

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA
MESTRADO E DOUTORADO**

**Níveis Urinários de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em
Consumidores de Chimarrão, Residentes em Área de Risco para Câncer de
Esôfago**

Tese de Doutorado em cooperação com a Universidade Federal de Santa Maria, National Institutes of Health/National Cancer Institutes (EUA), Universidade *King's College London* e Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, apresentada à banca examinadora e ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Autor: Antônio de Barros Lopes

Orientador: Prof^o. Dr. Renato Borges Fagundes

Colaboradores: Úrsula Matte, Luise Meurer, Fernando A. Soares, Sanford Dawsey, Néelson Alexandre Kretzmann Filho, Marcela Metzdorf, Luiza Metzdorf, Marcos Paulo Ramalho, Gwen Murphy, Arash Etemadi, Natalie Prichett, Antonia Calafat, Christian Abnet, Caroline Kavalco

Porto Alegre, 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Lopes, Antonio de Barros
Níveis Urinários de Hidrocarbonetos Aromáticos
Policíclicos em Consumidores de Chimarrão, Residentes
em Área de Risco para Câncer de Esôfago / Antonio de
Barros Lopes. -- 2016.
76 f.
Orientador: Renato Borges Fagundes.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos. 2. Erva
Mate. 3. Carcinoma Escamoso do Esôfago. 4. Câncer de
Esôfago. 5. Chimarrão. I. Fagundes, Renato Borges,
orient. II. Título.

Dedico esta tese de doutorado à minha família!

À Vanessa e à Carolina que me dão atenção, tempo, carinho, “puxões de orelha”, cambalhotas, gargalhadas e estímulos para ser cada dia melhor!

À minha mãe, que deixou marcas, saudades e ensinamentos em cada canto da minha vida.

Ao meu pai, que sabe encher e animar uma festa, mas também sabe ouvir e ajudar nos momentos mais duros da vida.

“Loucura é querer resultados diferentes
fazendo tudo exatamente igual”

Atribuído a Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Renato Borges Fagundes, homem de bem e da ciência! Grande parceiro nesta jornada científica, que como na sua caminhada de Santiago de Compostela, soube fazer amigos ao longo do caminho e construir uma trajetória.

Aos colaboradores do NIH/NCI (National Institutes of Health/National Cancer Institutes) Sanford Dawsey, Arash Etemadi, Gwen Murphy, Natalie Prichett, Antonia Calafat e Christian Abnet, que sabem dividir conhecimento e excelência com a tranquilidade e humildade das pessoas sábias e altruístas. Agradeço pelos ensinamentos científicos e pelo bom humor deste grupo extremamente diferenciado.

Ao Professor Doutor Sérgio G.S. de Barros, pela convivência e carinho de quem é inspiração na medicina e na ciência.

Aos bolsistas de iniciação científica Marcela Metzdorf, Luiza Metzdorf, Caroline Kavalco e Marcos Paulo Ramalho, que deram força, ideias e tempo essenciais para a execução desta pesquisa.

Ao biólogo Professor Doutor Néelson Alexandre Kretzmann Filho, pelos ensinamentos de biologia molecular e as orientações na bancada.

Aos colegas médicos contratados do Serviço de Gastroenterologia do HCPA, que me ajudam a enfrentar a árdua tarefa de buscar atendimento qualificado, geração e passagem de conhecimento.

Aos médicos Alexandre de Araújo e Matheus Michalczuk, parceiros de empreitadas desde a época da residência. Pessoas com quem posso contar no melhor e no pior.

Aos colegas residentes do Serviço de Gastroenterologia do HCPA, que fazem rolar as pedras da dúvida, busca pelo conhecimento e crescimento. Estes contato e amizade diários não deixam estas pedras criarem limo.

À médica Cristina Arruda, pela amizade e colaboração dentro e fora do HCPA.

Aos professores do Serviço de Gastroenterologia do HCPA, que servem de exemplo de excelência e busca constante do conhecimento.

Ao Professor Doutor Carlos Fernando de Magalhães Francesconi, pelo apoio ao crescimento pessoal e coletivo dos médicos do Serviço de Gastroenterologia do HCPA. Agradeço pela confiança e compreensão.

Ao médico Gustavo José Somm, amigo de muitas horas, ouvinte e conselheiro nas piores horas.

À Professora Doutora Maria Teresa Santos Cunha, historiadora destacada e minha sogra. Seu incentivo a seguir a vida acadêmica não é de sogra, mas de mentora e pesquisadora de excelência.

À enfermagem do Centro Cirúrgico Ambulatorial do HCPA, que emprestou tempo e auxílio importante nesta jornada.

À bióloga Patrícia Koehler dos Santos e ao funcionário Jeferson Beck da Silva, pela ajuda nas lides de bancada da UAMP/HCPA.

Ao Professor Doutor Fernando Augusto Soares e sua equipe do Laboratório de Patologia Cirúrgica do Hospital A.C. Camargo, formada pela bióloga Claudia Camillo, e aos técnicos Mariana França de Resende e Carlos Ferreira Nascimento. Agradeço pela colaboração na confecção das lâminas de TMA.

À Professora Doutora Luise Meurer, pela excelência e bom humor nas lides patológicas.

Às pessoas que fazem a minha vida fora do HCPA ser mais organizada e com espaço para ciência. Agradeço o carinho e a compreensão das secretárias Giovana Canabarro, Anelise Santos e Andréa Nunes, e da enfermeira Fernanda Machado.

Ao Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Maria, pelo apoio e infraestrutura fundamentais na realização deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, pelo apoio na produção de pesquisa séria.

Aos indivíduos avaliados neste estudo, que foram disponíveis e pacientes, colaborando com esta pesquisa.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
1. Câncer de esôfago	1
1.1. Epidemiologia	2
1.2. Fatores de risco para CCE	4
2. O Chimarrão	8
2.1. O Chimarrão e a tradição gaúcha	9
2.2. O Chimarrão e seus efeitos benéficos	10
2.3. Método de produção e consumo da Erva Mate	11
3. O Chimarrão e os possíveis mecanismos para desenvolvimento de CCE	13
3.1. A Temperatura do Chimarrão	14
3.2. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP)	14
3.2.1. HAP e carcinogênese	14
3.2.2. Metabolismo dos HAP	16
3.2.3. Meios de detecção da exposição aos HAP	17
3.2.4. Fontes de exposição aos HAP	17
4. Metodologia resumida desta tese de doutorado	21
4.1. Justificativa	22
4.2. Questões de pesquisa	22
4.2.1. Quantidades crescentes de consumo de Chimarrão determinam aumento de exposição à HAP?	22
4.2.2. Quais os metabólitos dos HAP são mais frequentemente encontrados na urina de consumidores de Chimarrão no RS?	22

4.3. Hipótese	22
4.4. Objetivos	22
4.4.1. Principal	22
4.4.2. Secundário	22
4.5. Delineamento	22
4.6. Desenho do estudo	22
4.7. Seleção dos pacientes	24
4.7.1. Critérios de inclusão	24
4.7.2. Critérios de exclusão	24
4.7.3. Recrutamento	24
4.8. Coleta de dados	25
4.8.1. Questionário padronizado (Anexo 2)	25
4.8.2. Coleta e análise de urina	25
5. Reflexões sobre esta tese de doutorado	27
6. Artigos originais	29
7. Diretrizes futuras	51
8. Anexos	53
Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	54
Anexo 2 – Questionário Padronizado	56
9. Referências Bibliográficas	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: adenocarcinoma do esôfago

ALDH2: aldeído desidrogenase-2

AhR: receptor aril hidrocarbono

BaP: benzo[a]pireno

CCA: Centro Cirúrgico Ambulatorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

CCE: carcinoma de células escamosas do esôfago

CYP: enzimas do citocromo p450. A terminação da palavra descreve cada enzima, especificamente (ex: CYP2A6)

EDA: endoscopia digestiva alta

EGQ: Exame Geral de Qualificação

EUA: Estados Unidos da América

ERCC1: *DNA excision repair cross-complementing protein 1* (proteína de reparo de DNA de excisão 1)

ERCC5: *DNA excision repair cross-complementing protein 5* (proteína de reparo de DNA de excisão 5)

ESCC: *esophageal squamous cell carcinoma*

HAP: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE: Hematoxilina-Eosina

HUSM: Hospital Universitário de Santa Maria

IARC: *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional para Estudo do Câncer)

INCA: Instituto Nacional de Câncer

I. paraguayensis: Ilex paraguayensis

IQR: *interquartile ranges*

MGMT: O⁶-metilguanina DNA metiltransferase

MPO: mieloperoxidase

MTHFR: metilenetetrahidrofolato redutase

NAT2: N-acetiltransferase 2

NCI: *National Cancer Institute* (Instituto Nacional de Câncer norte-americano)

NER: *Nucleotide Excision Repair* (reparação de excisão nucleotídeo)

NIH: *National Institute of Health* (Instituto Nacional de Saúde norte-americano)

NMBA: N-nitrosometilbenzilamina

NOQ1: NAD(P)H quinona oxirredutase 1

1-OHPG: 1 hidroxipireno glucuronideo

PAH: *polycyclic aromatic hydrocarbons*

RS: Rio Grande do Sul

SD: *standard deviations*

SNC: sistema nervoso central

TMA: *Tissue Microarray Assay* (microarranjo tecidual)

UAMP: Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas

UDP-glucoroniltransferase: uridina 5' difosfato glucoroniltransferase

XPD: xeroderma pigmentoso grupo D

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Resumo dos estudos epidemiológicos da associação de chimarrão com CCE	6-7
2. Compostos encontrados nas folhas da erva mate e algumas de suas atividades biológicas	11
3. Fontes de exposição aos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP) no mundo ocidental e em populações de maior risco de CCE	19

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Incidência e mortalidade mundiais estimadas das neoplasias mais frequentes no ano de 2012, baseados no GLOBOCAN (adaptado de Ferlay J, <i>et al</i> [1]) para homens (a) 4 e mulheres (b).	3
2. a) Cuiá e bomba utilizadas no Rio Grande do Sul; b) demonstração do consumo de Chimarrão.	10
3. Método tradicional de fabrica�o da erva mate: a) colheita; b) "Sapeco"; c) secagem (visão interna do cilindro de secagem); d) secagem (visão externa do cilindro, sendo observado forno � lenha); e) moagem grossa; f) envelhecimento; g) moagem fina h) mistura.	12
4. Concentra�o urinária de 1-hidroxipireno glucuronideo (1-OHPG) em não tabagistas da província de Golestan/Ir�[28], Rio Grande do Sul/Brasil[66], Linxian/China[100], Maryland/Estado Unidos da América (EUA)[94] (Adaptado de Roshandel G <i>et al</i> [65]).	18
5. Fluxograma do estudo. As amostras de sangue e biópsia serão analisados em outros estudos.	24
6. Plano de inclusão de indivíduos conforme consumo de Chimarrão, sexo e tabagismo.	25

1. CÂNCER DE ESÔFAGO

1.1. Epidemiologia

O câncer do esôfago é o oitavo tipo mais comum de câncer no mundo, com a estimativa 456.000 novos casos em 2012 e 400.000 mortes no mesmo ano, totalizando 4,9% das mortes por câncer no mundo[1]. Os países em desenvolvimento contribuíram com 83% dos novos casos e com 86% das mortes (Figura 1)[1, 2].

Os dois tipos histológicos mais comuns são o Carcinoma de Células Escamosas (CCE) e o Adenocarcinoma (AC)[3]. O CCE ainda é o tipo histológico mais comum no mundo, mesmo após o aumento de 400% na prevalência do AC nos Estados Unidos da América (EUA)[4, 5], alguns países da Europa ocidental[6-8] e Oceania[3] onde mais de 50% dos casos são de AC[3].

O CCE tem sua origem no epitélio escamoso do esôfago, se apresenta mais frequentemente no terço médio do órgão e tem sua incidência mundial estável ao longo dos anos, com uma distribuição caracteristicamente heterogênea, com zonas de alta e baixa incidências em áreas geográficas muito próximas[1]. O predomínio de CCE persiste devido a sua alta incidência na Ásia Ocidental, como em algumas províncias da China (Henan, Linxian), nordeste de Irã (Golestan), o litoral do mar Cáspio, planícies do Turquistão, onde são diagnosticados 120 a 175 novos casos por 100.000 habitantes por ano[3, 9]. Zonas de incidência intermediária compreendem a França[3, 6], o sul e o Oeste da África (Quênia)[3, 10], e algumas áreas da América do Sul como o Uruguai, sudoeste da Argentina e o Rio Grande do Sul, onde o CCE ainda contabiliza mais de 80% dos novos casos de CCE[3, 11, 12].

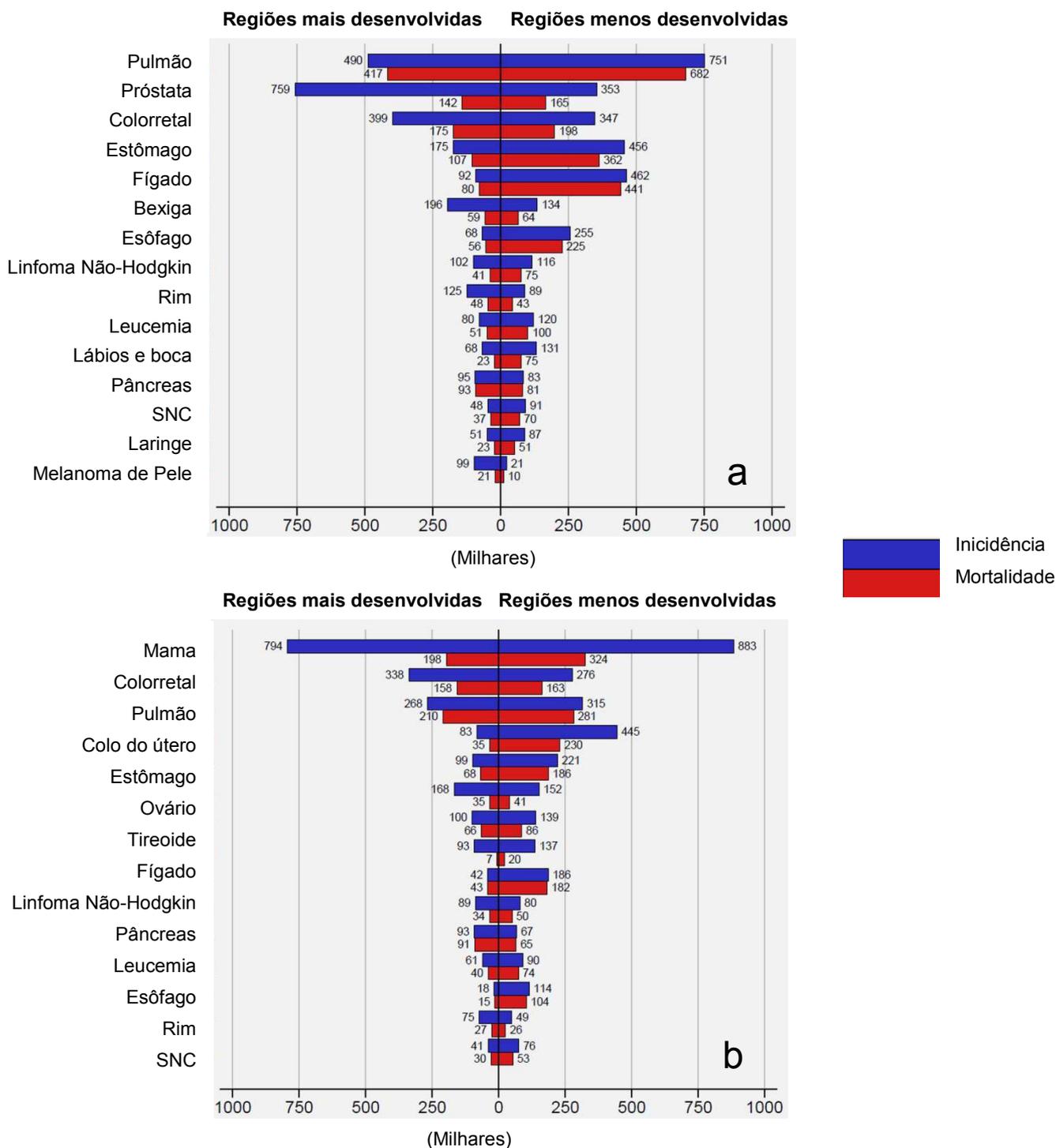


Figura 1 - Incidência e mortalidade mundiais estimadas das neoplasias mais frequentes no ano de 2012, baseados no GLOBOCAN (adaptado de Ferlay J, *et al*¹) para homens (a) e mulheres (b).

