	100		145*	100		146*	100		446*	100

*Números totais discrepantes por motivos técnicos. Modelos de regressão logística binária ajustados para as variáveis: sexo, idade, cor de pele, nível de escolaridade, hábito etilista e tabagista.

Para o gene *CYP2D6*, as frequências dos cinco SNPs estudados encontram-se descritas na Tabela 6. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quando essas foram comparadas entre o grupo de CCP e controle (Tabela 6). E também na análise dos sítios tumorais separadamente (Tabela 7).

Após a avaliação individual dos SNPs do gene *CYP2D6*, foi possível analisar também a relação entre as combinações haplotípicas do gene (Figura 3) e o risco de desenvolvimento do CCP (Tabela 8) e das neoplasias da cavidade oral, laringe e orofaringe (Tabela 9). As frequências dos haplótipos não revelaram diferenças estatisticamente significantes quando suas distribuições foram comparadas entre os grupos de casos e controles.

Tabela 6 – Distribuição das frequências genotípicas no grupo de casos e controles para as variantes estudadas do gene *CYP2D6* (modelo de genótipos e modelo dominante)

Polimorfismo	Genótipo	CCP		Controle		OR	p	95%IC
		N	%	N	%			
<i>CYP2D6*2</i>	CC	369	60,4	267	60,1			
	CG	205	33,6	142	32,0	1,04	0,74	0,80 – 1,37
	GG	37	6,0	35	7,9	0,76	0,31	0,47 – 1,23
	CG+GG	242	39,6	177	39,9	0,98	0,995	0,77 – 1,27
	Total	611*	100	444*	100			
<i>CYP2D6*4</i>	GG	463	75,5	327	73,3			
	GA	131	21,4	101	22,7	0,91	0,60	0,68 – 1,24
	AA	19	3,1	18	4,0	0,74	0,40	0,39 – 1,43
	GA + AA	150	24,5	119	26,7	0,89	0,43	0,67 – 1,17
	Total	613*	100	446*	100			
<i>CYP2D6*10</i>	CC	451	73,3	315	70,4			
	CT	140	22,8	106	24,9	0,88	0,38	0,66 – 1,17
	TT	24	3,9	21	4,7	0,79	0,53	0,44 – 1,44
	CT + TT	164	26,7	127	29,6	0,90	0,48	0,69 – 1,19
	Total	615*	100	442*	100			
<i>CYP2D6*17</i>	CC	564	92,4	401	90,5			
	CT	43	7,1	40	9,0	0,76	0,25	0,49 – 1,21
	TT	3	0,5	2	0,45	1,27	>0,99	0,22 – 6,04
	CT + TT	46	7,6	42	9,45	0,78	0,26	0,51 – 1,20
	Total	610*	100	443*	100			
<i>CYP2D6*41</i>	GG	520	85,4	389	88,0			
	GA	81	13,3	50	11,3	1,21	0,34	0,83 – 1,78
	GG	8	1,3	3	0,7	1,99	0,37	0,60 – 7,00
	GA+GG	89	14,6	53	12,0	1,26	0,23	0,87 – 1,80
	Total	609*	100	442*	100			

*Números totais discrepantes por motivos técnicos.

Modelos de regressão logística binária ajustados para as variáveis: sexo, idade, cor de pele, nível de escolaridade, hábito etilista e tabagista.

Tabela 7 – Distribuição das frequências dos polimorfismos do gene *CYP2D6* nos grupos de pacientes com câncer de cavidade oral (235 - 38%), laringe (149 - 24%) e orofaringe (148 – 24%). Modelo de genótipos e modelo dominante

Polimorfismo	Genótipo	Câncer cavidade oral		OR (IC 95%)	Câncer laringe		OR (IC 95%)	Câncer orofaringe		OR (IC 95%)	Controle	
		N	%		N	%		N	%		N	%
<i>CYP2D6</i> *2	CC	142	61,5	1	86	58,5	1	92	63,0	1	267	60,1
	CG	76	32,9	1,01(0,71-1,43)	51	34,7	1,11(0,74-1,65)	44	30,1	0,90(0,59-1,35)	142	32,0
	GG	13	5,6	0,70(0,35-1,38)	10	6,8	0,89(0,44-1,87)	10	6,9	0,83(0,41-1,74)	35	7,9
	CG+GG	90	38,5	0,96(0,69-1,33)	61	41,5	1,07(0,73-1,55)	54	37,0	0,88(0,60-1,29)	177	38,9
	Total	231*	100		147*			146*	100		444*	100
<i>CYP2D6</i> *4	GG	169	72,5	1	108	73,5	1	116	79,5	1	327	73,3
	GA	56	24,0	1,07(0,73-1,56)	33	22,4	0,99(0,63-1,55)	27	18,5	0,75(0,46-1,20)	101	22,7
	AA	8	3,5	0,86(0,39-2,02)	6	4,1	1,01(0,41-2,48)	3	2,0	0,47(0,14-1,47)	18	4,0
	GA+AA	64	27,5	1,04(0,73-1,48)	39	26,5	0,99(0,65-1,51)	30	20,5	0,71(0,45-1,11)	119	26,7
	Total	233*	100		147*	100		146*	100		446*	100
<i>CYP2D6</i> *10	CC	164	70,1	1	107	72,3	1	114	78,1	1	314	70,4
	CT	58	24,8	1(0,69-1,44)	34	23,0	0,90(0,58-1,39)	29	19,9	0,72(0,46-1,14)	111	24,9
	TT	12	5,1	1,09(0,53-2,27)	7	4,7	0,98(0,38-2,33)	3	2,0	0,39(0,12-1,30)	21	4,7
	CT+TT	70	29,9	1,06(0,74-1,49)	41	27,7	0,95(0,63-1,43)	32	21,9	0,70(0,45-1,07)	127	29,6
	Total	234*	100		148*	100		146*	100		446*	100
<i>CYP2D6</i> *17	CC	213	91,8	1	132	90,4	1	135	93,1	1	401	90,5
	CT	19	8,2	0,89(0,51-1,56)	13	8,9	0,99(0,51-1,88)	8	5,5	0,59(0,28-1,30)	40	9,0
	TT	0	0	0 (0-4,09)	1	0,7	1,52 (0,14-13,14)	2	1,4	2,97 (0,46-19,07)	2	0,45
	CT+TT	19	8,2	0,85(0,48-1,47)	14	9,6	1,01 (0,55-1,87)	10	6,9	0,71 (0,35-1,40)	42	9,45
	Total	232*	100		146*	100		145*	100		443*	100
<i>CYP2D6</i> *41	GG	201	87,0	1	124	84,9	1	122	84,1	1	389	88,0
	GA	26	11,3	1,01 (0,61-1,66)	21	14,4	1,32 (0,75-2,28)	22	15,2	1,40 (0,81-2,40)	50	11,3
	GG	4	1,7	2,58 (0,68-10,31)	1	0,7	1,05 (0,11-7,06)	1	0,7	1,06 (0,11-7,18)	3	0,7
	GA+GG	30	13,0	1,09 (0,68-1,78)	22	15,1	1,30 (0,76-2,20)	23	15,9	1,38 (0,82-2,31)	53	12,0
	Total	231*	100		146*	100		145*	100		442*	100

*Números totais discrepantes por motivos técnicos.

Modelos de regressão logística binária ajustados para as variáveis: sexo, idade, cor de pele, nível de escolaridade, hábito etilista e tabagista

Tabela 8 – Distribuição das frequências dos haplótipos do gene *CYP2D6* nos grupos de casos e controles

Haplótipos	CCP		Controle		OR	p	95%IC
	N	%	N	%			
*1*1	156	25,5	108	24,5	1	-	-
*2*1	135	22,1	96	21,7	0,97	0,93	0,68 - 1,38
*2*2	37	6,0	35	7,7	0,75	0,34	0,45 - 1,26
*2*4	40	6,5	25	5,6	1,11	0,78	0,64 - 1,93
*2*10	0	-	2	0,4	0	0,17	0 - 1,52
*2*17	8	1,3	8	1,8	0,69	0,60	0,25 - 1,90
*2*41	22	3,6	11	2,5	1,38	0,45	0,63 - 3,09
*4*1	74	12,0	54	12,2	0,95	0,83	0,62 - 1,47
*4*4	19	3,1	18	4,1	0,73	0,38	0,36 - 1,49
*4*10	4	0,6	4	0,9	0,69	0,72	0,20 - 2,42
*4*17	4	0,6	7	1,6	0,39	0,21	0,13 - 1,28
*4*41	9	1,5	11	2,5	0,57	0,24	0,24 - 1,38
*10*1	12	2,0	7	1,6	1,19	0,81	0,47 - 3,05
*10*10	1	0,2	1	0,2	0,69	>0,99	0,03 - 13,3
*10*17	0	-	2	0,4	0	0,17	0 - 1,52
*10*41	1	0,2	2	0,4	0,35	0,57	0,02 - 3,02
*17*1	30	5,0	22	5,0	0,94	0,88	0,51 - 1,71
*17*17	3	0,5	2	0,4	1,04	>0,99	0,21 - 5,93
*17*41	1	0,2	1	0,2	0,69	>0,99	0,03 - 13,3
*41*1	48	7,8	25	5,6	1,33	0,34	0,77 - 2,26
*41*41	8	1,3	3	0,7	1,85	0,53	0,55 - 6,54
Total	612*	100	443*	100			

*Números totais discrepantes por motivos técnicos.

Modelos de regressão logística binária ajustados para: sexo, idade, cor de pele, nível de escolaridade, hábito etilista e tabagista.

Tabela 9 – Comparação das combinações haplotípicas do gene *CYP2D6* com os riscos de desenvolvimento das neoplasias de cavidade oral (235 - 38%), laringe (149 - 24%) e orofaringe (148 – 24%) (continuação)

Combinação Haplotípica	Câncer cavidade oral		OR (IC 95%)	Câncer laringe		OR (IC 95%)	Câncer orofaringe		OR (IC 95%)	Controle	
	N	%		N	%		N	%		N	%
*1*1	59	25,4	1	32	21,8	1	45	30,8	1	108	24,4
*2*1	48	20,7	0,91(0,57 - 1,45)	31	21,1	1,09(0,63-1,88)	30	20,5	0,75(0,43-1,30)	96	21,7
*2*2	13	5,6	0,70(0,34 - 1,45)	10	6,8	0,99(0,45-2,15)	10	6,8	0,70(0,33-1,55)	34	7,7
*2*4	19	8,2	1,39(0,70 – 2,65)	9	6,12	1,21(0,50-2,90)	8	5,5	0,77(0,34-1,82)	25	5,6
*2*10	0	-	0(0 - 4,03)	0	-	0(0-7,47)	0	-	0(0-5,29)	2	0,4
*2*17	3	1,3	0,67(0,19 – 2,37)	4	2,7	1,69(0,53-5,29)	0	-	0(0-1,15)	8	1,8
*2*41	6	2,6	0,99(0,35 - 2,91)	7	4,8	2,15(0,82-5,97)	6	4,1	1,31(0,45-3,90)	11	2,5
*4*1	29	12,5	0,98(0,58 - 1,69)	20	13,6	1,25(0,66-2,37)	15	10,3	0,67(0,35-1,28)	54	12,2
*4*4	8	3,4	0,81(0,35 - 1,90)	6	4,1	1,12(0,41-3,15)	3	2,0	0,4(0,12-1,35)	18	4,1
*4*10	3	1,3	1,37(0,34 – 5,25)	1	0,7	0,84(0,07-5,42)	0	-	0(0-2,54)	4	0,9
*4*17	2	0,9	0,52(0,11 - 2,49)	2	1,4	0,96(0,19-4,77)	0	-	0(0-1,40)	7	1,6
*4*41	3	1,3	0,50(0,14 - 1,73)	1	0,7	0,30(0,03-1,88)	4	2,7	0,87(0,29-2,67)	11	2,5
*10*1	4	1,7	1,05(0,33 - 3,48)	2	1,4	0,96(0,07-5,42)	2	1,4	0,68(0,14-3,31)	7	1,6
*10*10	1	0,4	1,83(0,09 - 35,06)	0	-	0(0-30,66)	0	-	0(0-21,8)	1	0,2

Continuação

Tabela 9 – Comparação das combinações haplotípicas do gene *CYP2D6* com os riscos de desenvolvimento das neoplasias de cavidade oral (235 - 38%), laringe (149 - 24%) e orofaringe (148 – 24%) (conclusão)

Combinação Haplotípica	Câncer cavidade oral		OR (IC 95%)	Câncer laringe		OR (IC 95%)	Câncer orofaringe		OR (IC 95%)	Controle	
	N	%		N	%		N	%		N	%
*10*17	0	-	0(0-4,03)	0	-	0(0-7,47)	0	-	0(0-5,29)	2	0,4
*10*41	1	0,4	0,91(0,06-8,00)	0	-	0(0-7,47)	0	-	0(0-5,29)	2	0,4
*17*1	13	5,6	1,08(0,52-2,22)	7	4,8	1,07(0,42-2,66)	8	5,5	0,87(0,38-2,15)	22	5,0
*17*17	0	-	0(0-4,03)	1	0,7	1,69(0,11-14,8)	2	1,4	2,4(0,36-15,6)	2	0,4
*17*41	1	0,4	1,83(0,09-35,06)	0	-	0(0-30,66)	0	-	0(0-21,8)	1	0,2
*41*1	15	6,5	1,10(0,53-2,22)	13	8,8	1,75(0,81-3,73)	12	8,2	1,15(0,53-2,39)	25	5,6
*41*41	4	1,7	2,44(0,63-9,89)	1	0,7	1,12(0,08-7,76)	1	0,7	0,8(0,06-5,49)	3	0,7
Total*	232*	100		147*	100		146*	100		443*	100

*Números totais discrepantes por motivos técnicos.

Modelos de regressão logística binária ajustados para as variáveis: sexo, idade, cor de pele, nível de escolaridade, hábito etilista e tabagista.

Quanto a classificação de pacientes e controles em relação ao fenótipo do *CYP2D6*, de acordo com sua combinação haplotípica, como demonstrado no quadro 2, verificou-se que a maioria dos indivíduos, tanto do grupo de casos quanto de controles, pertenciam a classe fenotípica de metabolizadores extensivos, como pode-se observar na tabela 10. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as frequências das classes fenotípicas nos grupos de indivíduos com CCP e controles (Tabela 10).

