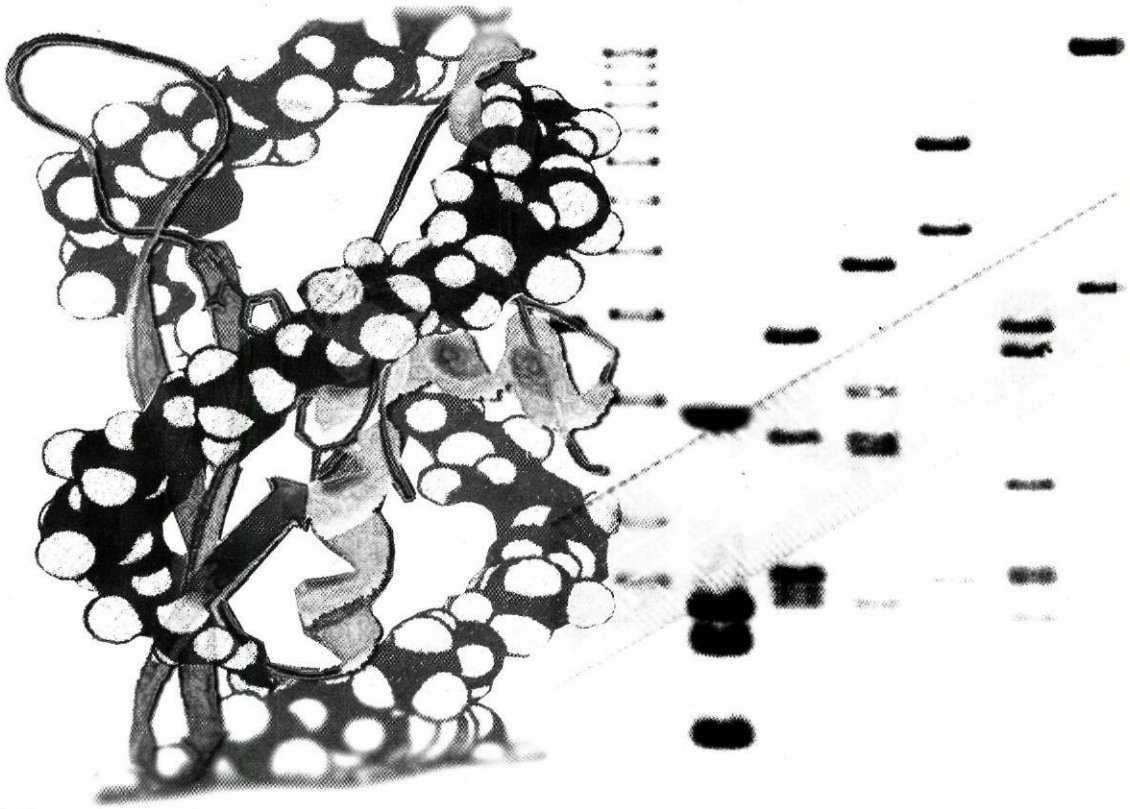
Sandra Maria Araújo da Costa

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA N-ACETILTRANSFERASE 2 E SUSCEPTIBILIDADE PARA TUMORES SÓLIDOS



Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Universidade Porto

CURSO DE MESTRADO EM ONCOLOGIA 2000/2002

Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil

ICBAS

UNIVERSIDADE DO PORTO

Jefferson Medical College

Sandra Maria Araújo da Costa

Polimorfismos Genéticos da N-acetiltransferase 2 e Susceptibilidade para Tumores Sólidos

Dissertação apresentada no
âmbito do curso de Mestrado
em Oncologia

Parte dos resultados apresentados nesta tese de mestrado encontram-se em fase de publicação na revista *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*
(provas do artigo apresentadas no Anexo III)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Carlos Lopes, orientador deste trabalho,gostaria de agradecer o apoio e a disponibilização dos meios laboratoriais necessários à elaboração deste estudo.