1.2. Fatores de risco para CCE

Os fatores de risco para CCE são múltiplos e incluem fatores modificáveis como o tabagismo e alcoolismo moderado a pesado[13-15], ingestão de infusões quentes[16-20], baixa ingestão de frutas e verduras[14, 16, 21-23], baixo nível socioeconômico[24], consumo frequente de churrasco[16, 25, 26], e exposição à hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) por ingestão de alimentos defumados ou inalação de fumaça[27-29]. A história familiar e polimorfismos genéticos são fatores de risco não modificáveis para o CCE, porém sua influência isolada parece menos importante que os mecanismos descritos acima[30-36]. De fato, alguns destes polimorfismos modulam a resposta individual à exposição aos fatores de risco modificáveis[32, 35, 36]. Tabagismo e consumo abusivo de álcool são os fatores de risco mais importantes para CCE nas populações de baixo risco[37], porém sua etiologia em áreas de moderado a alto risco ainda é motivo de discussão.

Como descrito acima (vide item 1.1), o CCE tem distribuição geográfica peculiar, com áreas de alta incidência próximas a áreas de baixa incidência e uma influência socioeconômica importante[24], com maiores frequências encontradas em países em desenvolvimento[1, 3, 38]. Algumas regiões da América do Sul se enquadram neste padrão, em especial no sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e noroeste da Argentina que apresentam incidências mais elevadas que as encontradas em territórios vizinhos[1, 3, 39]. Esta afirmação foi confirmada pelos dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) que estima que, em 2016, o Rio Grande do Sul apresentará 20,3 novos casos de câncer de esôfago por 100.000 habitantes entre homens e de 6,6 novos casos por 100.000 habitantes entre as mulheres. Estes valores são 2 a 3 vezes maiores que a estimativa média no Brasil (8,04 por 100.000 habitantes entre os homens e 2,76 por 100.000 habitantes entre as mulheres)[40].

Para melhor entendimento da incidência aumentada de CCE em alguns países da América do Sul, os hábitos alimentares e costumes locais vêm sendo estudados há algumas décadas. Na década de 1980, o grupo uruguaio de Vassallo e colaboradores[25] observou que o consumo de chimarrão aumentava o risco de CCE e que havia um efeito dose-dependente no aumento de risco desta neoplasia.

Ainda na década de 1980, o grupo de estudo de Pelotas, capitaneado por Victora[41], executou um estudo de casos e controles incluídos em hospitais e clínicas de radioterapia de Pelotas e Porto Alegre, e observou que, em análise univariada, o consumo diário de chimarrão, carne vermelha, baixo consumo de frutas, consumo de cachaça, tabagismo e residência em zona rural aumentavam o risco de CCE. No entanto, o consumo de chimarrão, quando ajustado para as outras variáveis acima, não foi estatisticamente

significativo. A falha em demonstrar tal associação foi atribuída à alta frequência de consumo de chimarrão tanto nos casos quanto nos controles, sendo necessária uma amostra maior de pacientes para que fosse observada significância estatística. Os dados deste estudo foram incluídos em estudo colaborativo entre Argentina, Uruguai, Paraguai e IARC, e publicados em 2000[16]. Com esta reunião de dados foi possível atingir um número expressivo de indivíduos e foi observada associação do consumo de chimarrão e CCE (Tabela 1)[16].

Outro estudo gaúcho, conduzido no Hospital Nossa Senhora da Conceição por Dietz e colaboradores[42], demonstrou associação do consumo de chimarrão, seu uso diário e sua temperatura com risco de CCE (Tabela 1). A análise multivariada não sustentou tais conclusões, possivelmente pelo número reduzido de casos.

Estudos subsequentes das décadas de 1990 e 2000 demonstraram que outros hábitos locais como consumo frequente de churrasco e baixa ingestão de frutas e verduras foram associados com CCE[22, 23, 42, 43]. As evidências foram se somando e o chimarrão ganhou papel importante no risco de CCE, tanto pela sua alta temperatura[17], quanto por sua quantidade[44]. A Tabela 1 resume as evidências epidemiológicas sobre a associação de chimarrão e CCE.

Tabela 1 – Resumo dos estudos epidemiológicos da associação de chimarrão com CCE

Primeiro autor (ano da publicação)	Países onde foi realizado (período do estudo)	Casos/ controles	Variáveis estudadas	Razão de chances (IC 95%)	Comentários
Vassallo, A. (1985)[25]	Uruguai (1979 – 1984)	226/469	Já consumiu x nunca consumiu chimarrão Homens Mulheres	3,9 (2,0 – 7,5) 11,9 (2,0 – 69,9)	- Estudo de casos e controles coletado em ambiente hospitalar - Razões de Chances ajustadas para idade, tabagismo e alcoolismo
			Quantidade de chimarrão consumido (homens) 0 0,01 a 0,49 litros/dia 0,50 a 0,99 litros/dia Mais de 0,99 litros/dia	1 1,1 (0,2 – 5,0) 3,1 (1,2 – 7,8) 4,8 (1,9 – 12,1)	
			Quantidade de chimarrão consumido (mulheres) 0 0,01 a 0,49 litros/dia 0,50 a 0,99 litros/dia Mais de 0,99 litros/dia	1 2,1 (0,1 – 31,7) 12,5 (2,0 – 80,1) 34,6 (4,9 – 246,5)	
Dietz, J. (1998)[42]	Brasil (1990 – 1991)	55/110	Consumo de chimarrão Nunca Consumo atual ou no passado Consumo diário x não diário Não diário Diário	1 3,58 (1,30 – 9,85) 1 5,48 (1,11 – 36,53)	- Estudo realizado no serviço de endoscopia do Hospital Nossa Senhora da Conceição em Porto Alegre/RS - Razões de Chances não ajustadas
			Temperatura Não quente Quente	1 2,55 (1,01 – 6,56)	
Castellsagué, X. (2000)[16]	Argentina, Brasil, Uruguai, Paraguai (1986 – 1992)	830/1779	Temperatura do chimarrão Fria ou morna Quente Muito quente Quantidade de chimarrão consumido 0 0,01 a 0,50 litros/dia 0,51 a 1,00 litros/dia 1,01 a 1,50 litros/dia 1,51 a 2,00 litros/dia >2,00 litros/dia Duração do hábito 0 1 a 29 anos 30 a 39 anos 40 a 49 anos 50 a 59 anos 60 anos ou mais	1 1,11 (0,84 – 1,47) 1,89 (1,24 – 2,86) 1 1,39 (0,98 – 1,98) 1,34 (0,95 – 1,90) 1,96 (1,27 – 3,03) 2,03 (1,32 – 3,13) 3,04 (1,84 – 5,02) 1 1,40 (0,91 – 2,13) 1,39 (0,93 – 2,07) 1,53 (1,06 – 2,21) 1,47 (1,00 – 2,17) 1,92 (1,25 – 2,96)	- Este estudo compilou dados de publicações da Argentina (131 casos e 262 controles)[43], Brasil (171 casos e 342 controles)[41], Uruguai (397 casos e 794 controles)[23], Paraguai (131 casos e 381 controles)[45] - Razões de Chances ajustadas para idade, sexo, instituição, tabagismo, alcoolismo, grau de escolaridade

Tabela 1 – Resumo dos estudos epidemiológicos da associação de chimarrão com CCE (continuação)

Primeiro autor (ano da publicação)	Países onde foi realizado (período do estudo)	Casos/ controles	Variáveis estudadas	Razão de chances (IC 95%)	Comentários
Sewran, V. (2003)[49]	Uruguai (1988 – 2000)	344/469	Já consumiu x nunca consumiu chimarrão Nunca Já consumiu	1 2,26 (1,19 – 4,27)	- Estudo de casos e controles coletado em ambiente hospitalar
			Quantidade de chimarrão consumido 0 0,01 a 0,50 litros/dia 0,51 a 1,00 litros/dia >1,00 litros/dia	1 1,69 (0,85 – 3,35) 2,47 (1,28 – 4,77) 2,84 (1,41 – 5,73)	- Razões de chances ajustadas para idade, residência na zona rural ou urbana, tabagismo, alcoolismo, grau de instrução
			Duração do hábito 0 1 a 35 anos 36 a 49 anos 50 a 58 anos >58 anos	1 1,31 (0,61 – 2,81) 2,29 (1,16 – 4,52) 2,58 (1,27 – 5,24) 4,31 (1,99 – 9,34)	
De Stefani, E. (2008)[47, 48]	Uruguai (1996 – 2004)	234/936 para avaliação de quantidade de chimarrão 234/468 para avaliação de temperatura do chimarrão	Temperatura do chimarrão Fria ou morna Quente Muito quente	1 2,03 (1,23 – 3,34) 5,76 (2,92 – 11,35)	- Estudo de casos e controles coletado em ambiente hospitalar - Dados não ajustados
			Quantidade de chimarrão consumido 0 0,01 a 0,99 litros/dia 1,00 a 1,99 litros/dia >1,99 litros/dia	1 1,86 (0,93 – 3,72) 3,05 (1,59 – 5,85) 3,30 (1,64 – 6,62)	
Szymanska, K. (2010) [46]	Brasil, Cuba, Argentina (iniciado em 1998. Não há data final)	80/1026	Já consumiu x nunca consumiu chimarrão Nunca Já consumiu	1 3,81 (1,75 – 8,30)	- Este estudo incluiu pacientes com diferentes neoplasias do trato aerodigestivo alto.
			Quantidade de chimarrão consumido 0 0,001 a 0,057 litros/dia 0,057 a 0,21 litros/dia >0,21 litros/dia	1 1,69 (0,85 – 3,35) 2,47 (1,28 – 4,77) 2,84 (1,41 – 5,73)	- Apesar do estudo ter ocorrido em 5 centros no Brasil (Pelotas, Porto Alegre, São Paulo, Rio de Janeiro e Goiânia), 1 na Argentina e 1 em Cuba, somente Pelotas incluiu casos de CCE.
			Duração do hábito 0 0,5 a 20 anos 21 a 40 anos >40 anos	1 1,93 (0,56 – 6,62) 3,53 (1,45 – 8,61) 4,67 (2,00 – 10,9)	- Razões de chances ajustadas para idade, gênero, tabagismo, consumo de álcool, centro e grau de instrução
			Temperatura do chimarrão Fria ou morna Quente Muito quente	1 7,52 (2,72 – 20,82) 3,33 (1,51 – 7,35)	

2. O CHIMARRÃO

2.1. O Chimarrão e a tradição gaúcha

O consumo de Chimarrão faz parte da cultura do gaúcho e é motivo de orgulho às pessoas do Rio Grande do Sul, sendo lembrado como hábito hospitaleiro, que congrega os amigos ou que acompanha as pessoas solitárias. O trecho do poema “Chimarrão” de Glaucus Saraiva, citado abaixo, reúne estes conceitos[50].

*“Amargo doce que eu sorvo
Num beijo em lábios de prata
Tens o perfume da mata
Molhada de sereno
E a cuia, seio moreno,
Que passa de mão em mão
Traduz no meu chimarrão
Em sua simplicidade,
A velha hospitalidade
Da gente do meu rincão”*

O Chimarrão (do espanhol *cimarrón*)[51], como é conhecido no Rio Grande do Sul, ou Mate (do *quíchua mati*)[52], como é conhecido nos países de língua espanhola, é uma infusão quente da erva oriunda das folhas da *Ilex paraguayensis*. Seu consumo remonta aos povos indígenas que habitavam o Sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina antes colonização ibérica, como os Guarani, Caingangues, Aimará e Quíchua[53]. As folhas de *Ilex paraguayensis* são consideradas um presente do deus Tupã, e o consumo da infusão de suas folhas ofereciam força, alegria e valentia[53].

O consumo do Chimarrão é feito após colocação de erva mate no interior da cuia, uma vasilha feita do fruto da cueira ou porongo, com formatos e tamanhos variáveis (Figura 2)[53]. No Rio Grande do Sul a erva é banhada por água quente e ingerida em temperaturas de 63,4 a 69.5° Celsius por um tipo de “canudo” de metal chamado de bomba (Figura 2)[54, 55]. Cada cuia comporta de 60 a 150 ml de água, sendo que os indivíduos refazem o ritual de encher a cuia múltiplas vezes, tomando uma média de 1.200 a 1.800 ml de chimarrão por dia[54, 55].



Figura 2 – a) Cuias e bombas utilizadas no Rio Grande do Sul; b) demonstraco do consumo de Chimarrão

2.2. O Chimarrão e seus efeitos benéficos

Há inúmeras publicaoes sobre os benefícios que a erva mate pode trazer à saúde, tanto ingerida como suplemento alimentar, quanto pela ingestão da sua infusão (Tabela 2)[56]. Desta forma, a erva mate, seu extrato ou seu chá vem sendo comercializadas em diversos lugares do mundo como um produto medicinal.

Tabela 2 - Compostos encontrados nas folhas da erva mate e algumas de suas atividades biológicas

Classe	Compostos	Atividades biológicas
Xantinas	Cafeína	Anticarcinogênico, antiobesidade, antioxidante, antitumoral, diurético, neuroestimulante, vasodilatador
	Teobromina	Diurético, miorelaxante, neuroestimulante
	Teofilina	Diurético, colerético, estimulante, vasodilatador, mioestimulante
Polifenois	Ácido clorogênico	Antioxidante, analgésico, antiaterosclerótico, antibacteriano, antidiabético, antitumoral, colerético
	Taninos	Antioxidante, antitumoral, inibidor da lipoxigenase
	Clorofila	Antibacteriano, antitumoral
	Colina	Antidiabético, colinérgico, lipotrópico
Vitaminas hidrossolúveis	Ácido nicotínico	Colerético, hipolipemiante
	Ácido pantotênico	Antialérgico, antiarrítmico, estimulante
Flavanoídes	Rutina	Antioxidante, antitumoral, antiulceroso, vasodilatador
	Ácido ursocólico	Analgésico, antioxidante, antiarrítmico, antitumoral, anti-Alzheimer

Adaptado de Heck *et al*[56].

2.3. Método de produção e consumo da Erva Mate

Após a colheita das folhas da *I. paraguayensis*, o processo tradicional de produção da erva mate passa por 5 etapas até chegar ao consumidor: “Sapeco”, secagem das folhas, trituração, envelhecimento, empacotamento (Figura 3)[56]. O “sapeco” e a secagem das folhas são de especial interesse para esta tese.

O “sapeco” é a exposição das folhas recém-coletadas e, ainda presas aos galhos, à altas temperaturas (400 a 750°C) geradas por chama de fogueira com madeira. Esta fase dura de 10 segundos a 3 minutos e objetiva quebrar a epiderme e estomas, parando o processo de oxidação e atividade enzimática nas folhas[56]. Técnicas que evitam a fogueira, e por consequência a fumaça, já vem sendo estudadas e parecem manter as propriedades desejadas da erva[57].

A secagem das folhas é feita com a exposição destas à temperaturas de 90 a 350°C por 8 a 24 horas, com objetivo de reduzir a humidade da folhas de 10 – 12% a 4,5%[56]. A técnica clássica prevê que as folhas sejam colocadas em cilindro metálico fenestrado exposto à fumaça e seus detritos, porém a produção de erva sem contato com a fumaça vem sendo praticada[58]. Marcas de erva mate fabricadas com a técnica de secagem não exposta à fumaça já estão disponíveis no mercado e contêm menor quantidade de resíduos de fumaça quando comparados as marcas submetidas à técnica tradicional[58].



Figura 3 – método tradicional de fabricação da erva mate: a) colheita; b) “Sapeco”; c) secagem (visão interna do cilindro de secagem); d) secagem (visão externa do cilindro, sendo observado forno à lenha); e) moagem grossa; f) envelhecimento; g) moagem fina h) mistura.

**3. O CHIMARRÃO E OS
POSSÍVEIS MECANISMOS PARA
DESENVOLVIMENTO DE CCE**

3.1. A temperatura do Chimarrão

Um dos mecanismos carcinogênicos atribuídos à ingestão costumeira do chimarrão se deve à sua alta temperatura de ingestão[17, 59]. Dados experimentais sugerem que a instilação recorrente do esôfago com água a temperaturas de 65 a 70° C potencializa a geração de lesões precursoras[60], além de aumentar a incidência e número de tumores esofágicos induzidos por N-nitrosometilbenzilamina (NMBA)[61].

Baseados nestes dados experimentais e em dados observacionais (Tabela 2), uma recente publicação da Agência Internacional para Estudo do Câncer (IARC) considera que a ingestão de infusões quentes entre 65 e 70°C são “provavelmente carcinogênicos para humanos” (IARC grupo 2A)[20]. Dentre as infusões quentes do grupo 2A foram citados o chá e o chimarrão[17, 19, 20, 59].

A temperatura do chimarrão é de relevância clínica no Rio Grande do Sul, como descrito nos estudos abaixo. Dois estudos transversais conduzidos no Rio Grande do Sul mediram a temperatura da água do chimarrão diretamente nas cuias de indivíduos de Pelotas[54] e de Taquara[55], demonstrando, respectivamente, que a média da temperatura de ingestão do chimarrão era de 69,5 e 63,4° Celsius. Ambos estudos descrevem uma alta frequência de consumo diário ou quase diário de chimarrão, além de volumes médios de 1.200 a 1.800 ml de chimarrão por dia[54, 55].