Tabela 10 – Distribuição das classes fenotípicas do gene *CYP2D6* nos grupos de casos e controles

Fenótipo	CCP		Controle		OR	p	95% IC
	N	%	N	%			
EM	562	91,83	392	88,49	1	-	-
IM	31	5,07	33	7,45	0,63	0,08	0,38 - 1,06
PM	19	3,10	18	4,06	0,74	0,40	0,39 - 1,41
Total	612*	100	443*	100			

*Números totais discrepantes por motivos técnicos.

Modelos de regressão logística binária ajustados para: sexo, idade, cor de pele, nível de escolaridade, hábito etilista e tabagista.

Posteriormente, as frequências das classes fenotípicas foram comparadas em relação as neoplasias de cavidade oral, laringe e orofaringe e o grupo controle com indivíduos sem diagnóstico para a neoplasia. As frequências também não diferiram de forma estatística entre os grupos estudados (Tabela 11).

Tabela 11 – Comparação entre as classes fenotípicas resultantes do gene *CYP2D6* e o risco de desenvolvimento do câncer de cavidade oral (235 - 38%), laringe (149 - 24%) e orofaringe (148 – 24%)

Fenótipo	Câncer cavidade oral		OR (IC 95%)	Câncer laringe		OR (IC 95%)	Câncer orofaringe		OR (IC 95%)	Controle	
	N	%		N	%		N	%		N	%
EM	209	90,1	1	135	91,8	1	136	93,1	1	392	88,5
IM	15	6,5	0,85(0,44-1,59)	6	4,1	0,53 (0,23-1,27)	7	4,8	0,61(0,25-1,38)	33	7,4
PM	8	3,4	0,83(0,38-1,94)	6	3,4	0,97 (0,39-2,35)	3	2,1	0,48(0,07-1,49)	18	4,1
Total	232*	100		147*	100		146*	100		443*	100

*Números totais discrepantes por motivos técnicos.

Modelos de regressão logística binária ajustados para as variáveis: sexo, idade, cor de pele, nível de escolaridade, hábito etilista e tabagista.

Os polimorfismos presentes nos genes codificadores dos receptores nicotínicos, *CHRNA5* e *CHRNA3*, também tiveram suas frequências analisadas entre o grupo de casos (n=619) e controles (n=448) para avaliar se esses contribuíam para o risco de desenvolvimento do CCP. As frequências dessas variantes nos grupos estudados serão apresentadas a seguir. Primeiramente, na Tabela 12 pode-se observar a análise entre os polimorfismos e o risco do CCP, sendo que não foram encontradas associações estatisticamente significantes (Tabela 12).

Tabela 12 – Distribuição dos genótipos do *CHRNA5* e *CHRNA3* no grupo de casos e controle (modelo de genótipos e modelo dominante)

Polimorfismo	Genótipo	CCP		Controle		OR	p	95%IC	
		N	%	N	%				
<i>CHRNA5</i>	GG	320	51,8	246	55	1	-		
	GA	242	39,2	160	35,8	1,096	0,54	0,82	1,47
	AA	56	9,1	41	9,2	0,763	0,27	0,47	1,23
	GA+AA	298	48,3	201	45,0	1,02	0,89	0,78	1,34
	Total	618*	100	447*	100				
<i>CHRNA3</i>	CC	227	36,8	167	37,4	1	-	-	
	CT	303	49,1	207	46,4	1,196	0,24	0,89	1,61
	TT	87	14,1	72	16,1	1,071	0,75	0,71	1,63
	CT+TT	390	63,2	279	62,5	1,17	0,29	0,88	1,55
	Total	617*	100	446*	100				

*Números totais discrepantes por motivos técnicos.

Modelos de regressão logística binária ajustados para as variáveis: sexo, idade, cor de pele, nível de escolaridade, hábito etilista e tabagista.

Posteriormente, os mesmos polimorfismos foram analisados em relação aos sítios da cavidade oral, laringe e orofaringe e também não revelaram associações significantes com o risco de desenvolvimento dessas neoplasias (Tabela 13).

Tabela 13 - Distribuição dos genótipos do *CHRNA5* e *CHRNA3* nos grupos de indivíduos com neoplasias de cavidade oral (235 - 38%), laringe (149 - 24%) e orofaringe (148 - 24%). Modelo de genótipos e modelo dominante

Polimorfismo	Genótipo	Câncer cavidade oral		OR (IC 95%)	Câncer laringe		OR (IC 95%)	Câncer orofaringe		OR (IC 95%)	Controle	
		N	%		N	%		N	%		N	%
<i>CHRNA5</i>	GG	118	50,2	1	69	46,6	1	79	53,4	1	246	55,0
	GA	94	40,0	1,26(0,86-1,84)	64	43,2	1,32(0,85-2,03)	57	38,5	1,07(0,68-1,67)	160	35,8
	AA	23	9,8	0,86(0,46-1,58)	15	10,1	1,07(0,53-2,14)	12	8,1	1,67(0,32-1,42)	41	9,2
	GA+AA	117	49,8	1,16(0,82-1,66)	79	53,3	1,26(0,84-1,90)	69	46,6	0,97(0,64-1,48)	201	45,0
	Total	235	100		148*	100		148	100		447*	100
<i>CHRNA3</i>	CC	84	35,9	1	62	41,9	1	55	37,2	1	167	37,4
	CT	122	52,1	1,33(0,91-1,95)	65	43,9	0,97(0,63-1,51)	69	46,6	1,13(0,72-1,78)	207	46,4
	TT	28	12,0	1,01(0,58-1,77)	21	14,2	0,94(0,51-1,75)	24	16,2	1,20(0,65-2,22)	72	16,1
	CT+TT	150	64,1	1,26(0,87-1,81)	86	58,1	0,96(0,64-1,46)	93	62,8	1,15(0,75-1,76)	279	62,5
	Total	234*	100		148*	100		148	100		446*	100

*Números totais discrepantes por motivos técnicos.

Modelos de regressão logística binária ajustados para as variáveis: sexo, idade, cor de pele, nível de escolaridade, hábito etilista e tabagista.

Para a análise das variantes *CHRNA5* e *CHRNA3* em relação a intensidade do consumo de cigarros, a amostra do estudo foi composta por 236 (22,1%) indivíduos que declararam terem consumido cigarros somente no passado e 674 (63,2%) indivíduos que declararam continuar o consumo de cigarros até o momento das entrevistas. Totalizando 910 (85,3%) participantes da pesquisa que tiveram contato com o cigarro.

Posteriormente, esses indivíduos foram divididos em dois grupos, sendo: 226 (24,8%) participantes que fumavam até 20 cigarros/dia e 678 (74,5%) que fumavam 20 ou mais cigarros/dia. Obtivemos seis (0,7%) participantes que tinham declarado consumir ou ter consumido cigarros e que não indicaram a quantidade diária de tal consumo, e portanto foram desconsiderados da análise resultando em 904 indivíduos. Além disso, foram retirados da análise os participantes que não tiveram seu genótipo determinado para as variantes *CHRNA5* (n=2; 0,2%) e *CHRNA3* (n=3; 0,3%), devido a dificuldades técnicas. Dessa forma, os números totais para a análise da variante *CHRNA5* e *CHRNA3* foram 902 e 901, respectivamente.

Para o polimorfismo *CHRNA5* (rs16969968), observou-se que os indivíduos que apresentavam o alelo polimórfico em homozigose tiveram aumento de duas vezes no risco de pertencerem ao grupo que fumava 20 ou mais cigarros/dia, considerados fumantes pesados/intensos (OR=1,93; IC 95%, 1,05 – 3,58), quando comparado com os que tinham o gene na forma selvagem, como pode ser visto na tabela 14.

E quando as frequências dos genótipos para o polimorfismo do *CHRNA3* (rs578776) foram analisadas nos grupos de indivíduos que fumavam até 20 cig/dia e 20 ou mais cig/dia as mesmas não diferiram como demonstrado na tabela 15.

Tabela 14 – Distribuição dos genótipos do *CHRNA5* e o número de cigarros/dia (modelo de genótipos e modelo dominante)

Gene	Genótipo	Até 20 cig/dia N=225 (25%)	≥20 cig/dia N = 677 (75%)	OR	p	IC 95%
<i>CHRNA5</i>	GG	118 (52,4%)	348(51,4%)	1,00	-	-
	GA	94 (41,7%)	255(37,6%)	0,91	0,63	0,67 – 1,25
	AA	13(5,9%)	74(11%)	1,93	0,03**	1,05 – 3,58
	GA+AA	107 (47,6%)	328 (48,6%)	1,04	0,82	0,77 – 1,40

**p<0,05

Tabela 15 - Distribuição dos genótipos do *CHRNA3* e o número de cigarros/dia (modelo de genótipos e modelo dominante)

Gene	Genótipo	Até 20 cig/dia N=225 (25%)	≥20 cig/dia N = 676 (75%)	OR	p	IC 95%
<i>CHRNA3</i>	CC	76(33,8%)	261(38,6%)	1,00	-	-
	CT	112 (49,8%)	324 (47,9%)	0,84	0,31	0,60 – 1,17
	TT	37(16,4%)	91(13,5%)	0,72	0,18	0,45-1,14
	CT+TT	149 (66,2%)	414(61,3%)	0,81	0,20	0,59-1,11

Quando os polimorfismos *CHRNA5* e *CHRNA3* foram analisados em relação ao consumo de cigarros, considerando a categorização “maços/ano”, os resultados obtidos foram similares aos anteriores para o polimorfismo do *CHRNA5*, pois a presença do genótipo homozigoto polimórfico revelou associação com o aumento do risco de fumar 20 ou mais maços/ano (Tabela 16). E diferentemente da análise considerando “cig/dia”, o polimorfismo *CHRNA3*, quando em homozigose diminuiu o risco dos indivíduos fumarem 20 ou mais maços/ano nessa outra abordagem (Tabela 17).

Tabela 16 – Distribuição dos genótipos do *CHRNA5* e o número de maços/ano consumidos (modelo de genótipos e modelo dominante)

Gene	Genótipo	1-20 maços/ano (N=225)	≥20 maços/ano (N=731)	OR	p	IC 95%
CHRNA5	GG	92 (55,1%)	373(51,0%)	1	-	-
	GA	67(40,1%)	280(38,3%)	1,03	0,93	0,73 – 1,45
	AA	8(4,8%)	78(10,7%)	2,40	0,02*	1,12 – 5,04
	GA+AA	75(44,9%)	358(49,0%)	1,18	0,35	0,84-1,64

*p<0,05

Tabela 17 – Distribuição dos genótipos do *CHRNA5* e o número de maços/ano consumidos (modelo de genótipos e modelo dominante)

Gene	Genótipo	1-20 maços/ano (N=167)	≥20 maços/ano (N=730)	OR	p	IC 95%
CHRNA3	CC	52(31,1 %)	283 (38,8%)	1	-	-
	CT	82(49,1%)	352(48,2%)	0,79	0,25	0,54 – 1,16
	TT	33(19,8%)	95(13,01%)	0,53	0,01*	0,32 – 0,87
	CT+TT	115(68,9%)	447(61,21%)	0,71	0,07	0,50 - 1,02

*p<0,05

6. DISCUSSÃO

6.1 Dados sociodemográficos e hábitos de consumo

Na presente avaliação foram estudados 619 pacientes com carcinoma de células escamosas na região da cabeça e pescoço, comparados com um grupo controle, de base hospitalar, composto por 448 indivíduos sem a doença, quanto à presença dos polimorfismos nos genes envolvidos na metabolização do cigarro (*CYP1A1* - rs4646903 e rs1048943; *CYP2D6* - rs1080985, rs3892097, rs1065852, rs28371706 e rs28371725; e *CYP3A4* - rs2740574) e dos genes codificadores de receptores nicotínicos (*CHRNA3* - rs578776 e *CHRNA5* - rs16969968). Os grupos também foram comparados quanto aos fatores sociodemográficos e características individuais relacionadas ao hábito de beber e de fumar.

Observou-se maior frequência de indivíduos do sexo masculino que feminino no grupo de casos (90,1%) e controles (84,2%), sendo que o gênero masculino se mostrou um fator de risco para o desenvolvimento do CCP em 1,72 vezes. Essa associação já foi encontrada em outros estudos realizados com diferentes populações (Döbrossy, 2005; Colombo e Rahal, 2009; Marcu e Yeoh, 2009) e pode estar relacionada ao fato de que os indivíduos do sexo masculino culturalmente consomem mais precocemente e em maiores quantidades o álcool e o cigarro do que as mulheres (Brown et al., 2018; Lee YA et al., 2019). Porém, as diferenças de incidência da doença entre os gêneros têm diminuído nos últimos anos, uma vez que as mulheres têm aumentado o consumo de tais substâncias (Marcu e Yeoh, 2009; Casati et al., 2012).

Nossos resultados revelaram também a associação da idade superior aos 50 anos com o risco de CCP, o que parece ser decorrente da maior susceptibilidade de desenvolvimento de tumores malignos em geral (Döbrossy, 2005; Colombo e Rahal, 2009), uma vez que ao longo da vida o indivíduo pode acumular alterações e mutações no seu organismo, influenciadas pela epigenética e exposição aos fatores de risco ambientais, como as substâncias do cigarro e do álcool (Depinho, 2000). De fato, 85% dos pacientes pertencentes

ao grupo de casos na presente investigação, declararam ter iniciado o consumo do cigarro antes dos 20 anos de idade (dados não apresentados), ou seja, iniciaram precocemente o consumo e ficaram por anos expostos a esse fator de risco.

A maior frequência da baixa escolaridade, observada em nosso estudo, também se mostrou associada com o maior risco de CCP. Os indivíduos que relataram ter de 0 a 8 anos de estudo, que corresponde a cerca de 60% da amostra estudada, e os que relataram ter de 8 a 11 anos de escolaridade revelaram risco aumentado de desenvolverem a neoplasia em 1,7 vezes, quando comparados com os 10% da população que possui mais de 11 anos de escolaridade. Estudos indicam que o baixo nível de escolaridade e o menor nível socioeconômico estariam relacionados ao aumento do risco de desenvolvimento do CCP (Menvielle et al., 2004, Boing et al., 2011; Conway et al., 2015). Essa associação pode ser explicada pelo fato de que os indivíduos com menor nível de escolaridade e esclarecimento podem apresentar menor percepção de lesões precoces ou pré-neoplásicas passíveis de tratamento, além do menor acesso aos tipos de tratamentos para a doença (Escobedo e Peddicord, 1996). Esses indivíduos também podem apresentar baixos padrões de higiene bucal além de um tipo de dieta de má qualidade, com pouca ingestão de frutas e vegetais, fatores que também vêm sendo associados ao risco aumentado de desenvolvimento do CCP (Menvielle et al., 2004). Adicionalmente, o menor conhecimento desses indivíduos podem estar associados ao consumo de tipos de cigarro e de bebida alcoólica de baixo custo, os quais podem apresentar maior quantidade de substâncias potencialmente carcinogênicas e, portanto, também aumentariam o risco da neoplasia.