Ao Doutor Rui Medeiros, meu co-orientador, um agradecimento especial pelo estímulo, paciência, persistência e conhecimentos adquiridos ao longo destes dois últimos anos. Sem si isto não era possível.

Ao Prof. Doutor Guimarães dos Santos, pelo empenho dedicado a este curso de mestrado em Oncologia.

Aos meus colegas e amigos de trabalho, Dr. André, Dra. Daniela e Dr. Palmeira, o meu sincero obrigado pelo companheirismo, apoio e amizade, que me fizeram encarar esta etapa da minha vida de uma forma mais agradável.

Aos meus amigos "biólogos aplicados", vocês sabem quem são, obrigada por estarei sempre lá.
À João e Herlander, amigos insubstituíveis e sempre lá mesmo quando não sou fácil.
À Ana, amigona de sempre, obrigado por saber que estás sempre aí.

Ao Zé, obrigado por estares aqui, sem o teu amor, apoio e paciência não tinha conseguido.

À Cidália, obrigada maninha por me aturares.

Por último, um obrigado especial ao meu papá e à minha mamã, pelo amor infinito, pela paciência, apoio incondicional e incentivo constante que me fez olhar o futuro de um modo menos cinzento. São os Maiores!!!

ÍNDICE

Resumo vii

Summary ix

1. Introdução 1
1.1. A Enzima N-Acetiltransferase 2 (NAT2) 3
1.1.1. Características Estruturais da NAT2 4
1.1.2. Mecanismo de Reacção e Especificidade dos Substratos na NAT2 5
1.1.3. Localização, Estrutura e Expressão do Gene NAT2 6
1.2. Polimorfismos no Gene NAT2 7
1.2.1. Frequências dos Polimorfismos da NAT2 em diferentes Populações 10
1.3. Polimorfismos NAT2 e Susceptibilidade para Cancro 12
1.4. Aspectos Epidemiológicos de Tumores Sólidos Estudados 14
1.4.1. Cancro do Colo do Útero 14
1.4.2. Cancro da Mama 16
1.4.3. Cancro da Próstata 18
1.4.4. Cancro da Cabeça e Pescoço 20
1.5. Enquadramento e Objectivos da Tese 22

2. Materiais e Métodos 24
2.1. Amostras 24
2.1.1. Indivíduos Controlo 24
2.1.2. Grupo de Pacientes com Cancro do Colo do Útero 24
2.1.3. Grupo de Pacientes com Cancro da Mama 25
2.1.4. Grupo de Pacientes com Cancro da Próstata 25
2.1.5. Grupo de Pacientes com Cancro da Cabeça e Pescoço 26
2.2. Processamento das Amostras 27
2.3. Extracção de DNA 27
2.4. Amplificação de um Fragmento de DNA por PCR 28
2.4.1. Identificação de um fragmento de DNA por electroforese em gel de agarose 29
2.5. Digestão do fragmento de DNA amplificado por Enzimas de Restrição 29

2.5.1. Digestão do fragmento de DNA amplificado pela enzima de restrição Kpn I .29
2.5.1.1. Separação de fragmentos de DNA por electroforese em gel de agarose....30
2.5.2. Digestão do fragmento de DNA amplificado pela enzima de restrição Taq I..30
2.5.2.1. Separação de fragmentos de DNA por electroforese em gel de agarose....31
2.6. Análise Estatística....31

3. Resultados....32
3.1. Identificação dos Polimorfismos no gene NAT2....32
3.2. Frequência dos Polimorfismos do gene NAT2 em Indivíduos Saudáveis (Grupo Controlo)....34
3.3. Frequências dos Polimorfismos NAT2 em Indivíduos com Cancro do Colo do Útero (Estudo Caso Controlo)....36
3.4. Frequências dos Polimorfismos NAT2 em Indivíduos com Cancro da Mama (Estudo Caso Controlo)....38
3.5. Frequências dos Polimorfismos NAT2 em Indivíduos com Cancro da Próstata (Estudo Caso Controlo)....42
3.6. Frequências dos Polimorfismos NAT2 em Indivíduos com Cancro da Cabeça e Pescoço (Estudo Caso Controlo)....47