No entanto, a temperatura não parece ser o único mecanismo responsável pelo aumento do risco de CCE associado à ingestão do chimarrão. Como descrito em estudos experimentais[60, 61], a instilação de água em temperaturas elevadas potencializa o efeito de um componente conhecidamente oncogênico (NMBA). Além disto, há estudos observacionais que descreveram aumento de risco de neoplasias de sítios não expostos à temperatura do chimarrão, como bexiga, pulmão, próstata, colo uterino e rins[62-64], sugerindo que há algum componente no chimarrão que seja um carcinógeno independente da temperatura. Em especial, é digno de nota, o estudo uruguaio capitaneado por De Stefani[63], que descreveu associação de consumo de chimarrão com aumento de risco de carcinoma do trato aerodigestivo alto, esôfago e estômago, que têm contato com as altas temperaturas. No entanto, também observou associação de consumo de chimarrão com neoplasias de bexiga, pulmão, próstata, colo uterino e rins, com efeito dose-dependente (maiores volumes de consumo de chimarrão trouxeram maior risco).

3.2 Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP)

3.2.1. HAP e carcinogênese

Outro mecanismo potencial da oncogênese associada ao chimarrão é a exposição da mucosa esofágica aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP)[65-68]. HAP são um grupo de compostos gerados pela combustão incompleta de material orgânico, incluindo vegetação (ex. queima de madeira), combustíveis fósseis e derivados do petróleo[69]. Eles são compostos de 2 ou mais anéis aromáticos condensados e são distribuídos em fase gasosa ou particulada[65, 69], sendo encontrados no solo, água, ar e alimentos, podendo contaminar o homem por meio de inalação, ingestão ou via percutânea[29, 67, 69-71].

HAP são quimicamente inertes e hidrofóbicos, porém apresentam metabolismo intracelular que gera sua forma ativa, o diol-epóxido, que se liga a macromoléculas celulares como o DNA, formando adutos de HAP ao DNA[65]. A geração destes adutos é uma alteração precoce e necessária na carcinogênese, tendo sido encontrada em peças de biópsia de esôfago, colo de útero, vulva e próstata de indivíduos expostos a HAP[72]. A formação destes adutos ao DNA leva a mutações em proto-oncogenes, como o *Kras*, e genes de supressão tumoral, especialmente do P53[73]. Mutações no P53 induzidas por HAP já foram observadas em neoplasia de pulmão[73, 74], colo uterino[75], além de CCE em população iraniana[76]. Estudo realizado no Rio Grande do Sul demonstrou expressão imuno-histoquímica aumentada da proteína p53, com incremento gradual da sua expressão em casos de esofagite, displasia e CCE, sugerindo que a mutação no gene P53 pode estar envolvida na patogênese do CCE no nosso meio[77]. Os HAP também podem induzir inativação do P53 via formação de espécies reativas de oxigênio[78], além de causar dano direto ao DNA por alquilação química, resultando em depurinação mutagênica[79].

Estas evidências de mecanismos moleculares embasam dados populacionais já relatados há alguns séculos. A primeira evidência de exposição a HAP causando câncer vem dos relatos de Percivall Pott em 1775, associando a exposição à fuligem ao câncer de escroto em limpadores de chaminés da Inglaterra pós Revolução Industrial (via percutânea)[65]. Desde então, os HAP tem sido associados às neoplasias de pulmão[80, 81], bexiga[80, 82, 83], mama[84], pâncreas[83, 85] e próstata[85], tanto por exposição à fumaça de cigarro (ativo ou passivo), quanto por exposição ambiental (lareira, fogão à lenha, ocupacional, poluição ambiental)[86].

Motivados por estudos em animais, humanos, e com impacto ocupacional da exposição aos HAP, o IARC, em 2005, definiu o benzo[a]pireno como “carcinógeno para humanos” (IARC grupo 1)[86]. Outros HAP como o ciclopenta[c,d]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e dibenzo[a]pireno foram classificados como “provavelmente carcinógenos para humanos” (IARC grupo 2A). Benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, criseno, dibenzo[a,h]pireno, dibenzo[a,i]pireno,

indeno[1,2,3,cd]pireno, 5-metilcriseno foram considerados “possivelmente carcinógenos para humanos” (IARC grupo 2B)[86]. A última reclassificação dos HAP foi realizada em 2010, e manteve a classificação de 2005, exceto pela inclusão do benzo[c]fenantreno como “possivelmente carcinógeno para humanos” (IARC grupo 2B)[69].

3.2.2. Metabolismo dos HAP

Fatores genéticos podem afetar a resposta à exposição a HAP[87]. As enzimas CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1 do citocromo p450 metabolizam os HAP em seus intermediários metabolicamente ativos e de potencialmente carcinogênicos[86]. A detoxificação destes metabólitos é realizada por sua conjugação pela glutathione S-transferase (GSTM1, GSTP1, GSTT1), UDP-glicoroniltransferase e sulfotransferases[86]. Alguns polimorfismos genéticos afetam a atividade destas enzimas e conferem maior ou menor susceptibilidade ao efeito carcinogênico dos HAP[87]. De especial interesse para o risco de CCE estão polimorfismos nos genes GSTM1[34, 88], AhR[32, 65, 88], CYP1B1[65, 89], GSTP1[90].

Roth e colaboradores[34], identificaram associação entre o polimorfismo inativo para GSTM1 (homozigose GSTM1*0) com maior risco de displasia escamosa no esôfago de indivíduos em área de alto risco para CCE na China. Também na China, o mesmo grupo de pesquisa identificou que há maior expressão do gene AhR em indivíduos com história familiar de CEE[32]. O gene AhR é responsável pela codificação do receptor de membrana celular para os HAP, e seu polimorfismo aumenta a chance de mutações no gene P53 em indivíduos com exposição ocupacional a HAP[89].

Estudo realizado em população do Rio Grande do Sul observou que polimorfismos dos genes Ahr, CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1 influenciam o metabolismo dos HAPs[88]. Destes polimorfismos estudados, o CYP1B1 foi o que teve maior influência na excreção urinária de 1-hidroxipireno glucuronideo (1-OHPG), importante marcador de exposição e metabolismo dos HAP[88].

Estudo recente de Etemadi e colaboradores[91] avaliou polimorfismos de genes de metabolismo e reparação, além de incluir uma nova variável neste campo: a capacidade de reparação do DNA mutado medida pela *reparação de excisão nucleotídeo* (NER). Este estudo foi realizado em mulheres iraquianas, não fumantes, provenientes da província iraniana de Golestan e demonstrou que polimorfismos nos genes de MPO e NAT2, responsáveis pelo metabolismo dos HAP, e polimorfismo do gene de reparação ERCC5 tem influência em níveis de adutos dos HAP ao DNA[91]. A capacidade de NER foi influenciada pelos polimorfismos nos genes MTHFR e ERCC1[91].

Também foi de especial relevância o estudo de Ma e colaboradores[35], que além de identificar polimorfismo que aumentavam e reduziam risco de CCE (ALDH2, XPD, MGMT), também observaram que alguns polimorfismos do CYP2A6 e MGMT estavam associados ao aumento de risco de CCE metastático. Desta forma, o resumo das evidências acima sinaliza que tanto a exposição aos HAP quanto variações genéticas influenciam o risco de dano ao DNA e o desenvolvimento da cascata carcinogênica.

3.2.3. Meios de detecção da exposição aos HAP

A exposição aos HAP pode ser medida por meio de dosagem externa (ambiental) ou interna (tecidos o fluidos corporais)[65]. A determinação da dose externa, de especial interesse para indivíduos com exposição ocupacional, não será abordada neste texto por não ser o foco desta tese.

Um dos principais meios de documentar a exposição aos HAP é pela detecção de seus metabólitos na urina[92, 93]. A presença destes metabólitos na urina é de curta duração, refletindo a exposição aos HAP nas últimas 24 a 72 horas[93, 94]. O 1-OHPG é o metabólito urinário mais frequentemente aferido, tendo já demonstrada correlação com exposição recente aos HAP[94]. No entanto, técnicas mais recentes possibilitaram a avaliação de muitos outros compostos como 1-Naftol, 2-Naftol, 2-Hidroxifluoreno, 3-Hidroxifluoreno, 1-Hidroxifenantreno, 2-3-Hidroxifenantreno e 1-Hidroxipirene[95], conferindo informações mais completas sobre a exposição aos HAP.

A detecção dos adutos do HAP ao DNA são marcadores mais duradouros da exposição aos HAP[96]. Os níveis de adutos podem ser aferidos nos leucócitos, porém não refletem a exposição de órgãos alvo, como à mucosa esofágica[97]. Van Gijssel e colaboradores[98, 99] e Pratt e colaboradores[72] observaram que adutos dos HAP ao DNA podem ser detectados e recuperados de material de biópsia esofágica armazenado em blocos de parafina, mesmo após muitos anos de armazenamento. Recente estudo iraniano conduzido por Abedi-Ardekani e colaboradores[27], foi bem sucedida em demonstrar a exposição da mucosa esofágica aos HAP por meio de imunistoquímica com anticorpo anti-HAP citoplasmático (8E11), além de observar que há associação desta exposição com CCE.

3.2.4. Fontes de exposição aos HAP

Há algumas décadas tem se demonstrado que indivíduos de áreas de moderado a alto risco de CCE apresentam maiores níveis de excreção de metabólitos de HAP que outras populações de baixo risco, sugerindo que a exposição aos HAP é maior nestes locais (Figura 4)[65]. As possíveis fontes de exposição de diferentes regiões estão descritos na tabela 3[65].

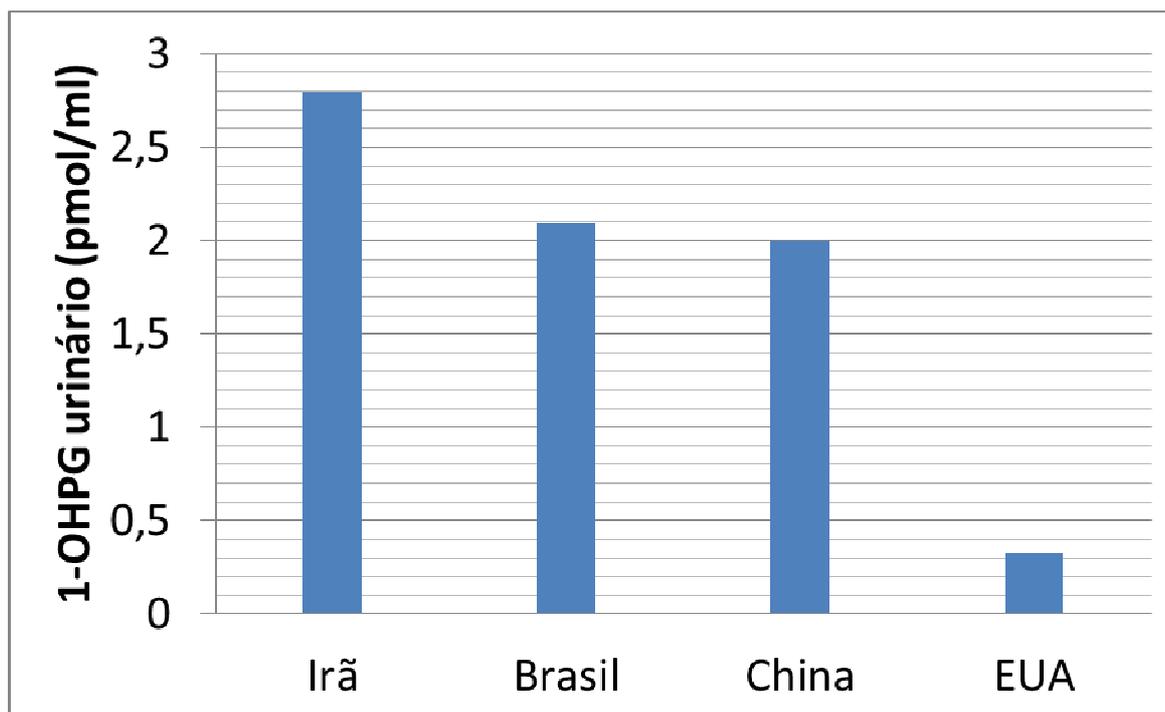


Figura 4 – Concentração urinária de 1-hidroxipireno glucuronideo (1-OHPG) em indivíduos não tabagistas da província de Golestan/Irã[28], Rio Grande do Sul/Brasil[66], Linxian/China[100], Maryland/Estado Unidos da América (EUA)[94] (Adaptado de Roshandel G *et al* [65]).

Tabela 3 – Fontes de exposição aos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP) no mundo ocidental e em populações de maior risco de CCE

Populações	Fontes principais	Fontes secundárias
Mundo Ocidental	Cigarro	Fumaça dos carros, queima de carvão
China	Queima de carvão	Fumaça dos carros, cigarro
Irã	Desconhecido	Fumaça dos carros, cigarro
Rio Grande do Sul	Chimarrão, cigarro	Churrasco, Fumaça dos carros

Adaptado de Roshandel *et al.*[65]

Duas das regiões de mais alta prevalência de CCE, as províncias de Linxian e Henan na China, trouxeram importantes informações sobre os fatores de risco para o CCE. Nestas regiões foram observadas altas concentrações de HAP em alimentos, sugerindo que este poderia ser um fator de risco para CCE[71]. O elemento comum que levava a contaminação dos alimentos e do ambiente domiciliar era a utilização de fogões a lenha sem chaminé, alimentados por carvão[29]. Juntamente com estas informações de fonte alimentar[71] e ambiental[29] de HAP, foi observada excreção aumentada de 1-OHPG urinária, sinalizando que os indivíduos eram efetivamente expostos aos HAP[100].

No Irã a associação da exposição aos HAP com a prevalência aumentada de CCE também é observada[27, 28]. Nesta região as fontes de exposição aos HAP não são tão claras[65], sendo sugerido que a ingestão de carne vermelha, carne processada, fumo passivo e preparo domiciliar de pão podem contribuir com tal exposição[90].

Nas áreas sul-americanas de maiores prevalências de CCE, a exposição aos HAP também tem relevância como fator de risco para esta neoplasia, pela sua impregnação na carne de churrasco[43, 47, 94] e principalmente no chimarrão[63, 67]. Os dados locais que iniciaram a confirmação de exposição aos HAP pela ingestão de chimarrão são de Santa Maria, Rio Grande do Sul[66]. Este estudo demonstrou que a concentração urinária de 1-OHPG, um metabólito estável de um HAP chamado pireno, era significativamente maior em indivíduos que tomavam chimarrão quando comparados àqueles que não tomavam. Neste mesmo estudo foi observado que as concentrações urinárias de 1-OHPG aumentavam na medida em que o consumo de mate aumentava e que eram semelhantes às encontradas em tabagistas. A exposição a benzo[a]pireno resultante de 12 infusões de 8 g de erva mate equivale à atingida pela queima do tabaco de 20 cigarros[67].

A chave para esta alta concentração de HAP na erva mate vem de sua produção tradicional (vide item 2.3.), pela exposição à fumaça no “sapeco” e na secagem das folhas[68]. O estudo catarinense publicado por Vieira e colaboradores[68], demonstrou que as folhas de *I. paraguayensis* já apresentam pequenas quantidades de HAP no momento da colheita, provavelmente secundárias a poluição ambiental. No entanto, é na exposição à fumaça do “sapeco” e secagem da folhas que as concentrações de HAP aumentam. Em especial, a fase de secagem é a que mais contribui com a impregnação de HAP de alto peso molecular, com maior potencial carcinogênico. A erva mate contém altas concentrações de HAPs em várias marcas comercializadas no Rio Grande do Sul, porém um estudo de Golozar e colaboradores[58] demonstrou que as concentrações de HAP são muito reduzidas em marcas de erva mate que sofreram a secagem das folhas sem contato com a fumaça.

**4. METODOLOGIA RESUMIDA
DESTA TESE DE DOUTORADO**

4.1. Justificativa

O CCE é uma neoplasia de alta incidência no Rio Grande do Sul. Sua associação com o consumo de mate pode estar relacionado à exposição esofágica aos HAP existentes na erva mate. No entanto, há poucos estudos prospectivos que avaliem esta associação. A demonstração da exposição esofágica aos HAP é de suma importância para estabelecer o papel do consumo de chimarrão na patogênese do CCE e para planejar estratégias de rastreamento e prevenção desta neoplasia. É de grande relevância para o Estado do Rio Grande do Sul que esta associação seja determinada para que mudanças no processamento da erva mate possam ser estudados a fim de conferirem menor exposição esofágica aos HAP.

4.2. Questões de pesquisa

4.2.1. Quantidade crescentes de consumo de Chimarrão determinam aumento de exposição aos HAP?

4.2.2. Quais os metabólitos dos HAP são mais frequentemente encontrados na urina de consumidores de Chimarrão no Rio Grande do Sul?