A variável cor de pele, quando é abordada em relação a autodeclaração dos indivíduos, tem sido associada a um fenômeno chamado de “branqueamento” em estudos desenvolvidos com amostras da população Brasileira. Tal fenômeno discutido por Cardena et al. (2013) está associado com o fato de o Brasil apresentar uma das populações mais heterogêneas do mundo e, mesmo assim, as pessoas enxergam a classificação da cor da pele apenas em dois extremos. Esse fenômeno pode explicar o fato da maior parte dos

indivíduos da pesquisa terem se autodeclarado como brancos, o que pode ter levado a associação estatisticamente significativa entre os indivíduos não brancos e a diminuição do risco de desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço (OR= 0,67; IC 95%, 0,52 – 0,86), observado no presente estudo. Sendo assim, essa associação deve ser interpretada com cautela e possivelmente foi encontrada devido as declarações dos participantes, as quais muitas vezes não condizem com sua verdadeira cor. Dado que a população Brasileira é bem heterogênea, pode ser que parte dos indivíduos da pesquisa que declararam possuir cor de pele branca, na verdade, poderiam ter cor de pele e origens oriundas de diversas outras contribuições populacionais que participaram na formação da atual população do Brasil e assim a associação encontrada não corresponderia a realidade.

Em nosso estudo também foi observado que o consumo do álcool, mesmo após a abstinência, contribuiu para o aumento do risco de desenvolvimento do CCP, sendo que os indivíduos que declararam terem consumido bebidas alcoólicas somente no passado e os que as consumiam até o momento da entrevista apresentaram aumento do risco de 1,5 e 1,9 vezes, respectivamente, demonstrando que o consumo dessa substância parece ser, de qualquer maneira, prejudicial e pode influenciar o desenvolvimento da neoplasia, corroborando com dados de outros estudos que definem o álcool como um dos principais fatores de risco relacionado as neoplasias de cabeça e pescoço (Döbrossy, 2005; Colombo e Rahal, 2009; Hashibe et al., 2009; Simard et al., 2014).

Como mencionado anteriormente a possível contribuição do álcool pode ocorrer por meio da metabolização dessa substância e na formação do acetaldeído, o qual pode se ligar a macromoléculas (DNA, RNA e proteínas) formando adutos, os quais podem alterar a síntese e o reparo do DNA e, conseqüentemente, resultar em alterações funcionais e estruturais ligadas ao processo carcinogênico (Carrard et al., 2008; Kawakita e Matsuo, 2017; Lee WT et al., 2019).

O consumo do cigarro é responsável por mais da metade dos casos de neoplasias evitáveis e mortes em todo o mundo (Rezende et al., 2019; Di Credico

et al., 2019). Sabe-se que a exposição à essa substância é danosa à saúde do indivíduo por apresentar diversos compostos com potencial mutagênico. Esses compostos podem se acumular no organismo, aumentando as chances de mutações em proto-oncogenes, genes de controle de ciclo celular e genes supressores de tumor, principalmente em tecidos que são expostos diretamente à fumaça do cigarro, contribuindo para o desencadeamento do processo carcinogênico (Colombo e Rahal, 2009). O consumo do cigarro é bem estabelecido como o principal fator de risco associado ao desenvolvimento dos tumores malignos da cabeça e pescoço (Bandeira et al., 2014; Berthiller et al., 2016), chegando a ser responsável por mais de 30% dos casos de CCP em algumas populações (Simard et al., 2014).

No presente estudo, o consumo de cigarros foi o principal fator de risco associado ao desenvolvimento de tumores malignos da cabeça e pescoço. Observou-se que os participantes que declararam serem consumidores de cigarros até o momento das entrevistas, quando comparados aos indivíduos que nunca fumaram, apresentaram aumento de praticamente 9 vezes no risco de desenvolvimento da neoplasia (OR=8,97; IC 95%, 5,90-13,67). Além disso, a intensidade de consumo de cigarros também foi fortemente associada ao risco de CCP, já que os indivíduos que consumiam até 20 cigarros por dia apresentaram o aumento do risco em 2,36 vezes (IC 95%, 1,46-3,80), enquanto os que declararam consumir 20 ou mais cigarros por dia (80,9% dos casos) tiveram aumento do risco de 10 vezes para o CCP (IC 95%, 6,72-15,64), evidenciando que quanto maior o consumo de cigarros, maior a chance de alteração do material genético e, conseqüentemente, maior o risco de desenvolvimento de tumores. Sendo que a existência da associação de dose-resposta entre o risco de CCP e a intensidade (cigarros por dia) e a duração (tempo de consumo) do hábito tabagista, já foi abordada na literatura (Di Credico et al., 2019).

Adicionalmente, foi conferido na presente pesquisa que os indivíduos que declararam fumar apenas no passado também apresentaram aumento do risco de 3,5 vezes para o desenvolvimento do CCP, revelando que mesmo os participantes que interromperam o contato direto com as substâncias

carcinogênicas do cigarro, possivelmente continuaram com esses compostos acumulados no organismo por bastante tempo. Estudos indicam que indivíduos que cessam o consumo de cigarros começam a apresentar uma diminuição no risco de desenvolvimento do CCP de 1 a 4 anos após a interrupção do consumo. Já para que o risco da neoplasia se iguale aos dos indivíduos que nunca tiveram hábito tabagista são necessários mais de 20 anos da suspensão do consumo (Marron et al., 2010; Lubin e al., 2011).

Outro fato constatado na presente investigação foi o longo tempo de exposição ativa ao cigarro, uma vez que 85% dos indivíduos do grupo de pacientes com câncer de cabeça e pescoço começaram a fumar antes dos 20 anos de idade e de 78% desses indivíduos fumaram por mais de 30 anos (dados não demonstrados). Esses achados corroboram com outros estudos que evidenciam que o tempo de consumo do cigarro, o qual está atrelado ao começo precoce do hábito, aumenta as chances do indivíduo tornar-se dependente do cigarro, o que contribui para o desenvolvimento de diversos tipos de neoplasias, incluindo o CCP (Almeida et al., 2014), já que o indivíduo se expõe a substâncias potencialmente carcinogênicas por mais tempo. Quando o indivíduo se expõe ao cigarro por muito tempo, significa que ele apresenta mais substâncias com potencial de danificar seu material genético e as chances de que sejam formados adutos que alterem o DNA e que não sejam corrigidos é maior (Colombo e Rahal, 2009; Bandeira et al., 2014; Di Credico et al., 2019).

Quando consideramos o consumo do cigarro nos três diferentes sítios tumorais avaliados na presente investigação, foi observado que esse também foi o fator de risco mais influente no desenvolvimento das neoplasias da cavidade oral, laringe e orofaringe, porém sua maior contribuição foi para o sítio da orofaringe, em que os indivíduos apresentaram o aumento de risco para o desenvolvimento dos tumores de 17,76 vezes. Nosso resultado diverge de outros estudos que associam de maneira mais significativa o consumo de cigarro com as neoplasias da cavidade oral e da laringe, por serem regiões de contato direto com as substâncias consideradas carcinogênicas (Zhang et al., 2012; Zeng et al., 2016). Porém, assim como outros sítios tumorais que compõem as neoplasias de cabeça e pescoço a orofaringe também apresenta aumento de

risco associado ao consumo do cigarro. Possivelmente, o maior risco encontrado para esta região está atrelado ao baixo número de indivíduos que declararam que nunca fumaram e possuíam a neoplasia de orofaringe, o qual foi percentualmente menor quando comparados com as outras regiões. Considerando que cada tecido apresenta suas particularidades, no Brasil, uma investigação feita baseada com os números de casos de neoplasias demonstrados pelo GLOBOCAN de 2012, revelou que de 11.900 casos de câncer da cavidade oral e faringe, cerca de 6300 ocorriam devido o consumo de cigarros. E de 6280 casos de laringe, 4930 eram ocasionados pelo mesmo hábito (Rezende et al., 2019).

Em relação a análise da intensidade do consumo nos diferentes sítios tumorais, pode-se observar que o risco de desenvolver tumores na cavidade oral, laringe e orofaringe foi maior nos indivíduos que consumiam 20 ou mais cigarros por dia, assim como na análise geral do CCP. Esses achados corroboram com a relação entre o maior consumo e a maior quantidade de substâncias com potencial carcinogênico e a maior chance de desenvolvimento de neoplasias (Di Credico et al., 2019). Porém não houve associação significativa entre os indivíduos que fumavam até 20 cigarros por dia com a neoplasia de laringe, o que pode ter ocorrido pelo baixo número de indivíduos que fumavam essa quantidade de cigarros por dia (n=18) e dessa forma, quando comparados aos que nunca fumaram (n=8), que também são poucos indivíduos, não revelaram associações estatísticas no grupo da neoplasia analisada.

6.2 Genes envolvidos na metabolização do cigarro

Uma vez que o cigarro é considerado o principal fator de risco de desenvolvimento do CCP, os polimorfismos estudados na presente investigação foram selecionados de acordo com a sua relevância na participação da metabolização do cigarro. Dentre eles destacam-se o *CYP1A1*, *CYP2D6* e o *CYP3A4*.

Os polimorfismos do gene *CYP1A1* estudados na presente investigação, rs4646903 e rs1048943, já foram associados com o aumento do risco de

desenvolvimento de neoplasias de cabeça e pescoço, de cavidade oral e orofaringe em populações de origem Asiática, como a Japonesa, Indiana e a Chinesa (Sato et al., 2000; Ho et al., 2007; Tanimoto et al., 1999; Yu et al., 2014; Zeng et al., 2016). De acordo com dados da literatura, nessas populações as variantes estudadas são encontradas com maior frequência, chegando a atingir 30%, enquanto que nos Caucasianos a frequência da variante rs4646903 atinge 12% e a rs1048943 4,5% (Yousef et al., 2012; Zeng et al., 2016). Em contrapartida, a presente investigação não observou associações significantes entre os polimorfismos do gene *CYP1A1* e o risco de desenvolvimento das neoplasias, mesmo encontrando a frequência de 18% para a primeira variante e 11,5% para a segunda. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos realizados também com indivíduos da população brasileira (Gattás et al., 2006; Marques et al., 2006; Losi-Guembarovski et al., 2008; Monteiro et al., 2012). Possivelmente, essa discrepância entre os resultados esteja relacionada com a diferença de origem étnica dos indivíduos estudados, uma vez que os estudos que encontraram associações entre as variantes e o risco do CCP foram realizados com indivíduos de origem Asiática.

Apesar da enzima *CYP1A1* ser considerada uma das principais envolvidas na Fase I da biotransformação e ativação de componentes do cigarro, é importante ressaltar que ela não age sozinha nesse processo e que também existe uma segunda fase subsequente a esse processo. A Fase II da biotransformação ou fase de detoxificação celular é mediada pelas enzimas da família das Glutathione S-Transferases e N-Acetil Transferases as quais são capazes de inativar ou tornar a substância eletrofílica em um composto hidrossolúvel para ser excretado pelo organismo. Sendo assim, as duas etapas da biotransformação de xenobióticos atuam de forma balanceada, a fim de evitar o acúmulo dos compostos carcinogênicos e excretá-los de maneira eficaz. Dessa forma, mesmo que existam polimorfismos em genes codificadores de enzimas que participam da fase I e alterem suas atividades, mecanismos compensatórios dessa etapa ou da etapa de detoxificação podem existir, propiciando a excreção dos compostos tóxicos ao organismo. Adicionalmente, outros processos, como o de reparo do material genético, podem corrigir os

danos da molécula de DNA causados pelo acúmulo de elementos eletrofílicos na célula, evitando assim o aparecimento de neoplasias (Hiyama et al., 2008; Lacko et al., 2009; Leme et al., 2010).

O gene *CYP2D6* apresenta grande importância na metabolização do cigarro ativando suas nitrosaminas específicas. Aparentemente esse é o primeiro estudo que avaliou a possível relação de polimorfismos do *CYP2D6* com o risco de desenvolvimento de CCP na população brasileira. Cada polimorfismo analisado desse gene determinava um dos cinco diferentes haplótipos escolhidos para estudo (*CYP2D6*2*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*10*, *CYP2D6*17* e *CYP2D6*41*), e quando cada um desses haplótipos foi analisado em relação a neoplasia CCP e seus sítios tumorais, não foram observadas associações estaticamente significantes entre eles. Com resultados contrários aos nossos, Shukla e colaboradores (2012) observaram, na população Indiana, que os haplótipos *CYP2D6*4* e *CYP2D6*10*, que codificam enzimas com atividade nula e diminuída, respectivamente, estavam associados com o aumento do risco de desenvolvimento do CCP (Shukla et al., 2012).

Diferentes combinações genóticas podem resultar em uma mesma classificação fenotípica. O fenotípico é resultante da interação do genótipo do indivíduo com o ambiente e indica a velocidade de metabolização das enzimas por ele codificadas. Uma vez que o fenótipo demonstra a funcionalidade dos genes era esperado que indivíduos que fossem metabolizadores extensivos (EM), ativariam mais eficientemente as nitrosaminas, que possuem potencial carcinogênico e, portanto, poderiam aumentar as chances de desenvolvimento da neoplasia. Na presente investigação, ainda que a frequência do fenótipo de metabolizador extensivo no grupo de CCP (92%) tenha sido maior que nos controles (88,5%), não foram encontradas diferenças estatisticamente significantemente. Entretanto, nossos resultados devem ser vistos com cautela, uma vez que foram analisados apenas cinco dos mais de cem polimorfismos apresentados pelo gene e a classificação fenotípica pode não corresponder de fato à característica real de metabolização dos indivíduos avaliados, pois quando o participante não possuía nenhum dos cinco SNPs avaliados em pelo menos um de seus cromossomos, o mesmo era classificado com haplótipo selvagem

(*CYP2D6*1*), que resulta em um metabolizador extensivo. Tal classificação pode ter aumentado ainda mais o número de indivíduos EM e dificultado o encontro de possíveis associações com o risco da neoplasia. Dessa forma, talvez seja necessário ampliar o número de variáveis analisadas do gene para aperfeiçoar o estudo em relação aos haplótipos e fenótipos resultantes do gene *CYP2D6* com o risco da doença.