4. Discussão....49
4.1. Frequência dos Polimorfismos do gene NAT2 em Indivíduos Saudáveis (Grupo Controlo)....50
4.2. Avaliação dos Polimorfismos NAT2 na Susceptibilidade para Cancro do Colo do Útero (Estudo Caso Controlo)....50
4.3. Avaliação dos Polimorfismos NAT2 na Susceptibilidade para Cancro da Mama (Estudo Caso Controlo)....52
4.4. Avaliação dos Polimorfismos NAT2 na Susceptibilidade para Cancro da Próstata (Estudo Caso Controlo)....53
4.5. Avaliação dos Polimorfismos NAT2 na Susceptibilidade para Cancro da Cabeça e Pescoço (Estudo Caso Controlo)....54

5. Considerações Finais e Perspectivas Futuras....57

6. Referências 59

7. Anexos 71
7.1. Anexo I 71
7.2. Anexo II 72
7.3. Anexo III 73

Resumo

RESUMO

Os polimorfismos nos genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de carcinogénios estão associados à susceptibilidade para certos tipos de neoplasia. A enzima N-acetiltransferase 2 (NAT2) tem sido associada à metabolização de alguns carcinogénios descritos como factor de risco para o cancro da mama. Vários outros estudos têm também evidenciado estes carcinogénios como possíveis factores de influência na susceptibilidade para cancro da próstata e da cabeça e pescoço. No cancro do colo do útero têm sido indicados outros factores de risco, para além da infecção por HPV, incluindo a exposição a determinados carcinogénios.

A enzima NAT2 é responsável pela destoxificação de variados carcinogénios. O gene *NAT2*, codificador da enzima N-acetiltransferase 2, é polimórfico, e os indivíduos que no seu genótipo possuam duas variações alélicas têm o fenótipo acetilador lento, enquanto que os indivíduos com genótipo homozigótico selvagem ou heterozigótico, possuem um fenótipo acetilador rápido. O fenótipo e os genótipos acetiladores lentos têm sido associados com uma maior incidência de cancro em certos orgãos alvo relacionados com a exposição a vários carcinogénios, uma vez que estes possuem uma menor actividade enzimática. Contudo, existem também casos em que o fenótipo e genótipos acetiladores rápidos se encontram associados com risco aumentado para alguns tipos de cancro, consequência da activação metabólica de carcinogénios por parte da NAT2.

O objectivo deste trabalho foi determinar se alelos e genótipos *NAT2* poderão estar relacionados com a susceptibilidade para o cancro do colo do útero, da mama, da próstata e da cabeça e pescoço, utilizando para o efeito estudos do tipo caso controlo.

Foram analisadas amostras de DNA de cento e vinte e cinco pacientes diagnosticados com cancro do colo do útero, cento e quarenta e três doentes com cancro da mama,

cento e cinquenta e três homens com carcinoma da próstata e vinte e quatro mulheres e oitenta e oito homens com carcinoma da cabeça e pescoço. Foi utilizado como grupo controlo trezentos e setenta e oito indivíduos saudáveis, incluindo duzentos e oito indivíduos do sexo feminino e cento e setenta do sexo masculino. Foi analisada a presença de duas variações alélicas do gene *NAT2* pela técnica de PCR-RFLP.

A análise do grupo de doentes com cancro do colo do útero revelou que o genótipo *NAT2*6/NAT2*6* está associado com um risco três vezes maior para desenvolvimento desta neoplasia (OR=3,41; 95%IC: 1,34-8,89; p=0,007). Relativamente ao grupo de homens com cancro da próstata, foi observado que indivíduos portadores do genótipo *NAT2*6/NAT2*6* apresentam um risco diminuído para carcinoma da próstata (OR=0,33; 95%IC: 0,10-0,98). Na análise do grupo de doentes com carcinoma da cabeça e pescoço, os resultados revelaram que indivíduos portadores do genótipo de acetilação rápido *NAT2*4/NAT2*4* apresentam um risco duas vezes maior de desenvolvimento desta neoplasia (OR=2,64; 95%IC: 1,30-5,36; p=0,003).