4.3. Hipótese

O consumo de Mate causa exposição aos HAP de maneira proporcional às quantidades ingeridas.

4.4. Objetivos

4.4.1. Principal

Avaliar, prospectivamente, se a ingestão de Mate em doses progressivamente maiores está associada a maiores níveis de urinários de metabólitos dos HAP.

4.4.2. Secundário

Avaliar quais os principais metabólitos dos HAP observados em tomadores de Chimarrão.

4.5. Delineamento

Estudo Transversal.

4.6. Desenho do estudo

A amostra foi de conveniências, incluindo pacientes que vieram ao Centro Cirúrgico Ambulatorial (CCA) do HCPA ou ao setor de Endoscopia Digestiva do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Maria (HUSM) para serem submetidos a endoscopias digestivas altas (EDA) por outras indicações clínicas que não ligadura elástica de varizes de esôfago, CCE ou suas lesões precursoras, serão convidados para participar deste protocolo de pesquisa. Conforme descrito no fluxograma abaixo (Figura 5), os indivíduos que aceitarem participar da pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), responderão a questionário padronizado para coleta de dados demográficos e estimativa de consumo atual e passado de Mate, tabaco, álcool e carne vermelha (Anexo 2). Antes da realização de endoscopia serão coletados sangue e urina. Durante a endoscopia serão coletadas biópsias de mucosa normal do terço médio do esôfago. As amostras de sangue serão avaliados estudos futuros. As biópsias endoscópicas coradas pelo método Hematoxilina-Eosina (HE) já foram analisados no estudo apresentado no Exame Geral de Qualificação (EGQ), descrito no item 6 desta tese (“Resultados já analisados”). Demais lâminas de biópsia foram corados pelo reagente 8E11 e estão em análise para estudos futuros.

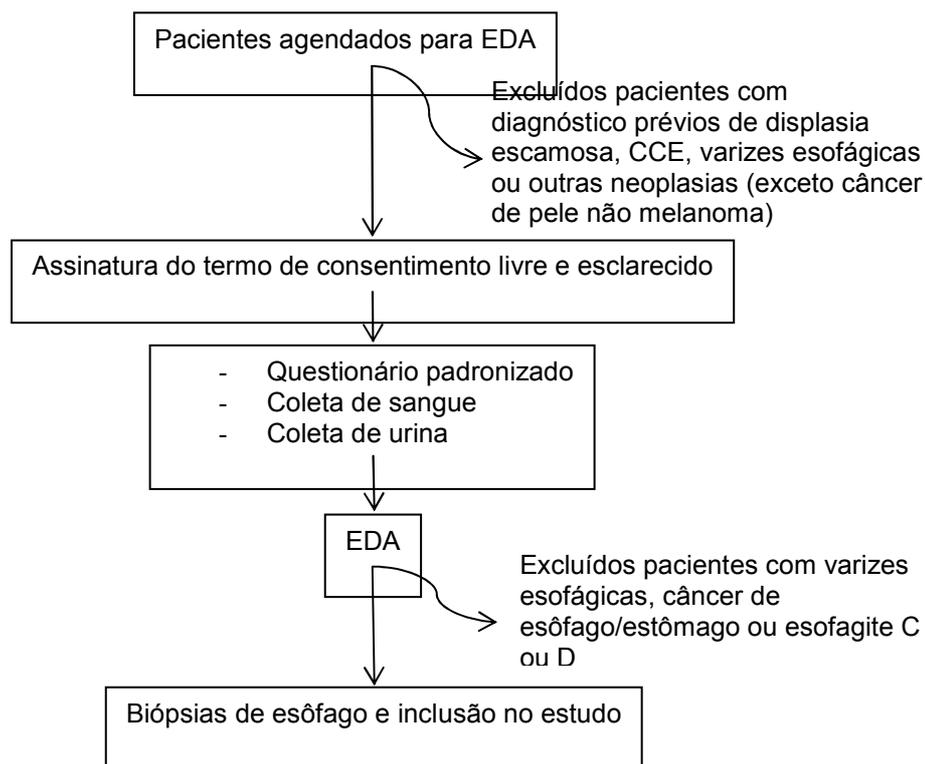


Figura 5 - Fluxograma do estudo. As amostras de sangue e biópsia serão analisados em outros estudos.

4.7. Seleção dos pacientes

4.7.1. Critérios de inclusão:

- Residir no Rio Grande do Sul
- Idade entre 30 e 70 anos
- Ter endoscopia digestiva alta (EDA) agendada por qualquer motivo clínico exceto displasia escamosa, CCE ou programa de ligadura elástica de varizes de esôfago
- Assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1)

4.7.2. Critérios de exclusão:

- História prévia ou diagnóstico atual de displasia escamosa do esôfago, CCE ou qualquer outro câncer exceto câncer de pele não melanoma
- Varizes esofágicas
- Esofagite erosiva acentuada (Grau C ou D pela classificação de Los Angeles)

4.7.3. Recrutamento:

O plano de recrutamento seria de incluir 250 pacientes para preencher os grupos abaixo listados (Figura 6). Cada faixa de consumo de mate deveria totalizar 25 pacientes do sexo feminino e

25 do sexo masculino. Os números por grupo “Tabagismo ativo (sim e não)” estão descritos como “12 a 13” pois o primeiro grupo a ser preenchido terá 13 pacientes e o outro terá 12, para atingirem um total de 25 pacientes. O número de pacientes incluídos se encontra no artigo original incluído nesta tese de doutorado.

	Sexo			
	Masculino		Feminino	
	Tabagismo ativo		Tabagismo ativo	
Consumo usual de mate (mL/dia)	Não	Sim	Não	Sim
0	12 a 13	12 a 13	12 a 13	12 a 13
1-500	12 a 13	12 a 13	12 a 13	12 a 13
501-1000	12 a 13	12 a 13	12 a 13	12 a 13
1001-2000	12 a 13	12 a 13	12 a 13	12 a 13
>2000	12 a 13	12 a 13	12 a 13	12 a 13

Figura 6 - Plano de inclusão de indivíduos conforme consumo de Chimarrão, sexo e tabagismo.

4.8. Coleta de dados

4.8.1. Questionário padronizado (Anexo 2)

Foram registrados idade, gênero, tabagismo, consumo usual de carne, churrasco, mate e bebidas alcoólicas, além de consumo recente de Mate (nos últimos 3 dias). O registro do consumo de carne foi realizado com auxílio de modelos plásticos de carne com 100 g de peso. A quantidade de Mate foi registrado conforme o consumo de garrafas térmicas de 1 litro ou com resposta de quantas cuias são consumidas. Quando a resposta foi baseada em números de cuias, os entrevistadores demonstraram fotos com cuias com diferentes volumes de água e os pacientes indicaram qual delas mais se aproxima da cuia usada por eles.

4.8.2. Coleta e análise de urina

Uma amostra de urina foi coletada para análise imediata de cotinina e creatinina. Dez mL de urina foram armazenados em 5 tubos criogênicos de 2 ml à menos 80°C para análise dos metabólitos dos HAP.

A cotinina urinária foi medida com uso de fitas reagentes NicAlert Strips (Jant Pharmaceutical Corp., Ensino, California, EUA) que estratificam os resultados em 7 categorias (de 0 a 6) de acordo com a concentração de cotinina na amostra (em ng/ml).

A creatinina urinária foi medida por colorimetria enzimática e expressada em mg/dl.

A análise das concentrações urinárias de metabólitos dos HAP foram conduzidas por extração *online* de fase sólida associada a método de cromatografia de alta performance. Os metabólitos aferidos são os

seguintes: 1-Naftol, 2-Naftol, 2-Hidroxifluoreno, 3-Hidroxifluoreno, 1 Hidroxifenantreno, 2-3-Hidroxifenantreno, e 1-Hidroxipireno.

**5. REFLEXÕES SOBRE ESTA
TESE DE DOUTORADO**

Este doutorado é fruto de uma colaboração internacional que busca esclarecer os fatores de risco para o CCE em áreas de moderada a alta incidência, possibilitando que fatores modificáveis sejam evitados e a frequência desta neoplasia decline. A influência dos HAP na carcinogênese de CCE e em outras neoplasias (bexiga, próstata, pulmão, mama e pâncreas) já é amplamente conhecida. No entanto, a contaminação por HAP pela poluição ambiental, tabagismo e churrasco não são suficientes para explicar a incidência de CCE em algumas áreas da América do Sul.

A medida objetiva de metabólitos dos HAP e sua correlação com consumo usual de chimarrão em indivíduos residentes no Rio Grande do Sul é pertinente. A correlação da ingestão usual de chimarrão com a presença de lesões microscópicas e moleculares na mucosa esofágica também é digna de nota, contribuindo para a evolução do conhecimento neste campo.

Desta forma, a demonstração que os HAP estão presentes na erva mate, atingindo e prejudicando indivíduos que consomem esta bebida tão tradicional, pode levar a uma mudança de paradigma: a erva mate produzida sem exposição à fumaça. Sem fins comerciais, este estudo se junta a outras publicações prévias com objetivo de reforçar a necessidade desta mudança de hábito que pode levar o chimarrão a ser uma tradição saudável.

6. ARTIGOS ORIGINAIS

Esta colaboração internacional gerou um estudo de grandes dimensões e com desfechos relevantes. Os resultados já avaliados e analisados deste estudo são descritos abaixo. :

- Resumo do estudo apresentado no Exame Geral de Qualificação (EGQ):

Is Maté (*Ilex paraguayensis*) drinking associated to structural findings of the esophageal mucosa? A prospective study.

Abstract

Background: Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus (SCCE) has high incidence in Rio Grande do Sul, the most southern Brazilian state. Maté drinking, (a hot infusion of *Ilex paraguayensis* that contains polycyclic aromatic hydrocarbons - PAH) which is considered a risk for SCCE, is frequently consumed in the south of Brazil. **Aim:** to access the association of esophageal precursor lesions with the amount of current hot Maté drinking. **Methods:** Participants with a upper GI endoscopy (UGIE) scheduled were prospectively included in this cross-sectional study, divided in 5 groups according to Maté consumption: a) group 1 – no Maté; b) group 2 – 1 to 500 mL/day; c) group 3 – 501 to 1000 mL/day; d) group 4 – 1001 to 2000 mL /day; group 5 – more than 2000 mL/day. We approach 250 individuals, divided in the five groups, with an equal distribution of gender and smokers/nonsmokers. We analyzed urinary cotinine with Accutest® NicAlert™ to have more accurate information on tobacco consumption. We excluded patients with any endoscopic lesion. We collected four biopsies from normal appearing middle esophagus. A single GI pathologist unaware of Maté drinking or tobacco consumption analyzed the slides stained by Hematoxylin-Eosin. PAH exposure was estimated by cotinine results and Maté drinking in three groups: a) no daily exposure; b) light to moderate exposure; c) heavy exposure. **Results:** We studied 245 individuals (130 women, mean age of 53.1 ± 10.1 years old). All Maté groups had equal distribution of gender, tobacco smoking, urine cotinine or distal macroscopic esophagitis. All patients had normal appearing middle esophagus on UGIE. Reflux esophagitis was equally distributed among Mate groups. Biopsies were considered normal in 223 subjects, and esophagitis was found in 32 subjects (13.1%). Age was a statistically significant predictor of esophagitis ($p = 0.011$ for linear-by-linear association). After adjusting for age, heavy Maté exposure (>2000 mL of Maté/day, RR= 4.837, IC 95% 1.387 – 16.862) and high estimated PAH exposure (RR= 5.084, IC 95% 1.261 – 20.496) predicted the presence of histological esophagitis. **Conclusion:** We did not find endoscopic abnormalities in the middle esophagus of the patients. Microscopic esophagitis was associated with older age, heavy Maté

ingestion and high estimated PAH exposure. Old age, heavy mate consumption and high PAH exposure were predictive for microscopic esophagitis.

- **Artigo original apresentado nesta Defesa de Doutorado, publicado em 2018 no periódico *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2018 Mar;27(3):331-337. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-17-0773. Epub 2017 Dec 20.):**

Urinary Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites in *Maté* Drinkers in Rio Grande do Sul, Brazil

Antonio Barros Lopes^{1,2*}, Marcela Metzdorf^{1,2}, Luiza Metzdorf^{1,2}, Marcos Paulo Ramalho^{1,2}, Caroline Kavalco^{2,3}, Arash Etemadi⁴, Natalie R. Pritchett⁴, Gwen Murphy⁴, Antonia M. Calafat⁵, Christian C. Abnet⁴, Sanford M. Dawsey⁴, Renato Borges Fagundes^{2,3}

¹Gastroenterology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ²Programa de Pós Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ³Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil; ⁴Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA; ⁵National Center for Environmental Health, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA.

Running title: Urinary PAH metabolites in *maté* drinkers

Keywords (MeSH): *Maté*, *Yerba maté*, *Ilex paraguariensis*, polycyclic aromatic hydrocarbons, pyrene

Additional information: Financial support: All funding for this study came from the Intramural Research Program of the National Cancer Institute.

*Corresponding author: Antonio Barros Lopes; E-mail address: ablopes77@gmail.com; Mailing address: Rua Ramiro Barcelos, 2400, second floor, ZIP code 90035-903, City Porto Alegre, State Rio Grande do Sul, Brazil; Phone number: +5551 99991-2021; Fax number: +5551 3335-2822

Conflict of interest: The authors declare no potential conflicts of interest.

Manuscript information: word count of the abstract is 250; word count of the text is 2,954; number of references is 31; number of tables and/or figures is 3; number of supplementary tables is 4.

ABSTRACT

Background: Consumption of *maté*, an infusion of the herb *Ilex paraguariensis* (*yerba maté*), is associated with increased risk of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), but the carcinogenic mechanism is unclear. Commercial brands of *yerba maté* contain high levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which are acquired during the traditional drying process. The purpose of this study was to characterize exposure to PAHs in *maté* drinkers over a wide range of *maté* consumption.

Methods: We recruited 244 adults who answered a questionnaire and collected a fasting spot urine specimen. We quantified urinary concentrations of seven PAH metabolites, and assessed associations between self-reported recent *maté* consumption and urinary PAH metabolites by multivariate regression.

Results: Recent *maté* consumption showed a significant dose-response association with 6 of 7 PAH metabolites in unadjusted models (p -for-trend <0.05). After adjustment for creatinine and potential confounders, concentrations of 2-naphthol, 1-hydroxyphenanthrene, and the sum of 2- and 3-hydroxyphenanthrene remained significantly associated with recent *maté* intake. The sum of the urinary concentrations of the phenanthrene metabolites was similar or higher among *maté* drinkers who did not smoke than among smokers who did not drink *maté*.

Conclusions: Urinary concentrations of PAH metabolites were significantly associated with self-reported amount of recent *maté* intake, and drinking *maté* increased urinary concentrations of some PAH metabolites as much as smoking cigarettes.

Impact: Drinking *maté* is a source of exposure to potentially carcinogenic PAHs, consistent with the hypothesis that the PAH content of *maté* may contribute to the increased risk of ESCC in *maté* drinkers.

INTRODUCTION

Esophageal cancer is a highly lethal disease, and was the sixth most common cause of cancer death in the world in 2012(1). Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC) is the most common histologic type of esophageal cancer worldwide, and it is by far the dominant type in low- and middle-income countries(2). This is also the case in southern Brazil (including Rio Grande do Sul state), Paraguay, Uruguay and Argentina, where the habit of drinking hot *maté* has been implicated in the high incidence of this cancer(3,4).

Maté is an aqueous infusion of the herb *Ilex paraguayensis* (also known as *yerba maté*) that is prepared in a gourd and is drunk hot through a metal straw, which delivers the liquid directly to oropharynx and esophagus. *Maté* is consumed in Rio Grande do Sul at temperatures that range between 63 and 69.5°C (5,6), and multiple studies have reported a positive association between amounts of *maté* intake and risk of ESCC (4,7-14).

The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified *maté* as "probably carcinogenic to humans" (group 2A) due to the consumption temperature(13). Furthermore, the infusion of *Ilex paraguariensis*, either hot or cold, has a high content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)(15-19). PAHs, a product of burning organic material, are classified by IARC as a group 1 carcinogen, i.e. carcinogenic to humans(20). Thus the high PAH content of *maté*, in addition to the hot temperature at which *maté* is consumed, may play a role in the risk of developing ESCC. There is also an association between *maté* consumption and PAH-associated cancers at other sites, such as the kidney, bladder, lung, and prostate, which have no exposure to thermal injury (21-23).

The traditional processing of *yerba maté* adds relatively high levels of PAHs to the final product (16-19). This process includes two drying steps: the first called "sapeco" is a rapid drying step where the leaves are exposed directly to fire or very high temperatures (400 – 750°C) to reduce moisture and stop degradation. In the second drying stage, the

leaves are placed in rotating cylinders heated by burning wood and exposed to lower temperatures (90 – 350°C) for 8 to 24 hours. Both steps increase the PAH content of the *yerba maté*(19). The avoidance of smoke exposure during those steps decreases the PAH content(18).