Por outro lado, diferentes estudos têm estabelecido que a maioria das populações, inclusive em outra amostra brasileira, apresenta o fenótipo EM como predominante (Agúndez et al., 2001; Sistonen et al., 2007; Friedrich, 2014), resultado também encontrado em nosso estudo

A enzima *CYP3A4*1B* também participa da Fase I do processo de biotransformação ativando tipos específicos de nitrosaminas provenientes do cigarro, cujo polimorfismo já foi associado a diferentes neoplasias, como a de próstata, leucemia e de pulmão (Rodriguez-Antona e Ingelman-Sundberg, 2006; Azarpira, et al., 2011; Zhuo et al., 2013). Porém, os achados ainda são controversos (Nogal et al., 2007; Voso et al., 2007) e sua associação com o CCP e seus diferentes sítios tumorais ainda é pouco explorada. No presente estudo não foram observadas diferenças significativas entre as frequências dos genótipos polimórficos nos pacientes com neoplasias de cabeça e pescoço e o grupo controle. Quando avaliamos os diferentes sítios tumorais também não encontramos associações significativas. Azarpira et al. (2011) estudaram esse mesmo polimorfismo (*CYP3A4*1B*) em relação ao câncer de laringe em amostra da população Iraniana e obtiveram resultados semelhantes ao nosso, não encontrando associações entre a variante e o risco da doença. A baixa frequência do alelo polimórfico na população brasileira constatada em outros estudos (Fiegenbaum et al., 2005; Monteiro et al., 2016) pode dificultar o encontro de associações desse polimorfismo com o risco da neoplasia avaliada. Além disso, a atividade enzimática resultante do polimorfismo estudado in vivo, ainda é controversa (García-Martín et al., 2002; Rodriguez-Antona e Ingelman-Sundberg, 2006), sendo que algumas pesquisas relatam aumento de atividade da enzima polimórfica, enquanto outras relatam que a expressão proteica resultante do genótipo polimórfico é menor do que a codificada pelo alelo

selvagem (Westlind et al., 1999). Estabelecer de fato a atividade enzimática resultante do polimorfismo pode contribuir para nossos estudos e direcionar melhor as abordagens para estabelecer possíveis associações do polimorfismo em questão.

Sabe-se que as enzimas da família CYP são as principais envolvidas na Fase I da metabolização de xenobióticos, com importante papel na ativação e transformação de substâncias provenientes do cigarro. Polimorfismos em genes codificadores dessas proteínas podem alterar suas atividades enzimáticas e desbalancear o equilíbrio existente entre as fases desse processo. Porém estudar polimorfismos de alguns genes isoladamente, como os contemplados no presente estudo, ainda que sejam os principais envolvidos no processo, podem não determinar de maneira real o papel da biotransformação de fase I de um indivíduo. Além disso, os genes que codificam as enzimas de metabolização de xenobióticos de Fase II, que facilitam a desintoxicação dos compostos eletrofílicos devem também ser levados em consideração para melhor compreensão do processo. Essa avaliação também vem sendo realizada pelo nosso grupo.

Além disso, como mencionado anteriormente, o CCP é uma doença multifatorial e, portanto, outros fatores podem ter influenciado os resultados obtidos. Cada indivíduo apresenta uma diferente exposição aos fatores considerados de risco, não só o cigarro e o álcool, mas também suas condições de higiene, seu tipo de alimentação, os cuidados com a saúde e exposição a outras substâncias também consideradas carcinogênicas. Todos esses fatores podem influenciar o risco de desenvolvimento da neoplasia e dessa maneira é importante entender que por ser uma doença multifatorial a não associação dos polimorfismos com os riscos das doenças, obtidas nesse estudo, não significa que esses não estejam participando de alguma forma para o desenvolvimento da mesma.

6.3 Genes codificadores de receptores nicotínicos

Não só os polimorfismos presentes nas enzimas de fase I dos genes relacionados com a metabolização de compostos do cigarro devem ser investigados nos estudos de associação com o CCP. Variações em genes que contribuem para o padrão de consumo de álcool e cigarro também merecem ser considerados, como os polimorfismos existentes nos genes que codificam subunidades de receptores nicotínicos, chamados de *CHRNA5* (rs16969968) e *CHRNA3* (rs578776), que podem alterar a resposta ocasionada pelo consumo da nicotina e o desenvolvimento de neoplasias, como o CCP.

Na presente investigação não foi encontrada associação do polimorfismo *CHRNA5* (rs16969968) com o risco de desenvolvimento de CCP e os sítios da cavidade oral, laringe e orofaringe, sendo as distribuições genótípicas semelhantes entre os grupos de pacientes e controles. Resultados semelhantes ao de Anantharaman et al., (2014), que também não observaram relação entre a variante genética e o risco do câncer oral em indivíduos da população Indiana. Por outro lado, Lips e colaboradores (2010) analisaram a associação do mesmo SNP com o risco de CCP, considerando quatro estudos que somavam 3968 participantes, com diagnóstico confirmado para a doença, provenientes da Europa Central e América Latina. Foi observado o aumento de 1,08 vezes para o risco de desenvolvimento da neoplasia nos indivíduos que possuíam o alelo polimórfico. Entretanto, quando os cálculos foram ajustados em relação aos participantes fumantes, a associação da variante genética com o risco da doença foi diminuída, levando os autores a acreditarem que o alelo polimórfico não influencia diretamente o risco de desenvolvimento da doença, mas a variante do DNA estaria relacionada com a modulação da quantidade de cigarros consumidos (Lips et al., 2010).

Diversos estudos associam a presença do polimorfismo *CHRNA5* com o aumento do risco de desenvolvimento da neoplasia de pulmão, porém alguns autores acreditam na relação direta entre o polimorfismo e a doença, pois encontram associação da variante com o câncer mesmo em indivíduos não fumantes (Amos et al., 2008; Hung et al., 2008). Já outras investigações

observam a associação indireta da variante no risco da doença, pois ela atua modificando a intensidade do consumo de cigarros, que também é considerado o principal fator de risco para a neoplasia de pulmão (Thorgeirsson et al., 2008; Lips et al., 2010).

Uma vez que não foi encontrada associação direta do polimorfismo do *CHRNA5* e o CCP, a relação da variante com o consumo do cigarro também foi avaliada. Pode-se observar quando os indivíduos (casos e controles) foram categorizados em: fumavam até 20 cig/dia e fumavam ≥ 20 cig/dia, que a presença do polimorfismo em homozigose revelou associação com risco duas vezes maior de consumir 20 ou mais cigarros por dia, ou seja, os indivíduos apresentaram duas vezes mais chance de ter o fenótipo de fumantes pesados/intensos (OR=1,93; IC 1,05-3,58). Resultado similar ao de Lips et al., (2010), que observaram que os participantes (casos e controles) tinham 1,8 mais risco de compor o grupo de indivíduos com o fenótipo de fumantes pesados. O estudo de Pérez-Morales et al., (2018), também demonstrou associação da variante com o risco aumentado em 3,12 vezes dos indivíduos consumirem 20 ou mais cig/dia. Sendo assim, resultados como o de Lips et al., (2010), Pérez-Morales et al., (2018) e o da presente investigação, consideram a presença da variante um fator de risco indireto para o desenvolvimento do CCP, uma vez que ela parece modular a intensidade do consumo de cigarros. Anantharaman et al. (2014) que também estudaram a variante em relação ao câncer de cavidade oral, na população Indiana, observaram uma tendência no aumento de chances de consumirem mais cigarros, quando apresentavam o alelo polimórfico, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo.

O polimorfismo *CHRNA5* (rs16969968) também tem sido considerado o SNP mais fortemente associado com a dependência de nicotina (Bierut et al., 2008; Saccone et al., 2009; Wen et al., 2016). Entretanto, a classificação da dependência é complexa e envolve diversos fatores (ambientais, genéticos, comportamentais), sendo o Teste de Fagertröm o instrumento mais frequentemente utilizado para definir essa característica (Wen et al., 2016). Porém, no presente estudo esse instrumento de avaliação não foi utilizado, não

sendo possível definir se os indivíduos participantes eram ou não dependentes da substância.

A associação do polimorfismo *CHRNA5* (G->A) com o aumento do consumo de cigarros, com a dependência e com o risco de desenvolvimento de neoplasias, como o CCP, ocorre possivelmente, pois quando o alelo A codifica a subunidade $\alpha 5$, ela possui menor afinidade com a nicotina e seus agonistas, quando comparada a um receptor que possui a subunidade codificada pelo alelo não polimórfico. Uma vez que a subunidade $\alpha 5$ é abundante nos neurônios dopaminérgicos, quando ela é codificada pelo alelo variante, a sinalização dos efeitos estimulatórios ocasionados pelo consumo de cigarros diminui e, portanto, os indivíduos precisariam aumentar o consumo para ativar vias do sistema dopaminérgico relacionados com o prazer e a recompensa (Bierut et al., 2008; Wen et al., 2016; Vanskike et al., 2016). Além disso, a presença da subunidade $\alpha 5$ codificada pelo alelo A também já foi associada com a diminuição dos efeitos aversivos ocasionados pelo consumo de cigarros, e dessa forma sua presença aumentaria o consumo da substância (Jensen et al., 2015; Fowler e Kenny, 2013), que é considerada um dos principais fatores de risco de neoplasias, como o CCP.

Existem diversas maneiras de categorizar o consumo de cigarros, por exemplo, maços/ano, cigarro/dia, maço/dia, entre outras, porém, as abordagens que estudam a possível relação entre os polimorfismos do *cluster CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* e o consumo de cigarros utilizam a categorização “cigarro/dia” (Lips et al., 2010; Pérez-Morales et al., 2018), inclusive essa categoria é usada para a aplicação do Teste de Fagerström. E por isso, no presente estudo foi priorizado estudar a presença do polimorfismo com a intensidade do consumo de cigarros descrita em número de cigarros consumidos por dia, em busca de facilitar as comparações na literatura existente. Mesmo assim, foram realizadas as mesmas análises utilizando o número de maços/ano consumidos pelos indivíduos do presente estudo e a presença da variante *CHRNA5*. O resultado observado demonstrou que os indivíduos (casos e controles) que apresentavam o genótipo homozigoto mutado para a variante tiveram 2,4 vezes mais chances de consumir 20 ou mais maços/ano (OR=2,40;

IC95% 1,12 - 5,04), valores esses semelhantes ao encontrado quando consideramos o consumo em cigarros/dia.

O outro polimorfismo do cluster que codifica subunidades do receptor nicotínico foi o *CHRNA3* (rs578776), que apresenta a mudança de base C>T. No presente estudo, a variante genética não revelou associação com o risco de desenvolvimento das neoplasias analisadas (CCP e seus sítios da cavidade oral, laringe e orofaringe), diferentemente dos achados descritos por Anantharaman e seus colaboradores (2014) em um estudo caso-controle com câncer de cavidade oral conduzido na população Indiana, em que foi observada associação significativa entre o polimorfismo e a diminuição do risco de desenvolvimento da neoplasia. Entretanto, a variante alélica na população Indiana é encontrada em frequência superior (51%) a observada em nossa amostra (39%), o que pode ter influenciado a divergência de resultados.

Diferentemente do polimorfismo no gene *CHRNA5*, a variante genética no *CHRNA3* tem sido relacionada à diminuição do consumo do tabaco (Anantharaman et al., 2014; Qu et al., 2016) e a chance do indivíduo ser dependente da nicotina (Saccone et al., 2009), pois de acordo com Robinson e colaboradores (2013), o alelo polimórfico T codificaria a subunidade do receptor com menos potencial de ativação das vias sensíveis a exposição da nicotina em comparação a subunidade codificada pelo alelo selvagem C, e agiria de forma protetiva ativando menos o sistema de recompensa e prazer.

Na presente investigação, quando foi analisado a possível relação desse polimorfismo com a intensidade de consumo de cigarros, considerando a categorização de cigarros/dia, nossos resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Entretanto, quando categorizamos o consumo de cigarros em “maços/ano”, observamos que a presença do alelo polimórfico em homozigose diminuiu quase 50% a chance do indivíduo fumar 20 ou mais maços/ano (OR=0,53; IC95% 0,32 – 0,87). Porém, esse resultado deve ser interpretado com cautela, uma vez que a quantidade de cigarros consumidos pode ter sido distribuída em outras categorias e interpretada erroneamente quando utilizada a fórmula para determinar o consumo de cigarros em maços/ano.

Uma vez que os polimorfismos, presentes em genes codificadores de subunidades dos receptores nicotínicos, podem contribuir para a intensidade e a dependência da nicotina, considera-se que eles também podem influenciar o risco de desenvolvimento de doenças que tem como principal fator contribuinte o consumo de cigarros, como é o caso do CCP. E sabendo dessa associação com a intensidade de consumo de cigarros, uma aplicabilidade clínica possível seria direcionar os pacientes com alto risco de recidiva, consumidores de cigarros, para programas antitabagistas na tentativa de ajudá-los a evitar tal recidiva.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho foi realizado com a utilização de amplos questionários aplicados aos indivíduos participantes e análise de seus polimorfismos, trazendo diversos pontos importantes, como por exemplo, a associação do tabaco e do álcool no risco de desenvolvimento da doença e também a presença de polimorfismos que aparentemente podem influenciar a quantidade de cigarros consumidos (*CHRNA5*), nos levando a um direcionamento de aplicabilidade clínica em relação aos pacientes. Porém como todo estudo realizado existiram limitações, dentre elas devemos considerar primeiramente, que as respostas dos indivíduos nos questionários podem não condizer com a realidade de suas vidas e hábitos, e esse fator poderia alterar os resultados encontrados. Adicionalmente, o presente trabalho foi analisado com uma metodologia estatística que pode ser diferente de outros que abordam o mesmo assunto, apresentando por exemplo, mensurações e ajustes de covariáveis distintos.

Deve-se também considerar que o câncer é uma doença complexa e multifatorial e que o trabalho avalia apenas alguns, de muitos, polimorfismos que podem influenciar o desenvolvimento da neoplasia. Dessa forma, o estudo de alguns polimorfismos deve ser interpretado com cautela pois nosso organismo funciona em sua totalidade, com diversas influências genéticas e também ambientais. Ou seja, além das variantes genéticas devemos lembrar que cada indivíduo teve diferentes exposições e contatos ao longo da sua vida que podem também colaborar para o risco de desenvolvimento da neoplasia.

Outro fator importante quando comparamos o trabalho com outros estudos, é a abordagem da população brasileira, que é miscigenada e por isso pode apresentar resultados discrepantes em relação a estudos com outros indivíduos. Sendo que a frequência dos polimorfismos e as exposições ambientais são distintas entre as populações.