Este estudo permite inferir que os polimorfismos no gene *NAT2* são factores de susceptibilidade genética para cancro do colo do útero, da próstata e da cabeça e pescoço. Os resultados obtidos poderão ajudar a definir um perfil alélico de populações em diferentes localizações geográficas e a compreender a incidência dos vários tipos de neoplasias no mundo inteiro. A análise dos factores genéticos que estão envolvidos no metabolismo de carcinogénios poderá ajudar à definição de um perfil genético de risco, podendo esta ser útil na planeamento de estratégias de quimioprevenção.

Summary

SUMMARY

Polymorphisms in genes that code for enzymes involved in the carcinogens metabolism have been associated with susceptibility of different of cancer models. N-acetyltransferase 2 has been associated with the metabolization of several carcinogens accepted as risk factors in breast cancer. Numerous other studies have also shown these carcinogens as possible susceptibility factors in prostate as well as in head and neck cancer. Regarding cervical neoplasia, others risk factors has been indicated beside HPV infection, including exposure to carcinogens.

NAT2 is responsible for the detoxification of several carcinogens. *NAT2* gene is polymorphic, and individuals carrying two allelic variations have a slow acetylator phenotype, whereas individuals heterozygotic or homozygotic for the wild-type alleles have a rapid acetylator phenotype. The slow acetylators phenotype and genotypes have been associated with higher incidence of cancer in certain target organs, since they hold a lower enzymatic activity. However, there are also cases in which the rapid acetylators phenotype and genotypes are associated with increased risk for some forms of neoplasia, as a consequence of carcinogens metabolic activation by NAT2.

The purpose of this study was to determine if both *NAT2* allele and genotypes could be related with cancer susceptibility in cervix, breast, prostate and head and neck cancers, using a case control study.

One hundred and twenty five DNA samples from diagnosed cervical cancer patients, one hundred and forty three breast cancer patients, one hundred and fifty three prostate cancer patients and one hundred and twelve head and neck cancer patients were analysed. Three hundred and seventy eight healthy individuals were used as a control group, which comprised two hundred and eight women and one hundred and seventy

men. The presence of two allelic variations in *NAT2* was analysed through PCR-RFLP technique.

The analyses of the cervical cancer patients group revealed that *NAT2*6/NAT2*6* genotype is associated with a three fold increased risk in the development of this neoplasia (OR=3,41; 95%IC: 1,34-8,89; p=0,007). Concerning the prostate cancer group, it was observed that *NAT2*6/NAT2*6* carriers presented a lower risk to prostate carcinoma (OR=0,33; 95%IC: 0,10-0,98). In the analyses of head and neck cancer patients, the results showed that *NAT2*4/NAT2*4* rapid acetylator genotype conferred a two-fold increased risk in the development of this cancer (OR=2,64; 95%IC: 1,30-5,36; p=0,003).

This study allows us to infer that *NAT2* polymorphisms are genetic susceptibility factors in cervical, prostate and head and neck cancers. Ours results may be useful to define the allelic profile of several populations in different geographic localizations, in addition to understanding the incidence of several neoplasias around the world. The analysis of genetic factors involved in carcinogens metabolism could help to characterize a risk genetic profile useful in planning different quimioprevention strategies.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O cancro, muitas vezes apelidado de "flagelo mundial", representa a segunda causa de morte em todo o Mundo (Robbins el al, 1994). É uma doença que atinge não apenas um ou outro órgão, mas sim todo o organismo.