The aim of this study was to evaluate potential associations between amounts of *maté* consumption and exposure to PAHs (as measured by the urinary concentrations of PAH metabolites) among smokers and non-smokers in Rio Grande do Sul, Brazil, a high risk area for ESCC.

MATERIALS AND METHODS

Participants

This was a cross-sectional study with a convenience sample of participants recruited from patients from gastrointestinal disease clinics at two sites, Hospital de Clinicas de Porto Alegre and Hospital Universitario de Santa Maria. We conducted the research following the Helsinki recommendations for medical research involving human subjects. The Institutional Review Boards of both institutions approved the protocol, and all participants signed a written informed consent. The analysis of blinded specimens by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) laboratory and the participation of National Cancer Institute (NCI) and CDC staff in analyzing the blinded data were determined not to constitute engagement in human subjects' research.

We prospectively approached individuals between 30 and 70 years of age who were scheduled for upper GI endoscopy and had no previous history of any cancer (except for non-melanoma skin cancer). We aimed to enroll 250 subjects, equally divided among men and women, current smokers and nonsmokers, and five levels of *maté* consumption: none; 1 to 500 mL/day; 501 to 1000 mL/day; 1001 to 2000 mL/day and more than 2000 mL/day. In each level of *maté* consumption, we planned to recruit 25 men (half current smokers) and

25 women (half current smokers). We interviewed the patients using a standard questionnaire and collected one fasting spot urine sample.

Questionnaire

All individuals were interviewed face-to-face using a standard questionnaire, which was administered by one of five trained interviewers. The inquiry included: 1) basic demographic variables; 2) information on *maté* drinking (frequency of ingestion, self-reported typical amount in mL/day, amount ingested within the previous three days); 3) tobacco smoking habits (current or past smoking, number of cigarettes/day, duration of smoking, and time since quitting); 4) environmental exposure to smoke and passive smoke exposure (frequency and location – at work or home; the work or home environments were considered smoky if the answer to the questions “do you find your work smoky?” or “do you find your home smoky?” were “yes”); 5) barbecue eating and cooking habits (frequency of eating barbecue, grams of meat/meal, frequency of making barbecue, and the fuel used to grill); and 6) alcohol consumption (kind of beverage, average amount in mL/week). Individuals were considered *maté* drinkers or smokers if they were regularly engaged in these habits within the last year. To improve the accuracy of *maté* consumption, we showed photographs of different sizes of gourds to the participants and asked them to choose which one they typically used. The same technique was used to optimize the estimates of meat consumption, using plastic models of 100 gram pieces of meat.

Quantification of urinary PAH metabolites

Participants arrived fasting for their endoscopy exams and collected urine in a sterile container before endoscopy and any pre-endoscopy drug administration. Ten mL of urine was frozen immediately at -80°C, and the rest was analyzed for creatinine and cotinine (see below). Excess urine from 13 current smokers was combined to make a quality control pool

which was analyzed blindly 12 times to evaluate coefficients of variation (CV) for each PAH metabolite.

All frozen urine samples were shipped on dry ice first to the US National Cancer Institute and then to the Organic Analytical Toxicology Branch of the Division of Laboratory Sciences of the National Center for Environmental Health at the CDC. Quantification of the PAH metabolites was conducted by online solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry, as previously described(24). The following seven metabolites of PAHs were measured: 1-naphthol (CV=10.33), 2-naphthol (CV=12.59), 2-hydroxyfluorene (CV=13.12), 3-hydroxyfluorene (CV=13.34), 1-hydroxyphenanthrene (CV=15.33), sum of 2- and 3-hydroxyphenanthrene (Σ 2,3-hydroxyphenanthrene, CV=14.47), and 1-hydroxypyrene (CV=14.42). We also summed the urine concentrations of all measured metabolites of each parent PAH compound (Σ naphthols, Σ hydroxyfluorenes, Σ hydroxyphenanthrenes), so we could analyze these “parent compound” variables. Urine creatinine was measured by enzymatic colorimetry and expressed in mg/dL.

In addition to self-reported smoking, we measured urinary cotinine using Accutest® NicAlert™ strips (Jant Pharmaceutical Corp., Encino, CA). This assay, which measures exposure to tobacco smoke within the past 48 hours, was performed shortly after urine collection, according to the manufacturer’s instructions. Results ranged from 0 to 6 (0 – 2 = non-user of/no exposure to tobacco products (cotinine = 1 – 100 ng/mL); 3 – 6 = user of/exposure to tobacco products (including exposure to second hand tobacco smoke) (cotinine > 100 ng/mL)). Two members of the research team scored the cotinine dipstick results. A third reviewer, unaware of the patient’s smoking status, resolved disagreements by evaluating a photograph of the strip. A two-category cotinine-determined smoking status

of current nonsmoker or current smoker (due to primary, secondhand, or environmental exposure to tobacco smoke) was used for all statistical analyses.

Statistical analysis

Urinary concentrations of PAH metabolites are short-term markers reflecting only the past one to three days of PAH exposure (25,26). Thus, we categorized patients by their self-reported average daily *maté* intake within the past three days to evaluate the association of *maté* intake and the urinary PAH metabolites (the individual metabolites and the summed metabolites of each parent PAH compound). For categorical analyses, we divided the patients into quartiles based on this average recent *maté* intake: 1) *maté* quartile 1: 0 mL/day; 2) *maté* quartile 2: 1 – 600 mL/day; 3) *maté* quartile 3: 601 – 1500 mL/day; 4) *maté* quartile 4: >1500 mL/day.

Baseline and demographic characteristics of the study population were described by means and standard deviations (SD) or medians and interquartile ranges (IQR), and were compared across categories of *maté* intake by the chi-square test (for categorical variables) or the one-way analysis of variance (for continuous variables).

We calculated geometric means and 95% confidence intervals (95% CI) of the urinary concentrations of the PAH metabolites and the summed metabolite concentrations of the parent PAH compounds for each quartile of *maté* intake. Crude and multivariate associations between these concentrations and *maté* intake quartiles were examined in linear regression models. The final adjusted model included creatinine and all potentially confounding variables (age, sex, urine cotinine (current smoker/nonsmoker), a combined indoor smoke exposure variable (work and/or home smoky/both not smoky), fuel type (coal/other or none), days since last eating barbecue, days since last making barbecue, and log-creatinine). For completeness, we also examined crude and adjusted models of creatinine-corrected metabolite concentrations (ng/g creatinine), in which the adjusted

models did not include creatinine. We also tested the model for interactions by age, sex, days since eating barbecue, and days since making barbecue, but no significant associations were found. We constructed a jitter plot depicting the median and IQR of the creatinine-corrected PAHs for each of four categories combining recent *maté* drinking (yes/no) and cotinine-defined current cigarette smoking (yes/no) to demonstrate the effect of smoking and *maté* on the sum of all measured metabolites of each parent PAH compound. All analyses were performed using STATA 13.0 software (StataCorp, College Station, Texas). All p-values were two-sided tests and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

We compared the agreement between self-reported usual daily *maté* intake and average intake within the past three days, and the agreement between self-reported smoking status and that determined by the cotinine NicAlert® test, using Cohen's kappa coefficient.

RESULTS

We successfully enrolled 244 patients with a wide range of usual daily *maté* consumption (0 – 6000 ml/day. We found it difficult to enroll male smokers who drank >1000 mL/day. Table 1 summarizes the participants' characteristics by quartiles of average *maté* intake in the past three days. We found inverse associations between *maté* intake quartile and current alcohol drinking, days since eating barbecue, and days since making barbecue.

The geometric mean PAH urinary metabolite concentrations and their 95% CIs by quartile of *maté* intake in the past three days are presented in Table 2. We found a significant association between recent *maté* consumption and six of the seven measured PAH metabolites in unadjusted models (p-for-trend <0.05). There was also a significant association between recent *maté* consumption and the summed metabolites of 3 of the 4

parent PAH compounds. After adjustment for creatinine and potential confounders such as age, sex, urine cotinine-determined smoking status, indoor smoke exposure, barbecue cooking fuel, and days since eating or making barbecue, significant associations remained with three of the measured PAH metabolites and the summed measured metabolites of phenanthrene. When we performed this analysis using creatinine-corrected urinary metabolite concentrations (ng/g creatinine), the results were similar (Supplementary Table 1).

When the sums of all creatinine-corrected metabolite concentrations of each parent PAH compound were compared by recent *maté* drinking and cotinine-determined smoking status (Figure 1, Supplementary Table 2), we found a significant ($p \leq 0.01$) increase in concentrations of the biomarkers of fluorene, phenanthrene, and pyrene among *maté* drinkers, smokers, and patients who were both *maté* drinkers and smokers compared to patients with no recent exposure to either *maté* or tobacco smoke. Additionally, *maté* drinkers who did not smoke had equivalent or higher concentrations of the sum of the urinary metabolites of phenanthrene (mean 732 ng/g, median 532 ng.g) than smokers who did not drink *maté* (mean 673 ng/g, median 543 ng/g).

There was good agreement between self-reported usual daily *maté* intake and average intake within the past three days (weighted kappa test = 74.3%) (Supplementary Table 3). But these measures presented an irregular pattern, especially among individuals in the lowest level of usual daily *maté* intake (1 – 500 mL/day). This group included some people who said that they usually drink *maté* only on weekends or only in occasional social settings. Thus, their usual (estimated average) *maté* intake might be in the range of 1 – 500 mL/day, but they did not consume any *maté* in the three days before urine collection. There was also excellent agreement between self-reported smoking status and the smoking status determined by the cotinine NicAlert® test (kappa = 95.5%) (Supplementary Table 4).

DISCUSSION

Rio Grande do Sul has a high incidence of esophageal cancer, estimated by the National Institute of Cancer of Brazil to be 20.3 new cases/100,000 men and 6.6 new case/100,000 women in 2016(27). ESCC is by far the predominant histologic type(28,29), and its main risk factors are tobacco smoking, heavy alcohol consumption, barbecue eating/cooking, and *maté* drinking(7). *Maté* drinking, a widespread and deep-rooted habit in Rio Grande do Sul, usually starts at an early age. In previous studies, we have shown that commercial brands of *yerba maté* contain ~40ng of benzo[a]pyrene (B[a]P)/gm of leaves, and half of this B[a]P gets into the *maté* infusion(17). A typical gourd of *maté* , containing 50gm of leaves and drunk in the traditional way (refilling the gourd with water ~10-12 times) delivers ~ 1000ng B[a]P to the person drinking it, which is the same amount of B[a]P that is in the smoke of 100 cigarettes. We have hypothesized that the high PAH content and the high consumption temperature of *maté* may both contribute to the increased risk of ESCC observed in *maté* drinkers(15,17,18).

In the current study, we quantified the urinary concentrations of PAH metabolites in men and women, and smokers and non-smokers, living in Rio Grande do Sul. Besides these characteristics, we enrolled the patients based on their levels of *maté* drinking, so we could assess their PAH exposure over a wide range of *maté* consumption.

Fagundes *et al* previously detected 1-hydroxypyrene glucuronide in the urine of *maté* drinkers in Rio Grande do Sul(15). The differences between the current study and this previous one are that in the previous study the authors did not select the participants based on the amount of *maté* intake, they did not confirm the smoking status by measuring cotinine, and they measured only one urinary PAH metabolite, while we measured seven metabolites of four parent PAHs.

In our study, in unadjusted analyses, six of the seven measured PAH metabolites and the summed metabolites of three of four parent PAH compounds had significant dose-response associations with the amount of *maté* ingested in the past three days. After multivariate adjustment for creatinine and potential confounders, the associations of three of the seven measured PAH metabolites and the summed metabolites of phenanthrene remained significant. In addition, *maté* drinking increased the summed concentrations of the measured phenanthrene metabolites as much as cigarette smoking did.

The PAH content of commercial *yerba maté* is largely a contaminant acquired during the traditional drying of the *yerba maté* leaves, which involves many hours of contact with smoke(19), and avoiding smoke during this processing decreases the PAH content(18). This last study, by Golozar *et al*, showed that a commercial brand of *yerba maté* which was manufactured without exposure to smoke had 5.11 ng benzo[a]pyrene/gram of leaves, much lower than the 11.9-99.3 ng/g benzo[a]pyrene content of 11 other commercial brands of *yerba maté* processed in the traditional way (18). Thus, changes in commercial *yerba maté* manufacturing processes, along with public education about the beneficial effects of drinking *maté* at lower temperatures, can probably decrease the carcinogenic risk of *maté* and make it a safer and healthier drink. Moreover, a reduction of PAH content in commercial *yerba maté* may also have an impact on the risk of other PAH-associated neoplasms such as kidney, bladder, lung, and prostate cancer.

Our study had a number of strengths. Our participants had a wide range of *maté* intake. We recorded both the usual daily consumption and the intake within the three days before the urine collection. We showed photographs of different size gourds to the participants to better estimate the amount of *maté* they consumed. Urinary cotinine was measured to minimize inaccuracy of self-reported data on tobacco smoking, and it showed excellent correlation with questionnaire data. Potential confounders of *maté*-related PAH

exposure, such as exposure to current smoking, environmental smoke, and eating or cooking barbecue, were equally distributed among individuals in the four *maté* intake quartiles (Table 1), and they were included as adjusting variables in the regression analyses.

Our study also had some limitations. Our patients were enrolled in tertiary hospitals, and thus may not reflect the general population of southern Brazil. Indeed, there are earlier reports of the average *maté* consumption in this region ranging from 1200 to 1800 ml/day(5,6), and reports of it not being uncommon to find people who drink more than 2 liters/day, but this was not our experience. Many people with digestive symptoms refrain from drinking *maté*, or reduce their intake, which may help explain why recruiting patients in gastrointestinal disease clinics in referral hospitals enrolled fewer patients with very high consumption. Recruiting participants exclusively in tertiary hospitals may also have affected generalizability with respect to smoking habits, since quitting smoking is highly encouraged in such hospitals. Our study relied solely on self-reported information on many habits, which could be subject to inaccuracy. Finally, we did not collect information on *maté* consumption temperature in the current study. While it is true that the temperature of hot infusions may influence the risk of ESCC(3,7,8,12,30,31), the PAH content in *maté* is not affected by the water temperature(17).

In conclusion, in this study, urinary concentrations of PAH metabolites were significantly associated with self-reported amount of recent *maté* intake, and drinking *maté* increased urinary concentrations of some PAH metabolites as much as smoking cigarettes. These results confirm that drinking *maté* is a source of exposure to potentially carcinogenic PAHs, consistent with the hypothesis that the PAH content of *maté* may contribute to the increased risk of ESCC in *maté* drinkers.

Acknowledgements: We acknowledge Yuesong Wang, Kendra Hubbard, Lei Meng, Nikki Pittman, Debra Trinidad, and Xiaoyun Ye for their technical assistance measuring PAH biomarkers.

Disclaimer: The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the official position of the Centers for Disease Control and Prevention. Use of trade names is for identification only and does not imply endorsement by the CDC, the Public Health Service, or the US Department of Health and Human Services.

REFERENCES

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **2015**;136(5):E359-86 doi 10.1002/ijc.29210.
2. Arnold M, Soerjomataram I, Ferlay J, Forman D. Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012. *Gut* **2015**;64(3):381-7 doi 10.1136/gutjnl-2014-308124.
3. Islami F, Boffetta P, Ren JS, Pedoeim L, Khatib D, Kamangar F. High-temperature beverages and foods and esophageal cancer risk--a systematic review. *Int J Cancer* **2009**;125(3):491-524 doi 10.1002/ijc.24445.
4. Andrici J, Eslick GD. Mate consumption and the risk of esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Dis Esophagus* **2013**;26(8):807-16 doi 10.1111/j.1442-2050.2012.01393.x.
5. de Barros SG, Ghisolfi ES, Luz LP, Barlem GG, Vidal RM, Wolff FH, *et al.* [High temperature "mate" infusion drinking in a population at risk for squamous cell carcinoma of the esophagus]. *Arq Gastroenterol* **2000**;37(1):25-30.
6. Victora CG, Munoz N, Horta BL, Ramos EO. Patterns of mate drinking in a Brazilian city. *Cancer Res* **1990**;50(22):7112-5.
7. Castellsague X, Munoz N, De Stefani E, Victora CG, Castelletto R, Rolon PA. Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. *Int J Cancer* **2000**;88(4):658-64.
8. De Stefani E, Boffetta P, Fagundes RB, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, Acosta G, *et al.* Nutrient patterns and risk of squamous cell carcinoma of the esophagus: a factor analysis in uruguay. *Anticancer Res* **2008**;28(4C):2499-506.
9. De Stefani E, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, Boffetta P, Brennan P, Munoz N, *et al.* Food groups and risk of squamous cell carcinoma of the oesophagus: a case-control study in Uruguay. *Br J Cancer* **2003**;89(7):1209-14 doi 10.1038/sj.bjc.6601239.
10. Vassallo A, Correa P, De Stefani E, Cendan M, Zavala D, Chen V, *et al.* Esophageal cancer in Uruguay: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* **1985**;75(6):1005-9.
11. De Stefani E, Munoz N, Esteve J, Vasallo A, Victora CG, Teuchmann S. Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Res* **1990**;50(2):426-31.
12. Castelletto R, Castellsague X, Munoz N, Iscovich J, Chopita N, Jmelnitsky A. Alcohol, tobacco, diet, mate drinking, and esophageal cancer in Argentina. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1994**;3(7):557-64.
13. Loomis D, Guyton K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, *et al.* Carcinogenicity of drinking coffee, mate, and very hot beverages. *The Lancet Oncology* **2016**;17(7):877-8 doi 10.1016/S1470-2045(16)30239-X.
14. Lubin JH, De Stefani E, Abnet CC, Acosta G, Boffetta P, Victora C, *et al.* Mate drinking and esophageal squamous cell carcinoma in South America: pooled results from two large multicenter case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2014**;23(1):107-16 doi 10.1158/1055-9965.EPI-13-0796.
15. Fagundes RB, Abnet CC, Strickland PT, Kamangar F, Roth MJ, Taylor PR, *et al.* Higher urine 1-hydroxy pyrene glucuronide (1-OHPG) is associated with tobacco smoke exposure and drinking mate in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil. *BMC Cancer* **2006**;6:139 doi 10.1186/1471-2407-6-139.
16. Garcia Londono VA, Reynoso M, Resnik S. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) from the Argentinean market. *Food Addit Contam Part B Surveill* **2014**;7(4):247-53 doi 10.1080/19393210.2014.919963.