8. CONCLUSÃO

A partir das análises realizadas nesse estudo pode-se concluir que na amostra estudada:

Os indivíduos do sexo masculino, pessoas com idade superior a 50 anos, pessoas com baixa escolaridade e que se autodeclararam como brancos apresentaram aumento do risco de desenvolvimento do CCP;

Existe relação entre o consumo de álcool com o aumento do risco de desenvolvimento do CCP;

O consumo de cigarros revelou ser o principal fator de risco de desenvolvimento do CCP, com aumento em três vezes para os indivíduos que cessaram seu consumo e em nove vezes para aqueles que continuaram consumindo;

O consumo de cigarros aumentou o risco de desenvolvimento das neoplasias de cavidade oral, laringe e orofaringe, de maneiras diferentes conforme a região chegando a elevar dezessete vezes para a neoplasia da orofaringe nos indivíduos que ainda fumavam até o momento das entrevistas;

Para a intensidade de consumo de cigarros, pode observar que o grupo de indivíduos que fumavam 20 ou mais cigarros/dia apresentaram maiores riscos em relação aos que consumiam menos, demonstrando que a quantidade da substância também está diretamente relacionada com o risco da doença;

Os polimorfismos dos genes de metabolização de fase I envolvidos na transformação dos compostos do cigarro: *CYP1A1*2A* (rs4646903), *CYP1A1*2C* (rs1048943), *CYP2D6*2* (rs1080985), *CYP2D6*4* (rs3892097), *CYP2D6*10* (rs1065852), *CYP2D6*17* (rs28371706), *CYP2D6*41* (rs28371725) e *CYP3A4*1B* (rs2740574) não foram associados com o risco de desenvolvimento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, inclusive quando analisados em relação aos sítios da cavidade oral, laringe e orofaringe de forma individual;

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os haplótipos do gene *CYP2D6* e os diferentes fenótipos metabolizadores (extensivo, intermediário e lento) quando comparados nos grupos de casos e controles;

Os genes que codificam as subunidades dos receptores nicotínicos *CHRNA3* (rs578776) e *CHRNA5* (rs16969968) não foram associados com o risco de desenvolvimento do CCP e com seus diferentes sítios tumorais;

A presença do polimorfismo *CHRNA5* (rs16969968) em homozigose aumentou duas vezes o risco do indivíduo ter o fenótipo fumante pesado/intenso, ou seja, fumar 20 ou mais cigarros por dia (OR 1,93; IC 1,05-3,58). Dessa forma, mesmo que indiretamente, pode-se considerar que a variante, quando em homozigose, pode aumentar o risco de desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço, uma vez que esta parece modular o consumo de cigarros, que é considerado o principal fator de risco associado a neoplasia aqui estudada.

9. ANEXOS

Anexo A - Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de 1998 – 2001:

**ESTUDO INTERNACIONAL SOBRE AMBIENTE, VÍRUS E DOENÇAS DA
CAVIDADE ORAL E LARINGE****TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO****I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

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

II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. Título do protocolo de pesquisa: "Estudo internacional sobre ambiente, vírus e doenças da cavidade oral e laringe".
 Pesquisadores responsáveis:
 José Eluf Neto, CREMESP: 22183, Professor Doutor, Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da USP.
 Victor Wunsch Filho, CREMESP: 28777, Professor Doutor, Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP.
2. Avaliação do risco da pesquisa:
 Os procedimentos da pesquisa apresentam risco mínimo de ocorrência de algum dano imediato ou tardio para o participante.
3. Duração da pesquisa: agosto de 1998 a julho de 2001.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

São Paulo, _____

_____
(assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal)

(assinatura do pesquisador)

Termo 2003 – 2006:

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Avaliação de Polimorfismos Genéticos em Pacientes com Câncer de Cabeça e Pescoço
2. PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:
 Gilka Jorge Figaro Gattás, CRBM: 2654. Professora Doutora, Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do trabalho - Faculdade de Medicina da USP.
 Marcos Brasilino de Carvalho, CREMESP: 17212. Diretor das Clínicas Cirúrgicas - Hospital Heliópolis - São Paulo, SP
 José Eluf Neto, CREMESP: 22183. Professor Doutor, Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da USP.
 Victor Wunsch Filho, CREMESP: 26777, Professor Doutor, Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP.
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
SEM RISCO	☒ RISCO MÍNIMO	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	
- Os procedimentos da pesquisa apresentam risco mínimo de ocorrência de algum dano imediato ou tardio para o participante.
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : Janeiro de 2003 a Janeiro de 2006

Termo de 2006 – 2008:

**HOSPITAL DAS CLINICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

1.NOME DO PACIENTE.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE N°.....SEXO:M ( ) F ( )

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

Endereço.....N°.....

Complemento:.....BAIRRO:.....

CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD ( ) .....

2.RESPONSÁVEL .....LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO:
M ( ) F ( )

DATA NASCIMENTO:...../...../.....

ENDEREÇO:.....N°
.....APTO:" .....

BAIRRO:.....CIDADE:
.....

CEP:.....TELEFONE:DDD( ).....

II- DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

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

2.PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

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

'''

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

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

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	X RISCO MÍNIMO	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	

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

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

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

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

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

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

1. Qualquer provável benefício do estudo para o bem-estar da população depende da exatidão de suas respostas. Portanto se o(a) Sr.(a) não entender alguma das questões, por favor solicite todos os esclarecimentos que julgar necessário sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa ou qualquer outra dúvida.
2. O(A) Sr.(a) tem a liberdade de não participar do estudo e retirar seu consentimento a qualquer momento deixando de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade de sua assistência oferecida no Hospital Heliópolis.
3. Todas as informações dadas durante a entrevista serão de caráter confidencial e, após colhidas, serão utilizadas somente para os fins científicos descritos no protocolo desta pesquisa, sem qualquer identificação pessoal.

4. Para quaisquer danos à saúde decorrentes dos procedimentos necessários para a pesquisa, como por exemplo a coleta de sangue, você poderá contar com o atendimento no Hospital Heliópolis.

5. Caso seja necessário, você será ressarcido nas despesas decorrentes destes danos.

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

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

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

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

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

Faculdade de Medicina da USP.

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo,   de   de

(assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal)

(assinatura do pesquisador carimbo ou nome Legível)

Anexo B - Aprovações dos Comitês de Ética em pesquisa das instituições envolvidas

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

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

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

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

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

CAPPesq, 09 de Abril de 2003.

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

inscre-se à CPG-FMUSP

as devidas providências.

115/03

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

nº pontou

a. Maria Miltz Brentani
coordenadora do Curso de
atuação do programa
Patologia Experimental

RECEBIDO SPG 115/03

ASS. Juellen

APROVAÇÃO

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

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

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

CAPPesq, 24 de Março de 2005.

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

COMPLEXO HOSPITALAR HELIÓPOLIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

São Paulo, 15 de fevereiro de 2005.

Ao

Dr. Otávio Alberto Curioni.

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

Atenciosamente,

Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
Coordenador

Anexo C - Questionário aplicado no projeto**QUESTIONÁRIO SOBRE HÁBITOS DE VIDA**

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

Nome: _____

Endereço: _____ n.º: ____ apto: ____

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

CEP: _____ Telefone: (____) _____

Entrevistador: _____

INFORMAÇÕES GERAIS

A1 Estado: (1) Caso (2) Controle

A2 Data de nascimento: ____/____/____

A3 Clínica do hospital:

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

A4 Diagnóstico principal da baixa hospitalar: _____**A5** Data da admissão hospitalar ____/____/____**A6** Sexo: (1) Masculino   (2) Feminino**A7** Idade em anos completos _____**A8** Grupo étnico?

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

Cor pele pai: _____ Cor pele mãe: _____

A9 Qual a cidade onde mora?

_____

A10 Há quanto tempo mora nesta cidade?

_____

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

_____

A12 O(a) Sr.(a) freqüentou a escola?   (1) sim   (2) não**A13** Qual o último ano completo que o(a) Sr.(a) terminou na escola?

_____

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

_____

HÁBITO DE FUMAR

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

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

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

Idade início _____ idade que parou _____ tipo cigarro _____ nº/dia _____

Idade início _____ idade que parou _____ tipo cigarro _____ nº/dia _____

Idade início _____ idade que parou _____ tipo cigarro _____ nº/dia _____

Tipo 1: manufaturado, com filtro

Tipo 2: manufaturado, sem filtro

Tipo 3: enroladinho de papel

Tipo 4: enroladinho de palha

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

Idade início _____ idade que parou _____ marca _____ nº/dia _____

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

Idade início _____ idade que parou _____ marca _____ nº/dia _____

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

Idade início _____ idade que parou _____ nº/semana _____

QUESTÕES PARA NÃO FUMANTES

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

(1) sim   (2) não

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

(1) sim   (2) não

HÁBITOS ALIMENTARES

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

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

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

(1) sim   (2) não   (3) não sabe

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

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

C4 Qual o seu peso hoje? ____Kg

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

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

HÁBITOS DE BEBIDA

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

(1) sim   (2) não   (3) só no passado

Unidade:

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

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

Por: (1) dia   (2) semana   (3) mês

Bebida	1 sim/ 2-nao	Idade início	Idade que parou	Unidade	Quantas unidades consome	Por
Cerveja						
Vinho						

Cachaça, vodca, rum						
Licores						

INFORMACÕES SOBRE SAÚDE

QUEIXAS GERAIS

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

Especifique:

E2 Possui casos de câncer na família?

( ) Não ( ) Sim ( ) Não sei

Grau de parentesco   Tipo de Câncer

HISTÓRIA OCUPACIONAL

F1 Qual sua profissão atual?

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

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

F4 Qual sua profissão anterior?

Anexo D - Artigo referente à dissertação aceito para publicação na revista Molecular Genetics and Genomic Medicine (DOI: 10.1002).

Received: 14 February 2019 | Revised: 17 September 2019 | Accepted: 18 September 2019
DOI: 10.1002/mgg3.998

ORIGINAL ARTICLE

Molecular Genetics & Genomic Medicine **WILEY**
Open Access

Polymorphisms of *CHRNA3* and *CHRNA5*: Head and neck cancer and cigarette consumption intensity in a Brazilian population

Mariana R. Silva¹ | Gilka J. F. Gattás¹ | Juliana De Antonio¹ | Isabela Firigato¹ | Otávio A. Curioni² | Fernanda de Toledo Gonçalves¹

¹Departamento de Medicina Legal e Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho, Instituto Oscar Freire, LIM-40, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia, Hospital Heliópolis, São Paulo, Brazil

Correspondence

Mariana Rocha Silva, Departamento de Medicina Legal e Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho, Instituto Oscar Freire, LIM-40, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
Email: marirocha@usp.br

Funding information

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Faculdade de Medicina (FMUSP), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR.

Abstract

Background: Cigarette consumption has been identified as the main non-etiological factor in head and neck cancer (HNC) development. One of the main compounds in cigarettes is nicotine, which binds directly to nicotine acetylcholine receptors (nAChRs) in the body, which are encoded by different genes of the *CHRNA* family. Polymorphisms in some of these genes have been studied in relation to the risk of HNC and cigarette consumption intensity. The aim of this study was to evaluate whether there were associations between the *CHRNA3* (rs578776) and *CHRNA5* (rs16969968) polymorphisms and HNC risk and between the polymorphisms and the intensity of cigarette consumption.

Methods: A total of 1,067 individuals from Heliópolis Hospital in São Paulo were investigated, including 619 patients with HNC and 448 patients without diagnosed tumors. All participants answered a questionnaire about sociodemographic information and cigarette consumption data. The polymorphisms were determined by TaqMan genotyping by real-time PCR.

Results: The polymorphisms studied, rs578776 (*CHRNA3*) and rs16969968 (*CHRNA5*), did not have an association with HNC risk, but the rs16969968 homozygous genotype was associated with increased cigarette consumption intensity (OR 1.93, 95% CI 1.05–3.58).

Conclusion: The polymorphism *CHRNA5* can be considered an indirect risk factor for neoplasms in these Brazilian samples when cigarette consumption increased.

KEYWORDS

CHRNA3, *CHRNA5*, cigarette consumption, head and neck cancer

1 | INTRODUCTION

Tobacco consumption is one of the most common public health problems worldwide, and it is widely consumed via cigarettes (Wen, Jiang, Yuan, Cui, & Li, 2014). Tobacco has been identified as the main risk factor for head and neck

cancer (HNC) development (Colombo & Rahal, 2009; Lacko et al., 2014). HNC is a disease that includes tumors in the regions of the upper aerodigestive tract, such as the oral cavity, larynx, and pharynx. HNC represents the *sixth most common cancer worldwide* and affects more males than females, around 50 years, and with low income (Colombo & Rahal,

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2019 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals, Inc.

Mol Genet Genomic Med. 2019;7:e998.
<https://doi.org/10.1002/mgg3.998>

wileyonlinelibrary.com/journal/mgg3 | 1 of 6

2009; Döbrossy, 2005; Simard, Torre, & Jemal, 2014). In Brazil, in 2018 and 2019, there were approximately 14,700 new cases of oral cancer and 7,670 cases of laryngeal tumors (Instituto Nacional de Câncer José Gomes da Silva, 2018).

There are more than 4,000 different substances in cigarettes, and nicotine is the main ingredient related to their dependence (Siqueira, 2017). After being inhaled, the nicotine can be easily absorbed in the alveoli and enter the systemic circulation, where it is then transported quickly to the brain. This short time period leads to reinforced use, resulting in neuroadaptation (Siqueira, 2017).

Nicotine acts directly in our body by binding to nicotine acetylcholine receptors (nAChRs), which are distributed in the central and peripheral nervous system (Changeux, 2010) and muscle, endothelial, and immune cells (Siqueira, 2017). These receptors are ligand-gated ion channels composed of five subunits, which can be formed by 12 different isoforms, nine α subunits, and three β subunits (Bierut et al., 2008; Siqueira, 2017). The receptor responds to acetylcholine, nicotine, and agonists, and the channels are permeable to cations (Changeux, 2010); some presynaptically located receptors can modulate the release of certain types of neurotransmitters, for example, dopamine, which is a neurotransmitter linked to the reward reinforcement system and pleasure (Herman, DeVito, Jensen, & Sofuoglu, 2014; Wen et al., 2014). The arrangement between these 12 subunits results in receptors that differ in distribution throughout the body, pharmacological properties, and nicotine stimulation responses (Siqueira, 2017; Wen et al., 2014). Repeated exposure to nicotine causes a decrease in the nAChRs response, leading to a desensitization of these receptors (Changeux, 2010). Therefore, an increase in nicotine consumption is needed to result in the same response linked to dopamine effects (Siqueira, 2017; Van Skike et al., 2016).