O cancro é uma doença multifactorial e complexa. As causas que desencadeiam o desenvolvimento tumoral variam de indivíduo para indivíduo e mesmo entre indivíduos que desenvolvem o mesmo tipo de cancro. Cada caso resulta de uma série complexa de predisposições individuais e de circunstâncias ambientais que, combinadas durante um determinado período de vida, podem resultar na iniciação e promoção do crescimento tumoral. São inúmeros os factores que influenciam a susceptibilidade individual para cancro, incluindo certos tipos de genes, como os oncogenes e os proto-oncogenes, a imunidade, o estado hormonal, a capacidade de reparação de danos no DNA e a capacidade de eliminação de compostos carcinogénicos e mutagénicos.

A maioria das pessoas possui uma fisiologia normal e herda uma série de genes "saudáveis". Então qual a causa de desenvolvimento de cancro? Hoje é geralmente aceite que a iniciação e o desenvolvimento tumoral sejam determinados por um balanço delicado entre factores ambientais e genéticos.

A identificação de variantes genéticas que possam modificar associações entre exposição e doença tem o potencial de permitir estabelecer subgrupos da população que são mais susceptíveis a uma determinada exposição. Embora a identificação de genes de susceptibilidade para cancro de alta penetrância tenha trazido a ideia de uma base hereditária para o cancro, as mutações nestes genes são raras e são responsáveis apenas por uma pequena percentagem dos casos de cancro (Newman *et al.*., 1998). Os genes de susceptibilidade para cancro de baixa penetrância, como os envolvidos no

metabolismo de carcinogénios, reparação de DNA e controlo do ciclo celular, têm um impacto menor no risco para cancro, mas podem ser de grande relevância para a saúde pública, uma vez que o seu risco atribuível na população como um todo pode ser maior (weber *et al.*., 2000).

Os agentes exógenos são usualmente metabolizados em estados reactivos diferentes para conjugação e excreção. As enzimas de fase I do metabolismo de carcinogénios metabolizam um substrato a um estado reactivo através de processos de oxidação, hidrólise e redução, enquanto as enzimas de fase II destoxificam o intermediário reactivo, permitindo a sua excreção do organismo. O risco individual para cancro depende em grande parte da eliminação dos compostos carcinogénicos do organismo, e estas reacções influenciam a frequência de eventos indutores de mutação. Uma vez que as enzimas envolvidas no metabolismo de carcinogénios são altamente polimórficas, com variantes genéticas conferindo diferentes capacidades enzimáticas, os genes codificantes destas enzimas são considerados potenciais candidatos ao grupo de genes de susceptibilidade para cancro de baixa penetrância.

1.1. A ENZIMA N-ACETILTRANSFERASE 2 (NAT2)

A enzima N-acetiltransferase 2 (NAT2) pertence ao grupo das Arilaminas N-acetiltransferase (NATs) e intervem na fase II do metabolismo de carcinogénios, sendo responsável pela biotransformação de várias aminas aromáticas e heterocíclicas. As NATs são proteínas encontradas em quase todas as espécies, desde eubactérias aos humanos (Butcher *et al.*., 2002), partilhando regiões altamente conservadas no terminal amino, enquanto que no terminal carboxil apresentam pequena conservação entre espécies (Sinclair *et al.*., 2000).

A NAT2 é uma enzima citosólica, encontrada num grande número de órgãos, e não apenas no fígado, o principal órgão excretor. Também se encontra no pulmão e no cólon e em alguns tipos de células, como as células epiteliais da mama e próstata, leucócitos e eritrócitos (Agundez *et al.*.,1998; Windmill *et al.*., 2000). A sua expressão ubiquitária sugere uma função fundamental na protecção contra moléculas reactivas, não apenas no fígado, mas em todos os tecidos alvos de agressões ambientais.

A NAT2 catalisa reacções de acetilação de arilaminas e hidrazinas, as quais incluem compostos carcinogénicos e drogas terapêuticas, respectivamente (Hein *et al.*., 1992). Nos humanos a acetilação é a principal via de biotransformação de algumas drogas e essencialmente de inúmeros carcinogénicos presentes na dieta, no fumo do cigarro e no ambiente (Hein *et al.*., 1993).