17. Kamangar F, Schantz MM, Abnet CC, Fagundes RB, Dawsey SM. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2008**;17(5):1262-8 doi 10.1158/1055-9965.EPI-08-0025.
18. Golozar A, Fagundes RB, Etemadi A, Schantz MM, Kamangar F, Abnet CC, *et al.* Significant variation in the concentration of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in yerba mate samples by brand, batch, and processing method. *Environ Sci Technol* **2012**;46(24):13488-93 doi 10.1021/es303494s.
19. Vieira MA, Maraschin M, Rovaris AA, Amboni RD, Pagliosa CM, Xavier JJ, *et al.* Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons throughout the processing stages of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **2010**;27(6):776-82 doi 10.1080/19440041003587310.
20. Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Coglianò V. Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Lancet Oncology* **2005**;6(12):931-2 doi 10.1016/s1470-2045(05)70458-7.
21. Bates MN, Hopenhayn C, Rey OA, Moore LE. Bladder cancer and mate consumption in Argentina: a case-control study. *Cancer Lett* **2007**;246(1-2):268-73 doi 10.1016/j.canlet.2006.03.005.
22. Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, De Stefani E, Boffetta P, Correa P, Mendilaharsu M, *et al.* Food groups and risk of prostate cancer: a case-control study in Uruguay. *Cancer Causes Control* **2012**;23(7):1031-8 doi 10.1007/s10552-012-9968-z.
23. Stefani ED, Moore M, Aune D, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, Boffetta P, *et al.* Mate consumption and risk of cancer: a multi-site case-control study in Uruguay. *Asian Pac J Cancer Prev* **2011**;12(4):1089-93.
24. Wang Y, Meng L, Pittman EN, Etheredge A, Hubbard K, Trinidad DA, *et al.* Quantification of urinary mono-hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2017**;409(4):931-7 doi 10.1007/s00216-016-9933-x.
25. Buckley TJ, Liroy PJ. An examination of the time course from human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons to urinary elimination of 1-hydroxypyrene. *Br J Ind Med* **1992**;49(2):113-24.
26. Kang DH, Rothman N, Poirier MC, Greenberg A, Hsu CH, Schwartz BS, *et al.* Interindividual differences in the concentration of 1-hydroxypyrene-glucuronide in urine and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in peripheral white blood cells after charbroiled beef consumption. *Carcinogenesis* **1995**;16(5):1079-85.
27. Nacional Institute of Cancer - Brazil. Estimated new cases of esophageal cancer in 2016; consulted in Aug/26/2016. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tabelaestados.asp?UF=RS>.
28. de Barros SG, Vidal RM, Luz LP, Ghisolfi ES, Barlem GG, Komlos F, *et al.* [Prevalence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in a 10 year period at a cancer referral center in southern Brazil]. *Arq Gastroenterol* **1999**;36(1):32-6.
29. Fagundes RB, de Carli D, Xaubet RV, Cantarelli JC, Jr. Unchanging pattern of prevalence of esophageal cancer, overall and by histological subtype, in the endoscopy service of the main referral hospital in the central region of Rio Grande do Sul State, in Southern Brazil. *Dis Esophagus* **2015** doi 10.1111/dote.12350.
30. Sewram V, De Stefani E, Brennan P, Boffetta P. Mate consumption and the risk of squamous cell esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2003**;12(6):508-13.

31. Islami F, Pourshams A, Nasrollahzadeh D, Kamangar F, Fahimi S, Shakeri R, *et al.* Tea drinking habits and oesophageal cancer in a high risk area in northern Iran: population based case-control study. *BMJ* **2009**;338:b929 doi 10.1136/bmj.b929.

Table 1. Characteristics of the study participants in Rio Grande do Sul, Brazil

		Total	Maté Quartile ^a				p value
			Q1 0ml	Q2 1-600ml	Q3 601-1500ml	Q4 >1500ml	
<i>Characteristic</i>							
Total participants, No. (%)		244	79 (32)	44 (18)	70 (29)	51 (21)	---
Mean age, years (SD)		53 (10)	55 (10)	53 (11)	54 (10)	50 (9)	0.20 ^b
Sex, N (%)	Males	114 (47)	37 (47)	20 (45)	35 (50)	22 (43)	0.90 ^c
	Females	130 (53)	42 (53)	24 (55)	35 (50)	29 (57)	---
Reported current smoker, N (%)	Yes	109 (45)	37 (47)	20 (45)	28 (40)	24 (47)	0.83 ^c
	No	135 (55)	42 (53)	24 (55)	42 (60)	27 (53)	---
Urine cotinine, N (%)	Current Smoker	116 (48)	37 (47)	21 (48)	30 (43)	28 (55)	0.63 ^c
	Nonsmoker	128 (52)	42 (53)	23 (52)	40 (57)	23 (45)	---
Current alcohol drinker, N (%)	Yes	76 (31)	32 (41)	16 (36)	22 (31)	6 (12)	0.005 ^c
	No	168 (69)	47 (59)	28 (64)	48 (69)	45 (88)	---
Work smoky ^d , N (%)	Yes	18 (7)	4 (5)	2 (5)	6 (9)	6 (12)	0.44 ^c
	No	226 (93)	75 (95)	42 (95)	64 (91)	45 (88)	---
Home smoky ^d , N (%)	Yes	57 (23)	14 (18)	8 (18)	17 (24)	18 (35)	0.19 ^c
	No	187 (77)	65 (82)	36 (82)	53 (76)	33 (65)	---
Ever eat BBQ, N (%)	Yes	230 (94)	72 (91)	41 (93)	67 (96)	50 (98)	0.37 ^c
	No	14 (6)	7 (9)	3 (7)	3 (4)	1 (2)	---
Days since eating BBQ, mean (SD)		17 (41)	28 (66)	13 (14)	9 (12)	15 (29)	0.04 ^F
Ever make barbecue, N (%)	Yes	78 (32)	22 (28)	16 (36)	25 (36)	15 (29)	0.75 [□]
	No	150 (61)	50 (63)	25 (57)	41 (59)	34 (67)	---
	None	16 (7)	7 (9)	3 (7)	4 (5)	2 (4)	---
Days since making BBQ, mean (SD)		25 (42)	38 (60)	27 (27)	15 (19)	21 (45)	0.03 ^F
Barbecue cooking fuel, N (%)	Coal	192 (79)	69 (87)	33 (75)	51 (73)	39 (76)	0.14 ^{□c}
	Other/none	52 (21)	10 (13)	11 (25)	19 (27)	12 (24)	---

^a N (column %) within characteristic, mean (SD) shown for continuous characteristics

^b P values were calculated by an ANOVA comparison of means test.

^c P values were calculated by a two-sided Pearson χ^2 test.

^d The work or home environments were considered smoky if the answer to the questions “do you find your work smoky?” or “do you find your home smoky?” were “yes”.

Table 2. PAH metabolite concentrations (geometric mean (confidence interval)) by quartile of average daily *maté* intake in the past three days

Analyte	Abbreviation	Maté Quartile				Crude p-trend	Adjusted ^b p-trend
		Q1 ^a	Q2	Q3	Q4		
		0ml	1-600ml	601-1500ml	>1500ml		
<i>PAH metabolite concentrations (ng/L) - All participants</i>							
1-Naphthol	1-nap	7,217 (4,776-10,907)	8,428 (5,522-12,864)	6,771 (5,156-8,892)	11,045 (7,364-16,567)	0.08	0.30
2-Naphthol	2-nap	11,285 (8,885-14,333)	13,582 (10,614-17,380)	12,760 (10,373-15,695)	14,557 (10,564-20,058)	0.02	0.03
	Σ-naphthols	21,488 (15,614-29,570)	24,983 (18,163-34,363)	20,525 (16,440-25,625)	28,118 (19,954-39,624)	0.10	0.19
2-Hydroxyfluorene	2-flu	660 (492-884)	816 (610-1,092)	761 (613-945)	890 (638-1,241)	0.02	0.11
3-Hydroxyfluorene	3-flu	339 (243-474)	421 (295-601)	385 (298-499)	502 (344-732)	0.02	0.39
	Σ-fluorenes	1,013 (747-1,374)	1,253 (917-1,711)	1,160 (924-1,458)	1,405 (994-1,988)	0.02	0.19
1-Hydroxyphenanthrene	1-phe	220 (178-272)	417 (334-519)	521 (447-606)	642 (504-817)	p<0.0001	p<0.0001
2-3-Hydroxyphenanthrene	2-3-phe	260 (209-324)	361 (287-454)	405 (354-463)	456 (355-585)	p<0.0001	0.004
	Σ-phenanthrenes	489 (395-604)	789 (635-981)	936 (814-1,077)	1,108 (870-1,410)	p<0.0001	0.001
1-Hydroxypyrene	1-PYR	284 (232-348)	361 (287-454)	359 (308-417)	400 (316-508)	0.001	0.06

^a Q1 was the reference category for all models^b Fully adjusted for age, sex, urine cotinine-determined smoking status (current smoker, nonsmoker), indoor smoke exposure (reported at work and/or at home), fuel type (coal vs. other or none), days since last eating barbecue, days since last making barbecue, and log-creatinine

FIGURE LEGEND

Figure 1. Creatinine-corrected urine metabolite concentrations plotted by recent *maté* consumption and cotinine-determined smoking status (* $p < 0.01$).

FIGURE DESCRIPTION

Figure 1 contains creatinine-corrected PAH urine metabolite concentrations plotted by recent *maté* consumption and cotinine-determined smoking status

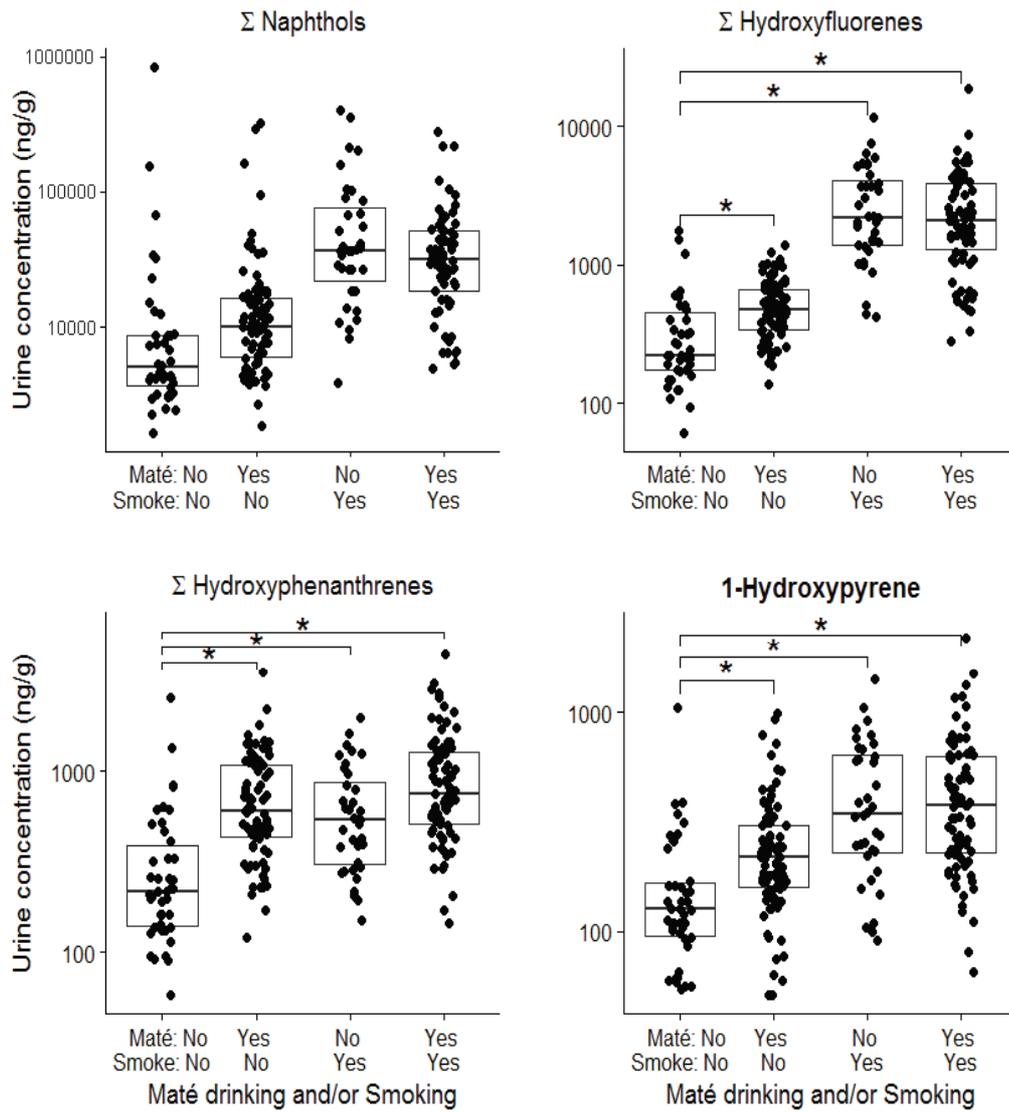


Figure 1.

7. DIRETRIZES FUTURAS

As diretrizes futuras são da descrição de outros desfechos que ainda se encontram em avaliação:

- avaliação direta de adutos dos HAP ao DNA da mucosa esofágica em indivíduos com diferentes quantidades de ingestão de chimarrão, residentes do Rio Grande do Sul;

- análise de polimorfismos genéticos e sua correlação com excreção urinária de metabólitos dos HAP;

- análise de polimorfismos genéticos e sua correlação com a quantificação dos adutos dos HAP ao DNA de biópsias esofágicas;

- padronização de extração de DNA e avaliação de adutos dos HAP ao DNA de macerado de biópsias armazenadas em solução RNAlater®;

- replicar este estudo em indivíduos expostos somente a erva mate produzida sem exposição à fumaça.

8. ANEXOS

Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nº NO ESTUDO: |_|_|_|_|_|

Associação do consumo de Chimarrão e a exposição do epitélio esofágico a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos – GPPG nº 11-0239

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Consumo de mate é uma prática comum no Rio Grande do Sul. Nós estamos estudando os efeitos da ingestão de chimarrão na pele que recobre o esôfago. Já que você já tem uma endoscopia agendada, nós gostaríamos de lhe convidar para participar de uma pesquisa científica.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo deste estudo é comparar os hábitos de ingestão de chimarrão com alguns aspectos da mucosa esofágica (pele que recobre internamente o esôfago), para entender melhor o efeito do mate na saúde do esôfago.

DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE PESQUISA

Após ter aceitado entrar na pesquisa, tendo assinado este documento e recebido cópia, você responderá as perguntas de uma entrevista curta, coletará uma amostra de urina em um pote. Nesta pequena entrevista você responderá perguntas sobre consumo de chimarrão, churrasco, cigarros e bebidas alcoólicas. Será coletada uma amostra de 8 ml de sangue (equivalente a 2 colheres de chá) da mesma veia onde será administrado o sedativo da endoscopia, não sendo necessário que você seja picado mais de uma vez. Após responder o questionário e coletar sangue, será realizada sua endoscopia. Durante a endoscopia serão coletadas 4 biópsias (pequenas amostras de tecido) da camada interna do esôfago, para serem examinadas nesta pesquisa. Amostras coletadas neste estudo serão armazenadas e poderão ser usadas no futuro para análises adicionais incluindo testes genéticos relacionados ao consumo de chimarrão e a saúde do seu esôfago. Qualquer estudo adicional será realizado somente após aprovação do comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

RISCOS DE PARTICIPAR NO ESTUDO

Não há riscos envolvidos na entrevista ou coleta de urina. A coleta de sangue será feita na mesma veia já puncionada para a sedação da endoscopia, não havendo necessidade de uma segunda picada. Existe uma mínima chance de sangramento local no esôfago após a coleta das biópsias. A chance de sangramento mais grave que necessite de transfusão sanguínea é de menos que 1 para 1000. Os procedimentos propostos apresentam poucos riscos e serão realizados no hospital em ambiente cirúrgico ambulatorial com as devidas condições para sedação e recuperação dos pacientes. Os procedimentos serão realizados por profissionais experientes e caso ocorra alguma complicação o participante do estudo irá receber atenção integral e gratuita.

BENEFÍCIOS NA PARTICIPAÇÃO

Você não terá nenhum benefício em participar desta pesquisa, mas a sua participação neste estudo pode ajudar os médicos a entenderem melhor os efeitos do chimarrão na saúde do seu esôfago.

CONFIDENCIALIDADE

Os resultados gerados nesta pesquisa são confidenciais e sua identidade não será revelada.

SUA PARTICIPAÇÃO É VOLUNTÁRIA E NÃO APRESENTA CUSTO FINANCEIRO

A escolha de entrar ou não entrar no estudo é inteiramente sua. Você não será pago para participar desta pesquisa e nem mesmo necessita pagar por qualquer procedimento. Você pode se recusar de participar desta pesquisa sem qualquer prejuízo ao seu atendimento ou tratamento médico.

Nº NO ESTUDO: |_|_|_|_|_|

QUEM DEVE CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS

Se você tiver qualquer dúvida pode perguntar a qualquer dos membros da pesquisa, ao Dr. Antônio Lopes (Tel. 51 9991-2021), ao Dr. Renato Borges Fagundes (Tel. 3308-5616) ou ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Tel. 3359-8304). Endereço para contato no Hospital de Clínicas de Porto Alegre é Rua Ramiro Barcelos 2350, sala 2033, Serviço de Gastroenterologia (Tel. 3359-8307).

CERTIFICAÇÃO

Eu, _____, tive a chance de ler estas explicações sobre o estudo e estas foram discutidas comigo. Eu tive todas as minhas perguntas respondidas. Eu dou consentimento livre e aceito participar deste estudo.

_____/_____/_____
(Assinatura do participante) (Data da assinatura)

_____/_____/_____
(Assinatura da testemunha) (Data da assinatura)

_____/_____/_____
(Assinatura do pesquisador) (Data da assinatura)

ARMAZENAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Eu, _____, autorizo o armazenamento de sangue e urina coletados nesta pesquisa, que podem ser utilizadas futuramente em outras pesquisas, conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

_____/_____/_____
(Assinatura do participante) (Data da assinatura)

_____/_____/_____
(Assinatura da testemunha) (Data da assinatura)

_____/_____/_____
(Assinatura do pesquisador) (Data da assinatura)

RECEBIMENTO DE SEGUNDA VIA DO TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, confirmo que recebi uma cópia deste termo de consentimento.

_____/_____/_____
(Assinatura do participante) (Data da assinatura)

_____/_____/_____
(Assinatura da testemunha) (Data da assinatura)

Nº NO ESTUDO: **Anexo 2 – Questionário Padronizado****Consumo de mate e exposição aos HAPs (Estudo MATCH)****NOME:****DATA:****ENDEREÇO:****TELEFONE:****1. NÚMERO DE REGISTRO:****2. SEXO:****3. DATA DE NASCIMENTO:****4. INDICAÇÃO PARA ENDOSCOPIA:****5. FUMO**

5.1 VOCÊ JÁ FUMOU DE MANEIRA REGULAR (DIARIAMENTE POR MAIS DE 6 MESES)?

(1) SIM _____ (2) NÃO _____

(SE A RESPOSTA FOR NÃO, PULE PARA QUESTÃO DE NÚMERO 6)

5.2 VOCÊ FUMA CIGARROS ATUALMENTE? (1) SIM _____ (2) NÃO _____

(SE A RESPOSTA FOR SIM, PULE PARA QUESTÃO DE NÚMERO 5.4)

5.3 HÁ QUANTO TEMPO VOCÊ PAROU DE FUMAR?

_____ [(1)dias/(2)semanas/(3)meses/(4)anos/(5)não sabe]

5.4 IDADE QUANDO INICIOU

5.5 IDADE NA QUAL PAROU (não aplicável para fumantes ativos)

5.6 O QUE VOCÊ FUMA?

(1) CIGARROS COM FILTRO _____

(2) CIGARROS SEM FILTRO _____

(3) PALHEIRO _____

(4) OUTROS _____

5.7 QUANTOS CIGARROS VOCÊ FUMA POR DIA?

6. EXPOSIÇÃO A FUMAÇA AMBIENTAL/ FUMO PASSIVO

6.1 VOCÊ ACHA SUA CASA ESFUMAÇADA? (1) SIM _____ (2) NÃO _____

6.2 SEU LOCAL DE TRABALHO É ESFUMAÇADO? (1) SIM _____ (2) NÃO _____

6.3 SE RESPOSTA(S) AFIRMATIVA(S), QUANTAS HORAS POR SEMANA VOCÊ FICA NESTES AMBIENTES? _____ (HORAS POR SEMANA)

7. CARNE E CHURRASCO

7.1 VOCÊ COME CHURRASCO? (1) SIM _____ (2) NÃO _____

(SE A RESPOSTA FOR NÃO, PULE PARA QUESTÃO DE NÚMERO 7.3)

7.2 QUANTAS VEZES VOCÊ COME CHURRASCO?

_____ [(1)semana/(2)mês/(3)ano/(4)não sabe]

Nº NO ESTUDO:

7.3 QUANTOS GRAMAS DE CARNE VOCÊ COME NO CHURRASCO? _____

7.4 O QUE É USADO PARA FAZER FOGO?

- (1) MADEIRA _____
 (2) CARVÃO _____
 (3) GÁS _____

7.5 QUANDO FOI A ÚLTIMA VEZ QUE VOCÊ COMEU CHURRASCO?

HÁ _____ [(1)dias/(2)semanas/(3)meses/(4)ano/(6)não sabe]

7.6 VOCÊ ASSA O CHURRASCO? (1) SIM _____ (2) NÃO _____
(SE A RESPOSTA FOR NÃO, PULE PARA QUESTÃO DE NÚMERO 8)

7.7 COM QUE FREQUÊNCIA VOCÊ ASSA CHURRASCOS?

_____ [(1)semana/(2)mês/(3)ano/(4)não sabe]

7.8 QUANDO FOI A ÚLTIMA VEZ QUE VOCÊ ASSOU CHURRASCO?

HÁ _____ [(1)dias/(2)semanas/(3)meses/(4)ano/(6)não sabe]

8. MATE8.1 VOCÊ TOMA CHIMARRÃO? (1) SIM _____ (2) NÃO _____
(SE A RESPOSTA FOR NÃO, PULE PARA QUESTÃO DE NÚMERO 9)

8.2 QUANTAS DIAS POR SEMANA VOCÊ COSTUMA TOMAR CHIMARRÃO? _____

8.3 QUANTO MATE VOCÊ CONSOME EM CADA DIA? _____ (ml/dia)

Comentários: _____

8.4 QUANTO MATE VOCÊ CONSUMIU NOS ÚLTIMOS 3 DIAS? _____ ml

Comentários: _____

8.5 QUE MARCA DE ERVA MATE VOCÊ COSTUMA TOMAR? _____

9. BEBIDAS ALCOÓLICAS

9.1 VOCÊ BEBE BEBIDAS ALCÓLICAS? (1) SIM _____ (2) NÃO _____

9.2. SE SIM, PREENCHA A TABELA ABAIXO:

TIPO DE BEBIDA	ML/SEMANA	GRAMAS/SEMANA*
CERVEJA (6%)		
VINHO (12%)		
CACHAÇA (40%)		
OUTROS		

*0.8 x QUANTIDADE EM ML/SEMANA x % / 100

Membro da equipe que entrevistou_____/_____/_____
Data (dia/mês/ano)

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. E359-86.
2. Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D., *Global cancer statistics*. *CA Cancer J Clin*, 2011. **61**(2): p. 69-90.
3. Arnold, M., Soerjomataram, I., Ferlay, J., and Forman, D., *Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012*. *Gut*, 2015. **64**(3): p. 381-7.
4. Cook, M.B., Chow, W.H., and Devesa, S.S., *Oesophageal cancer incidence in the United States by race, sex, and histologic type, 1977-2005*. *Br J Cancer*, 2009. **101**(5): p. 855-9.
5. Brown, L.M., Devesa, S.S., and Chow, W.H., *Incidence of adenocarcinoma of the esophagus among white Americans by sex, stage, and age*. *J Natl Cancer Inst*, 2008. **100**(16): p. 1184-7.
6. Bosetti, C., Levi, F., Ferlay, J., Garavello, W., Lucchini, F., Bertuccio, P., et al., *Trends in oesophageal cancer incidence and mortality in Europe*. *Int J Cancer*, 2008. **122**(5): p. 1118-29.
7. Orengo, M.A., Casella, C., Fontana, V., Filiberti, R., Conio, M., Rosso, S., et al., *Trends in incidence rates of oesophagus and gastric cancer in Italy by subsite and histology, 1986-1997*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2006. **18**(7): p. 739-46.
8. Castro, C., Bosetti, C., Malvezzi, M., Bertuccio, P., Levi, F., Negri, E., et al., *Patterns and trends in esophageal cancer mortality and incidence in Europe (1980-2011) and predictions to 2015*. *Ann Oncol*, 2014. **25**(1): p. 283-90.
9. Gholipour, C., Shalchi, R.A., and Abbasi, M., *A histopathological study of esophageal cancer on the western side of the Caspian littoral from 1994 to 2003*. *Dis Esophagus*, 2008. **21**(4): p. 322-7.
10. Wakhisi, J., Patel, K., Buziba, N., and Rotich, J., *Esophageal cancer in north rift valley of Western Kenya*. *Afr Health Sci*, 2005. **5**(2): p. 157-63.
11. de Barros, S.G., Vidal, R.M., Luz, L.P., Ghisolfi, E.S., Barlem, G.G., Komlos, F., et al., *[Prevalence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in a 10 year period at a cancer referral center in southern Brazil]*. *Arq Gastroenterol*, 1999. **36**(1): p. 32-6.
12. Fagundes, R.B., de Carli, D., Xaubet, R.V., and Cantarelli, J.C., Jr., *Unchanging pattern of prevalence of esophageal cancer, overall and by histological subtype, in the endoscopy service of the main referral hospital in the central region of Rio Grande do Sul State, in Southern Brazil*. *Dis Esophagus*, 2015.
13. Toh, Y., Oki, E., Ohgaki, K., Sakamoto, Y., Ito, S., Egashira, A., et al., *Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: molecular mechanisms of carcinogenesis*. *Int J Clin Oncol*, 2010. **15**(2): p. 135-44.
14. Kamangar, F., Chow, W.H., Abnet, C.C., and Dawsey, S.M., *Environmental causes of esophageal cancer*. *Gastroenterol Clin North Am*, 2009. **38**(1): p. 27-57, vii.
15. Islami, F., Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Jenab, M., Scotti, L., et al., *Alcohol drinking and esophageal squamous cell carcinoma with focus on light-drinkers and never-smokers: a systematic review and meta-analysis*. *Int J Cancer*, 2011. **129**(10): p. 2473-84.
16. Castellsague, X., Munoz, N., De Stefani, E., Victora, C.G., Castelletto, R., and Rolon, P.A., *Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America*. *Int J Cancer*, 2000. **88**(4): p. 658-64.

17. Islami, F., Boffetta, P., Ren, J.S., Pedoeim, L., Khatib, D., and Kamangar, F., *High-temperature beverages and foods and esophageal cancer risk--a systematic review*. *Int J Cancer*, 2009. **125**(3): p. 491-524.
18. Munoz, N., Victora, C.G., Crespi, M., Saul, C., Braga, N.M., and Correa, P., *Hot mate drinking and precancerous lesions of the oesophagus: an endoscopic survey in southern Brazil*. *Int J Cancer*, 1987. **39**(6): p. 708-9.
19. Islami, F., Pourshams, A., Nasrollahzadeh, D., Kamangar, F., Fahimi, S., Shakeri, R., et al., *Tea drinking habits and oesophageal cancer in a high risk area in northern Iran: population based case-control study*. *BMJ*, 2009. **338**: p. b929.
20. Loomis, D., Guyton, K., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., et al., *Carcinogenicity of drinking coffee, mate, and very hot beverages*. *The Lancet Oncology*, 2016. **17**(7): p. 877-8.
21. Chen, Y.K., Lee, C.H., Wu, I.C., Liu, J.S., Wu, D.C., Lee, J.M., et al., *Food intake and the occurrence of squamous cell carcinoma in different sections of the esophagus in Taiwanese men*. *Nutrition*, 2009. **25**(7-8): p. 753-61.
22. De Stefani, E., Deneo-Pellegrini, H., Ronco, A.L., Boffetta, P., Brennan, P., Munoz, N., et al., *Food groups and risk of squamous cell carcinoma of the oesophagus: a case-control study in Uruguay*. *Br J Cancer*, 2003. **89**(7): p. 1209-14.
23. De Stefani, E., Munoz, N., Esteve, J., Vasallo, A., Victora, C.G., and Teuchmann, S., *Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay*. *Cancer Res*, 1990. **50**(2): p. 426-31.
24. Islami, F., Kamangar, F., Nasrollahzadeh, D., Aghcheli, K., Sotoudeh, M., Abedi-Ardekani, B., et al., *Socio-economic status and oesophageal cancer: results from a population-based case-control study in a high-risk area*. *Int J Epidemiol*, 2009. **38**(4): p. 978-88.
25. Vassallo, A., Correa, P., De Stefani, E., Cendan, M., Zavala, D., Chen, V., et al., *Esophageal cancer in Uruguay: a case-control study*. *J Natl Cancer Inst*, 1985. **75**(6): p. 1005-9.
26. Cross, A.J., Freedman, N.D., Ren, J., Ward, M.H., Hollenbeck, A.R., Schatzkin, A., et al., *Meat consumption and risk of esophageal and gastric cancer in a large prospective study*. *Am J Gastroenterol*, 2011. **106**(3): p. 432-42.
27. Abedi-Ardekani, B., Kamangar, F., Hewitt, S.M., Hainaut, P., Sotoudeh, M., Abnet, C.C., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in oesophageal tissue and risk of oesophageal squamous cell carcinoma in north-eastern Iran*. *Gut*, 2010. **59**(9): p. 1178-83.
28. Kamangar, F., Strickland, P.T., Pourshams, A., Malekzadeh, R., Boffetta, P., Roth, M.J., et al., *High exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons may contribute to high risk of esophageal cancer in northeastern Iran*. *Anticancer Res*, 2005. **25**(1B): p. 425-8.
29. Wornat, M.J., Ledesma, E.B., Sandrowitz, A.K., Roth, M.J., Dawsey, S.M., Qiao, Y.L., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbons identified in soot extracts from domestic coal-burning stoves of Henan Province, China*. *Environ Sci Technol*, 2001. **35**(10): p. 1943-52.
30. Dawsey, S.P., Tonui, S., Parker, R.K., Fitzwater, J.W., Dawsey, S.M., White, R.E., et al., *Esophageal cancer in young people: a case series of 109 cases and review of the literature*. *PLoS One*, 2010. **5**(11): p. e14080.
31. Mosavi-Jarrahi, A. and Mohagheghi, M.A., *Epidemiology of esophageal cancer in the high-risk population of iran*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2006. **7**(3): p. 375-80.
32. Roth, M.J., Wei, W.Q., Baer, J., Abnet, C.C., Wang, G.Q., Sternberg, L.R., et al., *Aryl hydrocarbon receptor expression is associated with a family history of upper*