Nicotine receptor subunits are encoded by *CHRN* which locate on chromosome 15q25.1, the *CHRNA5-A3-B4* cluster encoding $\alpha 5$, $\alpha 3$ and $\beta 4$ subunits, respectively, which may have polymorphisms that have been studied in relation to cigarette smoking and some kinds of diseases. Two variants in these regions, rs578776 (*CHRNA3*, OMIM:118503) and rs16969968 (*CHRNA5*, OMIM:118505), have been associated with both smoking behavior, including smoking quantity, and certain types of neoplasms, for example, HNC (Anantharaman et al., 2014; Changeux, 2010; Lips et al., 2010). The associations of these polymorphisms have also been studied in lung cancer; some of these studies found that the variations are related to smoking quantity and that cigarette smoking is a risk factor for this type of neoplasm. The authors suggest that the polymorphisms indirectly influence the risk of lung cancer (Thorgeirsson et al., 2008). However, other studies have not found an association between smoking behavior and these polymorphisms and suggest that variants influence the risk of lung cancer directly (Amos et al., 2008; Hung et al., 2008). Thus, there is still no consensus on

how these polymorphisms are related to this type of cancer, whether directly or indirectly.

Since the two polymorphisms have been associated with cigarette consumption, this is one of the risk factors for HNC, and the function of these variants in the *CHRNA5/A3/B4* gene cluster in this neoplasm has not been intensively investigated. The aim of this study is to investigate a possible association between the *CHRNA3* (rs578776) and *CHRNA5* (rs16969968) variants and the risk of HNC and the intensity of cigarette consumption in a Brazilian sample population.

2 | METHODS

2.1 | Ethical compliance

The Ethics Committee for Research Projects Analysis of the University of São Paulo, School of Medicine and the Ethics Committee of Heliópolis Hospital of São Paulo, Brazil approved the present study.

2.2 | Population

In this study, we evaluated 1,067 individuals, both gender, over 18 years old, which included 619 patients with a histologically confirmed HNC diagnosis, who were recruited during 2000–2011 from the Heliópolis Hospital. From the same hospital, the control group was recruited including 448 patients with no tumor diagnosis and familial HNC history, frequency matched with HNC patients for gender and age within 5 years. The control group included only individuals recently diagnosed with diseases unrelated to tobacco or alcohol, such as digestive system disorders, injuries and diseases of the musculoskeletal system and connective tissue, genitourinary system, or circulatory system. All participants answered a standardized questionnaire on age, gender, skin color, education, and smoking status (nonsmoker, former smoker, or current smoker). Subjects who had stopped smoking for at least 12 months before the interview were classified as former smokers, and those who still smoked until the interview were classified as current smokers. Participants signed an informed consent form approved by the Ethics Committee. The minimum frequency necessary to obtain a significant sample size was 358 cases and 358 controls.

2.3 | DNA extraction

Genomic DNA was assessed from 5 ml of peripheral blood lymphocytes through the salting-out extraction method (Miller, Dykes, & Polesky, 1988), wherein the whole volume of blood was treated twice with erythrocyte lysis buffer (1-mM NH_4HCO_3 ; 114-mM NH_4Cl) for 15 min each time. Next, lymphocytes were incubated overnight at 37°C with 0.01 ml of TEN buffer (0.1-M Tris-Cl; 0.01-M EDTA; 1-M NaCl), 0.2 ml

of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 0.5 ml of a proteinase K solution. Saturated NaCl solution (6 M) was then added and mixed. The pellet was discarded, and the supernatant was washed with absolute ethanol to precipitate the DNA, which was eluted in TE solution (buffer solution with Tris- HCL + EDTA [Ethylenediamine tetraacetic acid]) (10-mM Tris; 1-mM EDTA). After extraction, the genomic DNA quantity and quality were assessed under wavelengths of 260 nm (A260) and 280 nm (A280) using a spectrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific™). An A260/A280 ratio between 1.8 and 2.2 was used to classify the samples as high genomic DNA quality.

2.4 | Genotyping and statistical analysis

The *CHRNA3* (rs578776-NG_016143.1) and *CHRNA5* (rs16969968-NG_023328.1) polymorphisms were determined using TaqMan single nucleotide polymorphism (SNP) Genotyping Assays C_721253_10 and C_26000428_20, respectively, whose amplifications were conducted according to the manufacturer's instructions and performed on a Step One-Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

The Hardy–Weinberg equilibrium was evaluated using the χ^2 test. To assess the possible association between polymorphisms and HNC risk, we used logistic regression analysis, which considered HNC as a dependent variable and the polymorphism, gender, skin color, age, and education level

and tobacco consumption as covariates in the model. Odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals were also calculated. Then, classical statistical analyses were also performed to evaluate the possible association between the genetic variants of *CHRNA3* and *CHRNA5* and cigarette consumption intensity. For this analysis, we considered the total sample of individuals (cases and controls) who answered that they are former smoker and current smoker, independently of the tumor present. We adjusted the analysis for the gender, age, and cancer present. All analyses were performed using SPSS (Statistical Package for Social Sciences, v.18.0).

3 | RESULTS

We conducted the analysis of our patients by first separating the individuals in the HNC patients and the control group. Demographic characteristics of cases and controls are summarized in Table 1, where significant differences were found between the groups for gender distribution ($p = .004$), skin color distribution ($p = .002$), age ($p = .004$), educational level ($p = .008$), and tobacco use ($p = .001$).

The genes studies were in Hardy–Weinberg equilibrium (data not shown). We evaluated the possible association between the *CHRNA3* (rs578776) and *CHRNA5* (rs16969968) polymorphisms and HNC risk. However, our results did not

TABLE 1 Sociodemographic data, educational level, skin color, and tobacco consumption of head and neck cancer (619) and control (448) patients

Factor	Category	Control		Patient		χ^2	p	OR	p	95% IC	
		N	%	N	%						
Gender	Female	71	15.8	61	9.9	8.55	.003*	1.00	—	—	—
	Male	377	84.2	557	90.1			1.72			
	Missing	0	—	1	0.2						
Skin color	White	258	58.4	417	67.7	9.69	.002*	1.00	—	—	—
	No white	184	41.6	199	32.3			0.67			
	Missing	6	1.3	3	0.5						
Age (years)	≤50	184	41.2	201	32.5	8.39	.004*	1.00	—	—	—
	>50	263	58.8	417	67.5			1.45			
	Missing	1	0.2	1	0.2						
Education level	>11 years	60	14.1	54	8.7	7.42	.025*	1.00	—	—	—
	8–11 years	104	24.4	159	25.7			1.70			
	0–8	262	61.5	405	65.5			1.72			
	Missing	22	5.0	1	0.2						
Tobacco user	Never	119	26.7	31	5.0	134.16	<.001*	1.00	—	—	—
	Former	124	27.8	112	18.2			3.48			
	Current	202	45.4	472	76.8			8.97			
	Missing	3	0.7	4	0.6						

Abbreviation: OR, odds ratio.

* $p < .05$.

show a statistically significant association between both SNPs and neoplasm risk, as described in Table 2.

Then, we evaluated the possible association between the polymorphisms and the cigarette consumption intensity in the total sample of individuals who answered that they are former smoker (236) and current smoker (674), independently of the tumor present. For the analysis of cigarette consumption, the sample was separated into two groups: people who smoked until 20 cigarettes per day (CPD) and people who smoked 20 or more CPD, regardless of whether they had neoplasms. The individuals who declared that they never smoked were excluded from this analysis.

The genotype frequencies of the *CHRNA3* polymorphism (rs578776) were similar in both groups. These results showed no association between the *CHRNA3* polymorphism and tobacco consumption intensity (Table 3).

In relation to the *CHRNA5* (rs16969968) SNP, our results showed that the homozygous genotype was associated with increased cigarette consumption intensity (OR 1.93, 95% CI 1.05–3.58), as shown in Table 4.

4 | DISCUSSION

Cigarette smoking has been considered the main risk factor for HNC because cigarettes have many substances with

carcinogenic potential (Colombo & Rahal, 2009; Simard et al., 2014). Nicotine is the major substance present in the cigarette and binds directly to nAChRs. Several studies have shown associations between polymorphisms present in genes that encode the subunits of these receptors, such as *CHRNA3* (rs578776) and *CHRNA5* (rs16969968), and cigarette consumption and/or HNC risk (Anantharaman et al., 2014; Chen et al., 2011; Doyle et al., 2014; Jensen et al., 2015; Lips et al., 2010; Munafò et al., 2012; Qu et al., 2016; Wen et al., 2014).

In the present study, we did not find any association between the polymorphisms of the *CHRNA3* (rs578776) and HNC risk or with the quantity of cigarette consumed. The variant of *CHRNA3* (C > T) is present in the 3' untranslated region of the gene and contains regulatory sequences (Bierut et al., 2008; Conlon & Bewick, 2011). Whether this polymorphism results in a functional change or if this tag is another polymorphism in the same region is not clear (Conlon & Bewick, 2011). Some studies have suggested that the C allele is considered a risk allele because the presence of an increased activation circuit that may be sensitive to nicotine exposure and the presence of the T allele may have a protective effect because of normal rewarding sensibility, that is, in relation to the wild allele, the polymorphic allele eases the reward system (Robinson et al., 2013). However, functional studies are necessary to elucidate the real function of this variant.

TABLE 2 Distribution of the *CHRNA3* (rs578776) and *CHRNA5* (rs16969968) polymorphisms of the head and neck cancer (619) and control (448) groups

	Controls		Cases		χ^2	<i>p</i>	OR	<i>p</i>	IC 95%
	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%					
CHRNA3									
Genotype									
CC	167	37.4	227	36.8	1.144	.56	1.00	—	—
CT	207	46.4	303	49.1			0.239	1.196	0.888–1.611
TT	72	16.1	87	14.1			0.746	1.071	0.706–1.625
Missing	2	0.4	2	0.3					
Allele									
C	270.5	60.6	378.5	61.35			1.00	—	—
T	175.5	39.4	238.5	38.65			0.97	.85	0.75–1.25
CHRNA5									
Genotype									
GG	246	55	320	51.8	1.298	.52	1.00	—	—
GA	160	35.8	242	39.2			0.54	1.096	0.818–1.469
AA	41	9.2	56	9.1			0.27	.763	0.473–1.233
Missing	1	0.2	1	0.2					
Allele									
G	326	72.9	441	71.4			1.00	—	—
A	121	27.1	177	28.6			1.08	.58	0.82–1.42

Abbreviation: OR, odds ratio.

TABLE 3 Relation between the *CHRNA3* (rs578776) polymorphism and tobacco consumption intensity

	Until 20 CPD	≥20 CPD	OR	<i>p</i>	IC 95%
<i>CHRNA3</i>					
Genotype					
CC	76 (33.8%)	261 (38.7%)	1.00	—	—
CT	112 (49.8%)	323 (47.8%)	0.84	.31	0.60–1.17
TT	37 (16.4%)	91 (13.5%)	0.72	.18	0.45–1.14
Allele					
C	132 (58.7%)	422.5 (62.6%)	1.00	—	—
T	93 (41.3%)	252.5 (37.4%)	0.85	.30	0.63–1.16

Abbreviations: CPD, cigarettes per day; OR, odds ratio.

TABLE 4 Relation between *CHRNA5* (rs16969968) polymorphism and tobacco consumption intensity

	Until 20 CPD	≥20 CPD	OR	<i>p</i>	IC 95%
<i>CHRNA5</i>					
Genotype					
GG	118 (52.4%)	348 (51.4%)	1.00	—	—
GA	94 (41.7%)	254 (37.6%)	0.91	.63	0.67–1.25
AA	13 (5.9%)	74 (11%)	1.93	.03	1.05–3.58
Allele					
G	165 (73.25%)	475 (70.2%)	1.00	—	—
A	60 (26.75%)	201 (29.8%)	1.16	.39	0.82–1.65

Abbreviations: CPD, cigarettes per day; OR, odds ratio.

In relation to the rs16969968 polymorphism, we did not find an association between the variant genotypes and the risk of HNC, but we found an association between the mutated homozygous genotype and increased cigarette consumption (OR 1.93, 95% CI 1.05–3.58), suggesting that the variation in *CHRNA5* acts indirectly in the risk of HNC. The *CHRNA5* (G > A) polymorphism results in an amino acid change from aspartic acid to asparagine in the nicotine acetylcholine subunit $\alpha 5$. Studies suggest that the presence of asparagine confers a decreased interaction of the receptor with nicotine and our agonists than the presence of wild subunit $\alpha 5$, with reduced channel permeability and faster desensitization (Bierut et al., 2008; Stephens et al., 2013). The association of the polymorphism and increased cigarette consumption has also been found in other populations, including European American, African American, Central European, Latin Americans, and Romans (Jensen et al., 2015; Lips et al., 2010). Some studies suggest that the mutated allele is related to a decrease in the stimulatory effects of nicotine, and thus, people with this allele would consume more of the substance to have the same effects (Wen et al., 2014). Another study posits that the allele diminishes the aversive effects of nicotine and that people can consume more of the substance (Fowler & Kenny, 2014; Jensen et al., 2015). Once the $\alpha 5$ subunit is abundantly expressed in dopaminergic neurons (Changeux, 2010) and it modulates dopamine release, individuals with the mutated subunit $\alpha 5$, which have the lowest affinity for nicotine, may require higher nicotine consumption to achieve the same pathways for dopamine release (Bierut et al., 2008; Van Skike et al., 2016).

In conclusion, the *CHRNA3* (rs578776) variant was not associated with HNC risk or with the cigarette consumption intensity in our sample population. In these Brazilian samples, the polymorphism *CHRNA5* (rs16969968) was associated with increased intensity of cigarette smoking, acting as an indirect factor for HNC risk.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all participating patients for their contributions to this study.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

ORCID

Mariana R. Silva <https://orcid.org/0000-0001-9339-6726>

Isabela Firigato <https://orcid.org/0000-0002-6118-948X>

REFERENCES

- Amos, C. I., Wu, X., Broderick, P., Gorlov, I. P., Gu, J., Eisen, T., ... Houlston, R. S. (2008). Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nature Genetics*, 40(5), 616–622. <https://doi.org/10.1038/ng.109>
- Anantharaman, D., Chabrier, A., Gaborieau, V., Franceschi, S., Herrero, R., Rajkumar, T., ... McKay, J. D. (2014). Genetic variants in nicotine addiction and alcohol metabolism genes, oral cancer risk and

- the propensity to smoke and drink alcohol: A replication study in India. *PLoS ONE*, 9(2), e88240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088240>
- Bierut, L. J., Stitzel, J. A., Wang, J. C., Hinrichs, A. L., Gruzza, R. A., Xuei, X., ... Goate, A. M. (2008). Variants in the nicotinic receptors alter the risk for nicotine dependence. *The American Journal of Psychiatry*, 165(9), 1163–1171.
- Changeux, J. P. (2010). Nicotine addiction and nicotinic receptors: Lessons from genetically modified mice. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(6), 389–401. <https://doi.org/10.1038/nrn2849>
- Chen, D., Truong, T., Gaborieau, V., Byrnes, G., Chabrier, A., Chuang, S.-C., ... McKay, J. D. (2011). A sex-specific association between a 15q25 variant and upper aerodigestive tract cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 20(4), 658–664. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-1008>
- Colombo, J., & Rahal, P. (2009). Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. *Revista Brasileira De Cancerologia*, 55(2), 165–174.
- Conlon, M. S., & Bewick, M. A. (2011). Single nucleotide polymorphisms in *CHRNA5* rs16969968, *CHRNA3* rs578776, and *LOC123688* rs8034191 are associated with heaviness of smoking in woman in Northeastern Ontario, Canada. *Nicotine & Tobacco Research*, 13(11), 1076–1083.
- Döbrossy, L. (2005). Epidemiology of head and neck cancer: Magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Reviews*, 24(1), 9–17. <https://doi.org/10.1007/s10555-005-5044-4>
- Doyle, G. A., Chou, A. D., Saung, W. T., Lai, A. T., Lohoff, F. W., & Berettini, W. H. (2014). Identification of *CHRNA5* rare variants in African-American heavy smokers. *Psychiatric Genetics*, 24(3), 102–109. <https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000029>
- Fowler, C. D., & Kenny, P. J. (2014). Nicotine aversion: Neurobiological mechanisms and relevance to tobacco dependence vulnerability. *Neuropharmacology*, 76, 533–544. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.09.008>
- Herman, A. I., DeVito, E. E., Jensen, K. P., & Sofuoglu, M. (2014). Pharmacogenetics of nicotine addiction: Role of dopamine. *Pharmacogenomics*, 15(2), 221–234. <https://doi.org/10.2217/pgs.13.246>
- Hung, R. J., McKay, J. D., Gaborieau, V., Boffetta, P., Hashibe, M., Zaridze, D., ... Brennan, P. (2008). A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature*, 452(7187), 633–637.
- Instituto Nacional de Câncer José Gomes da Silva. (2018). Estimativa 2018: Incidência do câncer no Brasil. Retrieved from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>
- Jensen, K. P., DeVito, E. E., Herman, A. I., Valentine, G. W., Gelernter, J., & Sofuoglu, M. (2015). A *CHRNA5* smoking risk variant decreases the aversive effects of nicotine in humans. *Neuropsychopharmacology*, 40(12), 2813–2821. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.131>
- Lacko, M., Braakhuis, B. J. M., Sturgis, E. M., Boedeker, C. C., Suárez, C., Rinaldo, A., ... Takes, R. P. (2014). Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 89(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.09.034>
- Lips, E. H., Gaborieau, V., McKay, J. D., Chabrier, A., Hung, R. J., Boffetta, P., ... Brennan, P. (2010). Association between a 15q25 gene variant, smoking quantity and tobacco-related cancers among 17 000 individuals. *International Journal of Epidemiology*, 39(2), 563–577. <https://doi.org/10.1093/ije/dyp288>
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
- Munafò, M. R., Timofeeva, M. N., Morris, R. W., Prieto-Merino, D., Sattar, N., Brennan, P., ... Davey Smith, G. (2012). Association between genetic variants on chromosome 15q25 locus and objective measures of tobacco exposure. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(10), 740–748. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs191>
- Qu, X., Wang, K., Dong, W., Shen, H., Wang, Y., Liu, Q., & Du, J. (2016). Association between two *CHRNA3* variants and susceptibility of lung cancer: A meta-analysis. *Scientific Reports*, 6(1), <https://doi.org/10.1038/srep20149>
- Robinson, J. D., Versace, F., Lam, C. Y., Minnix, J. A., Engelmann, J. M., Cui, Y., ... Cinciripini, P. M. (2013). The *CHRNA3* rs578776 variant is associated with an intrinsic reward sensitivity deficit in smokers. *Frontiers in Psychiatry*, 23, 2013. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2013.00114>
- Simard, E. P., Torre, L. A., & Jemal, A. (2014). International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncology*, 50(5), 387–403. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.01.016>
- Siqueira, M. L. (2017). Nicotine and Tobacco as substances of abuse in children and adolescents. *Pediatrics*, 1(139), 1–15. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-3436>
- Stephens, S. H., Hartz, S. M., Hoft, N. R., Saccone, N. L., Corley, R. C., Rewitt, J. K., ... Ehringer, M. A. (2013). Distinct loci in the *CHRNA5/CHRNA3/CHRNA4* gene cluster are associated with onset of regular smoking. *Genetic Epidemiology*, 37(8), 846–859.
- Thorgeirsson, T. E., Geller, F., Sulem, P., Rafnar, T., Wiste, A., Magnusson, K. P., ... Stefansson, K. (2008). A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*, 452(7187), 638–642.
- Van Skike, C. E., Maggio, S. E., Reynolds, A. R., Casey, E. M., Bardo, M. T., Dwoskin, L. P., ... Nixon, K. (2016). Critical needs in drug discovery for cessation of alcohol and nicotine polysubstance abuse. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 65(4), 269–287. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.11.004>
- Wen, L., Jiang, K., Yuan, W., Cui, W., & Li, M. D. (2014). Contribution of variants in *CHRNA5/A3/B4* gene cluster on chromosome 15 to tobacco smoking: From genetic association to mechanism. *Molecular Neurobiology*, 53(1), 472–484. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8997-x>

How to cite this article: Silva MR, Gattás GJF, De Antonio J, Firigato I, Curioni OA, Gonçalves FT. Polymorphisms of *CHRNA3* and *CHRNA5*: Head and neck cancer and cigarette consumption intensity in a Brazilian population. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7:e998. <https://doi.org/10.1002/mgg3.998>

Anexo E – Tabelas de comparação entre as variáveis sociodemográficas nos grupos de indivíduos com a neoplasia de cavidade oral, laringe e orofaringe e o grupo de controles:

Tabela Anexo - Comparação entre as variáveis sociodemográficas nos grupos de indivíduos com câncer de cavidade oral e o grupo controle

Variáveis	Categorias	CAVIDADE ORAL		Controle		OR	p	95%IC	
		N	%	N	%				
Sexo	Feminino	31	13,2	71	15,8	1	-	-	-
	Masculino	204	86,8	377	84,2	1,24	0,36	0,79	1,95
	Total	235	100	448	100				
Cor de Pele	Branco	158	67,8	258	58,4	1	-	-	-
	Não branco	75	32,2	184	41,6	0,67	0,017*	0,48	0,93
	Total	233	100	442	100				
Idade (anos)	≤50	87	37,0	184	41,2	1	-	-	-
	>50	148	63,0	263	58,8	1,19	0,294	0,86	1,65
	Total	235	100	447	100				
Escolaridade	>11 anos	14	8,7	60	14,1	1	-	-	-
	8 a 11 anos	61	25,7	104	24,2	2,51	0,0064	1,29	4,84
	0 a 8 anos	160	65,5	262	61,5	2,62	0,0014	1,44	4,74
	Total	235	100	426	100				

*p<0,05

Tabela Anexo – Comparação entre as variáveis sociodemográficas nos grupos de indivíduos com câncer de laringe e o grupo controle

Variáveis	Categorias	LARINGE		Controle		OR	p	95%IC	
		N	%	N	%				
Sexo	Feminino	16	10,7	71	15,8	1	-	-	-
	Masculino	133	89,3	377	84,2	1,57	0,13	0,88	2,79
	Total	149	100	448	100				
Cor de Pele	Branco	107	71,8	258	58,4	1	-	-	-
	Não branco	42	28,2	184	41,6	0,55	0,004*	0,37	0,82
	Total	149	100	442	100				
Idade (anos)	≤50	39	26,2	184	41,2	1	-	-	-
	>50	110	73,8	263	58,8	1,97	0,001*	1,31	2,98
	Total	149	100	447	100				
Escolaridade	>11 anos	15	10,1	60	14,1	1	-	-	-
	8 a 11 anos	38	25,5	104	24,2	1,46	0,32	0,75	2,83
	0 a 8 anos	96	64,4	262	61,5	1,47	0,25	0,80	2,76
	Total	235	100	426	100				

*p<0,05

Tabela Anexo – Comparação entre as variáveis sociodemográficas nos grupos de indivíduos com câncer de orofaringe e o grupo controle

Variáveis	Categorias	OROFARINGE		Controle		OR	p	95%IC	
		N	%	N	%				
Sexo	Feminino	9	6,1	71	15,8	1	-	-	-
	Masculino	139	93,9	377	84,2	2,91	<0,001	1,42	5,98
	Total	148	100	448	100				
Cor de Pele	Branco	95	64,2	258	58,4	1	-	-	-
	Não branco	53	35,8	184	41,6	0,78	0,21	0,53	1,15
	Total	148	100	442	100				
Idade (anos)	≤50	52	35,1	184	41,2	1	-	-	-
	>50	96	64,9	263	58,8	1,29	0,19	0,88	1,90
	Total	148	100	447	100				
Escolaridade	>11 anos	18	12,2	60	14,1	1	-	-	-
	8 a 11 anos	34	23,0	104	24,2	1,09	0,87	0,57	2,11
	0 a 8 anos	96	64,9	262	61,5	1,22	0,57	0,70	2,21
	Total	148	100	426	100				

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agúndez JAG, Gallardo L, Ledesma MC, Lozano L, Rodriguez-Lescure A, Pontes JC, et al. Functionally Active Duplications of the *CYP2D6* gene are more prevalent among larynx and lung cancer patients. *Oncology*. 2001; 61(1): 59-63.

Almeida AA, Bandeira CM, Gonçalves AJ, Araújo AJ. Nicotine dependence and smoking habits in patients with head neck cancer. *J Bras Pneumol*. 2014; 40(3): 286-93.

Alsbeih G, Al-Harbi N, Judia SB, Al-Qahtani W, Khoja H, El-Sebaie M, et al. Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) infection and the association with survival in Saudi patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancers*. 2019; 11(6): 1-15.

Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet*. 2008; 40(5): 616-22.

Anantharaman D, Chabrier A, Gaborieau V, Franceschi S, Herrero R, Rajkumar T, et al. Genetic Variants in Nicotine Addiction and Alcohol Metabolism Genes, Oral Cancer Risk and the Propensity to Smoke and Drink Alcohol: A Replication Study in India. *Plos One*. 2014; 9(2): 1-7.

Azarpira N, Ashraf MJ, Khademi B, Darai M, Hakimzadeh A, Abedi E. Study the polymorphism of *CYP3A5* and *CYP3A4* loci in Iranian population with laryngeal squamous cell carcinoma. *Mol Biol Rep*. 2011; 38(8): 5443-8.

Bandeira CM, Almeida AA, Gonçalves AJ. Polimorfismos genéticos da família Citocromo P450 e carcinoma de células escamosas de cavidade oral, faringe e laringe. *Rev. Col. Bras. Cir*. 2014; 41(5): 366-73.

Bernard S, Neville KA, Nguyen AT, Flockhart DA. Interethnic differences in genetic polymorphisms of *CYP2D6* in the U.S. population: clinical implications. *Oncologist*. 2006; 11(2):126-35.

Berthiller J, Straif K, Agudo A, Ahrens W, Bezerra Dos Santos A, Boccia S, et al. Low frequency of cigarette smoking and the risk of head and neck cancer in the INHANCE consortium pooled analysis. *Int J Epidemiol*. 2016; 45(3): 835-45.

Bhat MA, Gandhi G. *CYP2D6* (C2850T, G1846A, C100T) polymorphisms, haplotypes and MDR analysis in predicting coronary artery disease risk in north-west Indian population: A case-control study. *Gene*. 2018; 663: 17-24.

Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Gruzca RA, Xuei X, et al. Variants in the Nicotinic Receptors Alter the Risk for Nicotine Dependence. *Am J Psychiatry*. 2008; 165(9): 1163-71.

Boing AF, Antunes JL, de Carvalho MB, de Góis Filho JF, Kowalski LP, Michaluart P Jr, et al. How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk? *J Epidemiol Community Health*. 2011; 65(8): 709-14.

Brown KF, Rungay H, Dunlop C, Ryan M, Quartly F, Cox A. The fraction of cancer attributable to modifiable risk factor in England, Wales, Scotland, Northern Ireland, and the United Kingdom in 2015. *British Journal of Cancer*. 2018; 118:1130-41.

Cadoni G, Boccia S, Petrelli L, Digiannantonio P, Arzani D, Giorgio A, et al. A Review of Genetic Epidemiology of head and Neck Cancer Related to Polymorphisms in Metabolic Genes, Cell Cycle Control and Alcohol Metabolism. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2012; 32(1):1-11.

Campana IG, Goiato MC. Tumores de cabeça e pescoço: epidemiologia, fatores de risco, diagnóstico e tratamento. *Rev Odontol Araçatuba*. 2013; 34(1): 20-6

Cardena MMSG, Ribeiro-dos-Santos, A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the Relationship between self-declared ethnicity,

mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilians individuals. *PLoSOne*. 2013; 8(4):1-6 .

Carrard VC, Pires AS, Paiva RL, Chaves ACM, Sant'ana Filho M. Álcool e Câncer Bucal: Considerações sobre os Mecanismos Relacionados. *Rev. Bras. Cancerol*. 2008; 54(1):49-56.

Casati MFM, Vasconcelos JA, Verghanini GS, Contreiro PF, da Graça TB, Kanda JL, et al. Epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço no Brasil: estudo transversal de base populacional. *Rev. Bras. Cir. Cabeça e Pescoço*. 2012; 41(4):186-91.

Changeux JP. Nicotine addiction and nicotine receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosc*. 2010; 11(6):389-401.

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

Colombo J, Rahal P. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. *Rev Bras Cancerol*. 2009; 55(2):165-74.

Conway DI, Brenner DR, McMahon AD, Macpherson ML, Agudo A, Ahrens W, et al. Estimating and explaining the effect of education and income on head and neck cancer risk: INHANCE consortium pooled analysis of 31 case-control studies from 27 countries. *Int J Cancer*. 2015; 136(5):1125-39.

Depinho RA. The Age of Cancer. *Nature*. 2000; 408: 248-54.

Di Credico G, Edefonti F, Polesel J, Pauli F, Torelli N, Serraino D, et al. Joint effects of intensity and duration of cigarette smoking on the risk of head and neck cancer: A bivariate spline model approach. *Oral Oncol*. 2019; 94:47-57.

Döbrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: Magnitude of the problem. *Cancer and Metastasis Rev*. 2005; 24(1): 9-17.

Escobedo LG; Peddicord JP. Smoking prevalence in US birth cohorts: the influence of gender and education. *Am J Public Health*. 1996; 86(2):231-6.

Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR, Van der San LC, Ferreira ME, Pires RC, et al. The role of common variants of *ABCB1*, *CYP3A4*, and *CYP3A5* genes in lipid lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin Pharmacol Ther*. 2005; 78(5):551-8.

Friedrich DC, Genro JP, Sortica VA, Suarez-Kurtz G, de Moraes ME, Pena SD, et al. Distribution of CYP2D6 Alleles and Phenotypes in the Brazilian Population. *Plos One*. 2014; 9(10): 1-8.

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

Gajecka M, Rydzanicz M, Jaskula-Sztul R, Kujawski M, Szyfter W, Szyfter K. *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *NAT2*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms or their combinations are associated with the increased risk of the laryngeal squamous cell carcinoma. *Mutat Res*. 2005; 574(1-2):112-23.

García-Martín E, Marínez C, Pizarro RM, García-Gamito FJ, Gullsten H, Raunio H, et al. *CYP3A4* variant alleles in white individuals with low *CYP3A4* enzyme activity. *Clin Pharmacol Ther*. 2002; 71(3):196-204.

Gattás GJF, Carvalho MB, Siraque MS, Curioni OA, Kohler P, Eluf-Neto J, et al. Genetic polymorphisms of *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, and *GSTT1* associated with Head and Neck Cancer. *Head Neck*, 2006; 28(9): 819-26.

GLOBOCAN – *Global Cancer Observatory*. Cancer Tomorrow [Acesso em 10 maio 2019]. France: IARC. Disponível em: [http:// http://gco.iarc.fr/](http://gco.iarc.fr/).

Hahn M, Hagedorn G, Kuhlisch E, Schackert HK, Eckelt U. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity cancer. *Oral Oncol*. 2002; 38(5):486-90.

Han J, Wang I, Yang Y, Zhang J. Meta-analyses of the effect of *CYP1A1* and *CYP2D6* polymorphisms on the risk of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Res Treat*. 2014; 37(7-8): 406-11.

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

Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. Genetic linkage of lung cancer associated *MspI* polymorphism with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P4501A1 gene. *Journal of Biochemistry*. 1991; 110(3):407-11.

Herman AI, DeVito EE, Jensen KP, Sofuoglu M. Pharmacogenetics of nicotine addiction: role of dopamine. *Pharmacogenomics*. 2014; 15(2): 221-34.

Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk (review). *Int J Oncol*. 2008; 32(5): 945-73.

Ho T, Wei Q, Sturgis EM. Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 2007; 29(7): 682-99.

Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature*. 2008; 452(7187):633-7.

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Gomes da Silva. Estimativa 2018: Incidência do câncer no Brasil. 2018 [Acesso em 10 janeiro 2019] . Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>.

Ingelman-Sundberg M. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004; 369(1):89–104.

Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics JI*. 2005; 5(1): 6-13.

Jelski W, Szmitkowski M. Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases. *Clin Chim Acta*. 2008; 395(12):1-5.

Jensen KP, De Vito EE, Herman AI, Valentine GW, Gelernter J, Sofuoglu M. A *CHRNA5* smoking risk variant decreases the aversive effects of nicotine in humans. *Neuropsychopharmacology*. 2015; 40(12): 2813-21.

Kawakita D, Matsuo K. Alcohol and head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2017; 36: 425-34.

Lacko M, Ophuis MBO, Peters W, Manni JJ. Genetic Polymorphisms of Smoking-related Carcinogen Detoxifying Enzymes and Head and Neck Cancer Susceptibility. *Anticancer Res*. 2009; 29(2): 753-62.

Lacko M, Braakhuis BJ, Sturgis EM, Boedeker CC, Suárez C, Rinaldo A, et al. Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014; 89(1):38-48.

Lee YA, Li S, Chen Y, Li Q, Chen CJ, Hsu WL, et al. Tobacco smoking, alcohol drinking, betel qud chewing, and the risk of head and neck cancer in an East Asian population. *Head Neck*. 2019; 41(1): 92-102.

Lee WT, Hsiao JR, Ou CY, Huang CC, Chang CC, Tsai ST, et al. The influence of prediagnosis alcohol consumption and the polymorphisms of ethanol metabolizing genes on the survival of head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019; 28(2):248-57.

Leme CDV, Raposo LS, Ruiz MT, Biselli JM, Galbiatti ALS, Maniglia JV, et al. Análise dos Genes *GSTM1* e *GSTT1* em Pacientes com Câncer de Cabeça e Pescoço. *Rev. Ass. Med. Bras*. 2010; 56(3): 299-303.

Leoncini E, Vukovic V, Cadoni G, Pastorino R, Arzani D, Bosetti C, et al. Clinical features and prognostic factors in patients with head and neck cancer: Results from a multicentric study. *Cancer Epidemiol.* 2015; 39(3):367-74.

Lips EH, Gaborieau V, McKay JD, Chabrier A, Hung RJ, Boffetta P, et al. Association between a 15q25 gene variant, smoking quantity and tobacco-related cancers among 17 000 individuals. *Int J Epidemiol.* 2010; 39(2): 563–77.

Losi-Guembarovski R, Cólus IM, de Menezes RP, Poliseli F, Chaves VN, Kuasne H, et al. Lack association among polymorphic xenobiotic-metabolizing enzyme genotypes and the occurrence and progression of oral carcinoma in a Brazilian population. *Anticancer Res.* 2008; 28(2A):1023-8.

Loureiro AM, Mascio PD, Medeiros MHG. Formação de adutos exocíclicos com base de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Quím. Nova.* 2002; 25(5): 777-93.

Lubin JH, Muscat J, Gaudet MM, Olshan AF, Curado MP, Dal Maso L, et al. An examination of male and female odds ratios by BMI, cigarette smoking and alcohol consumption for cancers of the oral cavity, pharynx and larynx in pooled data from 15 case-control studies. *Cancer Causes Control.* 2011; 22(9):1217-31.

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

Marcu LG, Yeoh E. A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009; 135(10):1303-14.

Marques CFS, Koifman S, Koifman RJ, Boffeta P, Brennan P, Hatagima A. Influence of *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM3* and *NAT2* genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: Results from a case-control study in Rio de Janeiro. *Oral Oncol.* 2006; 42(6):632-7.

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

Menvielle G, Luce D, Goldberg P, Leclerc A. Smoking, alcohol drinking, occupation exposures and social inequalities in hypopharyngeal and laryngeal cancer, *Int J Epidemiol*. 2004; 33(4):799-806.

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

Monteiro CD, Reis AAS, Júnior RLS, Curado MP, Cruz AD. O polimorfismo de *CYP1A1* e a susceptibilidade ao carcinoma oral. *EVS*. 2012; 39(2): 189-97.

Monteiro SCM, Souza IH, Belfort IKP, Nunes JD, Penha BAS, Santos M, et al. Genetic variability of *CYP3A4* in a heterogeneous Brazilian population from Maranhão. *Genet Mol Res*. 2016; 15(1):1-6.

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

Nebert DW, Dalton TP. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(12): 947-60.

Nogal A, Coelho A, Catarino R, Morais A, Lobo F, Medeiros R. The *CYP3A4*1B* polymorphism and prostate cancer susceptibility in a Portuguese population. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007; 177(2):149-52.

Pérez-Morales R, Gonzáles-Zamora A, Gonzáles-Delgado MF, Rincón EYC, Calderón EHO, Martínez-Ramírez O, et al. *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 polymorphisms are associated with heavy smoking, lung cancer, and chronic obstructive pulmonary disease in a Mexican population. *Ann Hum Genet*. 2018; 86(2):415-24.

Qu X, Wang K, Dong W, Shen H, Wang Y, Liu Q, et al. Association between two *CHRNA3* variants and susceptibility of lung cancer: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2016; 6:1-9.

Reska E, Wasowicz W, Gromadzinska J. Genetic polymorphism of xenobiotic metabolising enzymes, diet and cancer susceptibility. *Br J Nutr*. 2006; 96(4): 609-19.

Rezende LFM, Lee DH, Louzada MLC, Song M, Giovannucci E, Eluf-Neto. Proportion of cancer cases and deaths attributable to lifestyle risk factors in Brazil. *Cancer Epidemiol*. 2019; 59:148-57.

Robinson JD, Versace F, Lam CY, Minnix JA, Engelmann JM, Cui Y et al. The *CHRNA3* rs578776 variant is associated with an intrinsic reward sensitivity deficit in smokers. *Front Psychiatry*. 2013; 4(114):1-11.

Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene*. 2006; 25(11): 1679-91.

Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone NL, Chase GA, Konvicka K, Madden PAF, et al. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Hum Mol Genet*. 2007; 16(1):36-49.

Saccone NL, Wang JC, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Saccone SF, et al. The *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer Res*. 2009; 69(17):6848-56.

Saccone NL, Culverhouse RC, Schwantes-An TH, Cannon DS, Chen X, Cichon S, et al. Multiple independent loci at chromosome 15q25.1 affect smoking quantity: a meta-analysis and comparison with lung cancer and COPD. *PLoS Genetics*. 2010; 6(8): 1-16.

Sato M, Sato T, Izumo T, Amagasa T. Genetically high susceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined of *CYP1A1* and *GSTM1* genes. *Oral Oncol.* 2000; 36(3):267-71.

Seitz HK, Stickel F, Homann N. Pathogenetic Mechanisms of Upper Aerodigestive Tract Cancer in Alcoholics. *Inter J Cancer.* 2004; 108(4):483-7.

Shukla P, Gupta D, Pant MC, Parmar D. *CYP2D6* polymorphism: A predictor of susceptibility and response to chemoradiotherapy in head and neck cancer. *J Cancer Res Ther.* 2012; 8(1):40-5.

Silveira VS, Canalle R, Scrideli CA, Queiroz RG, Tone LG. Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes in a Brazilian population. *Biomarkers.* 2009; 14(2): 111-7.

Simard EP, Torre LA, Jemal A. International Trends in Head and Neck Cancer Incidence Rates: Differences by Country, Sex and Anatomic Site. *Oral Oncol.* 2014; 50(5): 387-403.

Singh RD, Haridas N, Shah FD, Patel JB, Shukla SN, Patel PS. Gene polymorphisms, tobacco exposure and oral cancer susceptibility: a study from Gujarat, West India. *Oral Dis.* 2014; 20(1):84-93.

Singh SA, Choudhury JH, Kapfo W, Kundu S, Dhar B, Laskar S, et al. Influence of the *CYP1A1* T301C polymorphism on tobacco and alcohol-associated head and neck cancer susceptibility in Northeast India. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16(16): 6953-61.

Siqueira ML. Nicotine and Tobacco as substances of abuse in children and adolescents. *Pediatrics.* 2017; 1(139):1-15.

Sistonen J, Sajantila A, Lao O, Corander J, Barbujani G, Fuselli S. *CYP2D6* worldwide genetic variations shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. *Pharmacogenet Genomics.* 2007; 17(2): 93-101.

Sistonen J. *Pharmacogenetic Variation at CYP2D6, CYP2C9 and CYP2C19: Population Genetic and Forensic Aspects*. [Dissertação]. Finlândia: Faculdade de Helsink; 2008.

Stevens VL, Bierut LJ, Talbot JT, Wang JC, Sun J, Hinrichs AL, et al. Nicotinic Receptor Gene Variants Influence Gene Variants Influence Susceptibility to Heavy Smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; 17(12): 3517-25.

Tanimotoa K, Hayashib S, Yoshigaa K, Ichikawaa T. Polymorphisms of the *CYP1A1* and *GSTM1* gene involved in oral squamous cell carcinoma in association with a cigarette dose. *Oral Oncol*. 1999; 35(2):191-6.

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

Valente D, Costa-Amaral IC, Santos MVC, Castro VS, Rodrigues DRF, Falco AD, et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. *RBSO*. 2017; 42(1):1-21.

Van Skike CE, Maggio SE, Reynolds AR, Casey EM, Bardo MT, Dwoskin LP, et al. Critical needs in drug discovery for cessation of alcohol and nicotine polysubstance abuse. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016; 65(4):.269-87.

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

Voso MT, Fabiani E, D'Alo F, Guidi F, Di Ruscio A, Sica S, et al. Increased risk of acute myeloid leukaemia due to polymorphisms in detoxification and DNA repair enzymes. *Ann Oncol*. 2007; 18(9):1523-8.

Wen L, Jiang K, Yuan W, Cui W, Li MD. Contribution of variants in *CHRNA5/A3/B4* gene cluster on chromosome 15 to tobacco smoking: from genetic association to mechanism. *Mol Neurobiol.* 2016; 53(1): 472-84.

Westlind A, Löfberg L, Tindberg N, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M. Interindividual differences in hepatic expression of *CYP3A4*: Relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 259(1): 201-5.

Xu Z, Wang G, Dong Z, Li T, Cao C, Jin Y. *CHRNA5* rs16969968 polymorphism association with risk of lung cancer – evidence from 17,962 lung cancer cases and 77,216 control subjects. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16(15):6685-90.

Yalcin E, de la Monte S. Tobacco nitrosamines as culprits in disease: mechanisms reviewed. *J Physiol Biochem.* 2016; 72(1): 1-21.

Yousef A, Bulatova NR, Newman W, Hakooz N, Ismail S, Qusa H, et al. Allele and genotype frequencies of the polymorphic cytochrome P450 genes (*CYP1A1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* and *CYP2C19*) in the Jordanian population. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(10): 9423-33.

Yu K, Ge C, Xu X, Zou J, Zou X, Zhen S. *CYP1A1* polymorphism interactions with smoking status in oral cancer risk: evidence from epidemiological studies. *Tumor Biol.* 2014; 35(11):11183-91.

Zeng W, Li Y, Lu E, Ma M. *CYP1A1* rs1048943 and rs4646903 polymorphisms associated with laryngeal cancer susceptibility among Asian populations: a meta-analysis. *J Cell Mol Med.* 2016; 20(2):287-93.

Zhang Y, Ni Y, Zhang H, An Y, Ma J, Wang L. Association between *GSTM1* and *GSTT1* Allelic Variants and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Plos One.* 2012; 7(10):1-9.

Zhuo L, Yao F, Luan H, Wang Y, Dong X, Zhuo W, et al. *CYP3A4*1B* polymorphism and cancer risk: A HuGE review and meta-analysis. *Tumor Biol.* 2013; 34(2):649-60.