- gastrointestinal tract cancer in a high-risk population exposed to aromatic hydrocarbons.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(9): p. 2391-6.
33. Wei, W.Q., Abnet, C.C., Lu, N., Roth, M.J., Wang, G.Q., Dye, B.A., et al., *Risk factors for oesophageal squamous dysplasia in adult inhabitants of a high risk region of China.* Gut, 2005. **54**(6): p. 759-63.
 34. Roth, M.J., Dawsey, S.M., Wang, G., Tangrea, J.A., Zhou, B., Ratnasinghe, D., et al., *Association between GSTM1*0 and squamous dysplasia of the esophagus in the high risk region of Linxian, China.* Cancer Lett, 2000. **156**(1): p. 73-81.
 35. Ma, W.-J., *DNA polymorphism and risk of esophageal squamous cell carcinoma in a population of North Xinjiang, China.* World Journal of Gastroenterology, 2010. **16**(5): p. 641.
 36. Marjani, H.A., Biramijamal, F., Rakhshani, N., Hossein-Nezhad, A., and Malekzadeh, R., *Investigation of NQO1 genetic polymorphism, NQO1 gene expression and PAH-DNA adducts in ESCC. A case-control study from Iran.* Genet Mol Res, 2010. **9**(1): p. 239-49.
 37. Engel, L.S., Chow, W.H., Vaughan, T.L., Gammon, M.D., Risch, H.A., Stanford, J.L., et al., *Population attributable risks of esophageal and gastric cancers.* J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(18): p. 1404-13.
 38. Gupta, B. and Kumar, N., *Worldwide incidence, mortality and time trends for cancer of the oesophagus.* Eur J Cancer Prev, 2016.
 39. Prolla, J.C., Dietz, J., and da Costa, L.A., *[Geographical differences in esophageal neoplasm mortality in Rio Grande do Sul].* Rev Assoc Med Bras (1992), 1993. **39**(4): p. 217-20.
 40. *Nacional Institute of Cancer - Brazil. Estimated new cases of esophageal cancer in 2016; consulted in Aug/26/2016.* p. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tabelaestados.asp?UF=RS>.
 41. Victora, C.G., Munoz, N., Day, N.E., Barcelos, L.B., Peccin, D.A., and Braga, N.M., *Hot beverages and oesophageal cancer in southern Brazil: a case-control study.* Int J Cancer, 1987. **39**(6): p. 710-6.
 42. Dietz, J., Pardo, S.H., Furtado, C.D., Harzheim, E., and Furtado, A.D., *[Risk factors related to esophageal cancer in Rio Grande do Sul, Brazil].* Rev Assoc Med Bras (1992), 1998. **44**(4): p. 269-72.
 43. Castelletto, R., Castellsague, X., Munoz, N., Iscovich, J., Chopita, N., and Jmelnitsky, A., *Alcohol, tobacco, diet, mate drinking, and esophageal cancer in Argentina.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1994. **3**(7): p. 557-64.
 44. Andrici, J. and Eslick, G.D., *Mate consumption and the risk of esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis.* Dis Esophagus, 2013. **26**(8): p. 807-16.
 45. Rolon, P.A., Castellsague, X., Benz, M., and Munoz, N., *Hot and cold mate drinking and esophageal cancer in Paraguay.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1995. **4**(6): p. 595-605.
 46. Szymanska, K., Matos, E., Hung, R.J., Wunsch-Filho, V., Eluf-Neto, J., Menezes, A., et al., *Drinking of mate and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Latin America: a case-control study.* Cancer Causes Control, 2010. **21**(11): p. 1799-806.
 47. De Stefani, E., Boffetta, P., Fagundes, R.B., Deneo-Pellegrini, H., Ronco, A.L., Acosta, G., et al., *Nutrient patterns and risk of squamous cell carcinoma of the esophagus: a factor analysis in uruguay.* Anticancer Res, 2008. **28**(4C): p. 2499-506.

48. De Stefani, E., Boffetta, P., Ronco, A.L., Deneo-Pellegrini, H., Correa, P., Acosta, G., et al., *Exploratory factor analysis of squamous cell carcinoma of the esophagus in Uruguay*. Nutr Cancer, 2008. **60**(2): p. 188-95.
49. Sewram, V., De Stefani, E., Brennan, P., and Boffetta, P., *Mate consumption and the risk of squamous cell esophageal cancer in Uruguay*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003. **12**(6): p. 508-13.
50. *Chimarrão - Poesia de Glaucus Saraiva*. Available from <http://www.juntandorimas.com/poesias/glaucus/chimarrao.htm>. 09/05/2016.
51. *Dicionário de Português Online Michaelis - Significado de "Chimarrão"*. 29/04/2016; Available from: <http://michaelis.uol.com.br/moderno/portugues/index.php?lingua=portugues-portugues&palavra=chimarrão>.
52. *Dicionário de Português Online Michaelis - Significado de "Mate"*. Available from <http://michaelis.uol.com.br/moderno/portugues/index.php?lingua=portugues-portugues&palavra=mate>. 29/04/2016.
53. *Chimarrão - Movimento Tradicionalista Gaúcho*. Available from <http://www.mtg.org.br/folclore/310>. 29/04/2016.
54. Victora, C.G., Munoz, N., Horta, B.L., and Ramos, E.O., *Patterns of mate drinking in a Brazilian city*. Cancer Res, 1990. **50**(22): p. 7112-5.
55. de Barros, S.G., Ghisolfi, E.S., Luz, L.P., Barlem, G.G., Vidal, R.M., Wolff, F.H., et al., *[High temperature "mate" infusion drinking in a population at risk for squamous cell carcinoma of the esophagus]*. Arq Gastroenterol, 2000. **37**(1): p. 25-30.
56. Heck, C.I. and de Mejia, E.G., *Yerba Mate Tea (Ilex paraguariensis): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations*. J Food Sci, 2007. **72**(9): p. R138-51.
57. Nabechima, G.H., Provesi, J.G., Henriquez Mantelli, M.B., Vieira, M.A., De Mello Castanho Amboni, R.D., and Amante, E.R., *Effect of the mild temperature and traditional treatments on residual peroxidase activity, color, and chlorophyll content on storage of mate (Ilex paraguariensis) tea*. J Food Sci, 2014. **79**(2): p. C163-8.
58. Golozar, A., Fagundes, R.B., Etemadi, A., Schantz, M.M., Kamangar, F., Abnet, C.C., et al., *Significant variation in the concentration of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in yerba mate samples by brand, batch, and processing method*. Environ Sci Technol, 2012. **46**(24): p. 13488-93.
59. Lubin, J.H., De Stefani, E., Abnet, C.C., Acosta, G., Boffetta, P., Victora, C., et al., *Mate drinking and esophageal squamous cell carcinoma in South America: pooled results from two large multicenter case-control studies*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014. **23**(1): p. 107-16.
60. Rapozo, D.C., Blanco, T.C., Reis, B.B., Gonzaga, I.M., Valverde, P., Canetti, C., et al., *Recurrent acute thermal lesion induces esophageal hyperproliferative premalignant lesions in mice esophagus*. Exp Mol Pathol, 2016. **100**(2): p. 325-31.
61. Li, Z.G., Shimada, Y., Sato, F., Maeda, M., Itami, A., Kaganoi, J., et al., *Promotion effects of hot water on N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats*. Oncol Rep, 2003. **10**(2): p. 421-6.
62. Bates, M.N., Hopenhayn, C., Rey, O.A., and Moore, L.E., *Bladder cancer and mate consumption in Argentina: a case-control study*. Cancer Lett, 2007. **246**(1-2): p. 268-73.

63. Stefani, E.D., Moore, M., Aune, D., Deneo-Pellegrini, H., Ronco, A.L., Boffetta, P., et al., *Mate consumption and risk of cancer: a multi-site case-control study in Uruguay*. Asian Pac J Cancer Prev, 2011. **12**(4): p. 1089-93.
64. Deneo-Pellegrini, H., Ronco, A.L., De Stefani, E., Boffetta, P., Correa, P., Mendilaharsu, M., et al., *Food groups and risk of prostate cancer: a case-control study in Uruguay*. Cancer Causes Control, 2012. **23**(7): p. 1031-8.
65. Roshandel, G., Semnani, S., Malekzadeh, R., and Dawsey, S.M., *Polycyclic aromatic hydrocarbons and esophageal squamous cell carcinoma*. Arch Iran Med, 2012. **15**(11): p. 713-22.
66. Fagundes, R.B., Abnet, C.C., Strickland, P.T., Kamangar, F., Roth, M.J., Taylor, P.R., et al., *Higher urine 1-hydroxy pyrene glucuronide (1-OHPG) is associated with tobacco smoke exposure and drinking mate in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 139.
67. Kamangar, F., Schantz, M.M., Abnet, C.C., Fagundes, R.B., and Dawsey, S.M., *High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(5): p. 1262-8.
68. Vieira, M.A., Maraschin, M., Rovaris, A.A., Amboni, R.D., Pagliosa, C.M., Xavier, J.J., et al., *Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons throughout the processing stages of erva-mate (Ilex paraguariensis)*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2010. **27**(6): p. 776-82.
69. *Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures*. 2010 Aug/29/2016]; Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf>.
70. Deziel, N.C., Wei, W.Q., Abnet, C.C., Qiao, Y.L., Sunderland, D., Ren, J.S., et al., *A multi-day environmental study of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in a high-risk region for esophageal cancer in China*. J Expo Sci Environ Epidemiol, 2013. **23**(1): p. 52-9.
71. Roth, M.J., Strickland, K.L., Wang, G.Q., Rothman, N., Greenberg, A., and Dawsey, S.M., *High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons present within food from Linxian, China may contribute to that region's high incidence of oesophageal cancer*. Eur J Cancer, 1998. **34**(5): p. 757-8.
72. Pratt, M.M., John, K., MacLean, A.B., Afework, S., Phillips, D.H., and Poirier, M.C., *Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA adduct semi-quantitation in archived human tissues*. Int J Environ Res Public Health, 2011. **8**(7): p. 2675-91.
73. DeMarini, D.M., Landi, S., Tian, D., Hanley, N.M., Li, X., Hu, F., et al., *Lung tumor KRAS and TP53 mutations in nonsmokers reflect exposure to PAH-rich coal combustion emissions*. Cancer Res, 2001. **61**(18): p. 6679-81.
74. Puisieux, A., Lim, S., Groopman, J., and Ozturk, M., *Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens*. Cancer Res, 1991. **51**(22): p. 6185-9.
75. Gao, M., Li, Y., Sun, Y., Long, J., Kong, Y., Yang, S., et al., *A common carcinogen benzo[a]pyrene causes p53 overexpression in mouse cervix via DNA damage*. Mutat Res, 2011. **724**(1-2): p. 69-75.
76. Abedi-Ardekani, B., Kamangar, F., Sotoudeh, M., Villar, S., Islami, F., Aghcheli, K., et al., *Extremely high Tp53 mutation load in esophageal squamous cell carcinoma in Golestan Province, Iran*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e29488.

77. Fagundes, R.B., Melo, C.R., Putten, A.C., Moreira, L.F., and de Barros, S.G., *p53 immunoexpression: an aid to conventional methods in the screening of precursor lesions of squamous esophageal cancer in patients at high-risk?* *Cancer Detect Prev*, 2005. **29**(3): p. 227-32.
78. Yu, D., Berlin, J.A., Penning, T.M., and Field, J., *Reactive oxygen species generated by PAH o-quinones cause change-in-function mutations in p53*. *Chem Res Toxicol*, 2002. **15**(6): p. 832-42.
79. Rogan, E.G., Devanesan, P.D., RamaKrishna, N.V., Higginbotham, S., Padmavathi, N.S., Chapman, K., et al., *Identification and quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed in mouse skin*. *Chem Res Toxicol*, 1993. **6**(3): p. 356-63.
80. Gustavsson, P., Gustavsson, A., and Hogstedt, C., *Excess of cancer in Swedish chimney sweeps*. *Br J Ind Med*, 1988. **45**(11): p. 777-81.
81. Armstrong, B.G. and Gibbs, G., *Exposure-response relationship between lung cancer and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)*. *Occup Environ Med*, 2009. **66**(11): p. 740-6.
82. Carta, P., Aru, G., Cadeddu, C., Gigli, G., Papi, G., Carta, F., et al., *Mortality for pancreatic cancer among aluminium smelter workers in Sardinia, Italy*. *G Ital Med Lav Ergon*, 2004. **26**(2): p. 83-9.
83. Romundstad, P., Haldorsen, T., and Andersen, A., *Cancer incidence and cause specific mortality among workers in two Norwegian aluminum reduction plants*. *Am J Ind Med*, 2000. **37**(2): p. 175-83.
84. White, A.J., Bradshaw, P.T., Herring, A.H., Teitelbaum, S.L., Beyea, J., Stellman, S.D., et al., *Exposure to multiple sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and breast cancer incidence*. *Environ Int*, 2016. **89-90**: p. 185-92.
85. Nadon, L., Siemiatycki, J., Dewar, R., Krewski, D., and Gerin, M., *Cancer risk due to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons*. *Am J Ind Med*, 1995. **28**(3): p. 303-24.
86. Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., and Cogliano, V., *Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons*. *The Lancet Oncology*, 2005. **6**(12): p. 931-932.
87. Garte, S., Taioli, E., Raimondi, S., Paracchini, V., Binkova, B., Sram, R.J., et al., *Effects of metabolic genotypes on intermediary biomarkers in subjects exposed to PAHS: results from the EXPAH study*. *Mutat Res*, 2007. **620**(1-2): p. 7-15.
88. Abnet, C.C., Fagundes, R.B., Strickland, P.T., Kamangar, F., Roth, M.J., Taylor, P.R., et al., *The influence of genetic polymorphisms in Ahr, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, GST M1, GST T1 and UGT1A1 on urine 1-hydroxypyrene glucuronide concentrations in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(1): p. 112-7.
89. Gao, M., Li, Y., Xue, X., Long, J., Chen, L., Shah, W., et al., *Impact of AhR, CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms on TP53 R273G mutations in individuals exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014. **15**(6): p. 2699-705.
90. Islami, F., Boffetta, P., van Schooten, F.J., Strickland, P., Phillips, D.H., Pourshams, A., et al., *Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Among Never Smokers in Golestan Province, Iran, an Area of High Incidence of Esophageal Cancer - a Cross-Sectional Study with Repeated Measurement of Urinary 1-OHPG in Two Seasons*. *Front Oncol*, 2012. **2**: p. 14.
91. Etemadi, A., Islami, F., Phillips, D.H., Godschalk, R., Golozar, A., Kamangar, F., et al., *Variation in PAH-related DNA adduct levels among non-smokers: the role of multiple*

- genetic polymorphisms and nucleotide excision repair phenotype*. *Int J Cancer*, 2013. **132**(12): p. 2738-47.
92. Zhao, Z.H., Quan, W.Y., and Tian, D.H., *Urinary 1-hydroxypyrene as an indicator of human exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons in a coal-burning environment*. *Sci Total Environ*, 1990. **92**: p. 145-54.
93. Buckley, T.J. and Lioy, P.J., *An examination of the time course from human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons to urinary elimination of 1-hydroxypyrene*. *Br J Ind Med*, 1992. **49**(2): p. 113-24.
94. Kang, D.H., Rothman, N., Poirier, M.C., Greenberg, A., Hsu, C.H., Schwartz, B.S., et al., *Interindividual differences in the concentration of 1-hydroxypyrene-glucuronide in urine and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in peripheral white blood cells after charbroiled beef consumption*. *Carcinogenesis*, 1995. **16**(5): p. 1079-85.
95. Li, Z., Romanoff, L.C., Trinidad, D.A., Pittman, E.N., Hilton, D., Hubbard, K., et al., *Quantification of 21 metabolites of methyl-naphthalenes and polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine*. *Anal Bioanal Chem*, 2014. **406**(13): p. 3119-29.
96. Castano-Vinyals, G., D'Errico, A., Malats, N., and Kogevinas, M., *Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution*. *Occup Environ Med*, 2004. **61**(4): p. e12.
97. Gyorffy, E., Anna, L., Gyori, Z., Segesdi, J., Minarovits, J., Soltesz, I., et al., *DNA adducts in tumour, normal peripheral lung and bronchus, and peripheral blood lymphocytes from smoking and non-smoking lung cancer patients: correlations between tissues and detection by 32P-postlabelling and immunoassay*. *Carcinogenesis*, 2004. **25**(7): p. 1201-9.
98. van Gijssel, H.E., Divi, R.L., Olivero, O.A., Roth, M.J., Wang, G.Q., Dawsey, S.M., et al., *Semiquantitation of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human esophagus by immunohistochemistry and the automated cellular imaging system*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002. **11**(12): p. 1622-9.
99. van Gijssel, H.E., Schild, L.J., Watt, D.L., Roth, M.J., Wang, G.Q., Dawsey, S.M., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts determined by semiquantitative immunohistochemistry in human esophageal biopsies taken in 1985*. *Mutat Res*, 2004. **547**(1-2): p. 55-62.
100. Roth, M.J., Qiao, Y.L., Rothman, N., Tangrea, J.A., Dawsey, S.M., Wang, G.Q., et al., *High urine 1-hydroxypyrene glucuronide concentrations in Linxian, China, an area of high risk for squamous oesophageal cancer*. *Biomarkers*, 2001. **6**(5): p. 381-6.
101. Garcia Londono, V.A., Reynoso, M., and Resnik, S., *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba mate (Ilex paraguariensis) from the Argentinean market*. *Food Addit Contam Part B Surveill*, 2014. **7**(4): p. 247-53.