A sequenciação do gene *NAT2* tem revelado um vasto número de variantes alélicas que afectam a actividade do gene *in vivo*. A variação genética modela a capacidade de acetilação da enzima assim pode contribuir para uma predisposição individual para toxicidade ou resistência a drogas e para desenvolvimento de doenças, como o cancro .

1.1.1. Características Estruturais da NAT2

A primeira estrutura cristalina de uma NAT, sendo de origem bacteriana, foi recentemente publicada (Sinclair *et al.*., 2000). A estrutura da NAT humana ainda não foi determinada, no entanto, a homologia com a NAT bacteriana sugere que as características sejam semelhantes.

Com base na análise estrutural, a proteína tem sido dividida em três domínios (Butcher *et al.*., 2002). O primeiro, referente ao terminal amino, consiste num feixe em espiral, que forma de um lado uma fenda onde se encontra uma cisteína (nos humanos Cys^{68}) envolvida na transferência de grupos acetil. Todas as NATs são altamente homólogas nesta região. O segundo domínio localiza-se do outro lado da fenda e consiste em estruturas do tipo β. O último domínio, no terminal carboxil, é uma combinação de estruturas do tipo β e helicases α. É esta a região que apresenta a maior diversidade entre as espécies.

Foi identificada no terminal amino da proteína uma tríade catalítica, constituída por três resíduos altamente conservados (Cys^{68}, His^{107} e Asp^{122} nos humanos) (figura 1.1) (Rodrigues-Lima *et al.*., 2002). O resíduo de cisteína (Cys^{68} nos humanos) tem sido indicado como sendo crucial para a actividade das NATs (Payton *et al.*., 2000).

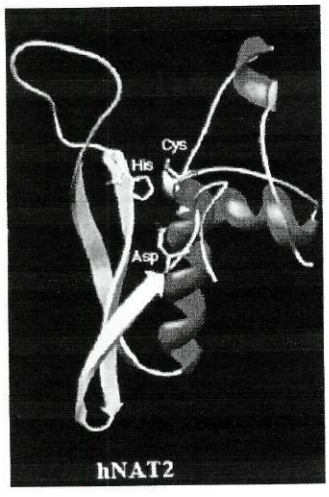


Figura 1.1 – Estrutura do domínio catalítico do terminal amino da proteína NAT2 humana (adaptado de Rodrigues Lima *et al.*., 2002).

1.1.2. Mecanismo de Reacção e Especificidade dos Substratos na NAT2

As NATs diferem de muitas outras transferases dependentes da acetil coenzima-A presentes na célula devido ao seu mecanismo de bi-reacção (Butcher *et al.*., 2002). Primeiramente, a acetil coenzima-A liga-se à enzima e o grupo acetil é transferido do cofactor para a cisteína (Cys^{68} em humanos) da proteína, sendo a coenzima-A posteriormente libertada. Um segundo passo envolve a ligação do substrato à enzima acetilada, durante o qual o grupo acetil é transferido para o substrato. Finalmente, o produto acetilado é libertado da enzima.

Esta enzima é responsável pela catálise de N- e O-acetilação e, também, pela N,O-transacetilação dos seus substratos. Deste modo, participa na destoxificação de carcinogénios, via N-acetilação. No entanto, também é capaz de biactivar alguns substratos a carcinogénios, via O-acetilação ou N,O-transacetilação, dependendo da via metabólica que é funcionalmente relevante no tecido alvo (Bowden *et al.*., 1997; Hein *et al.*., 1994).

A enzima NAT2 possui como substratos específicos alguns tipos de drogas, como por exemplo, amonafide, dapsone, isoniazida e várias sulfonamidas, e também vários tipos de carcinogénicos, como as aminas aromáticas, heterocíclicas e N-hidroxi-aromáticas (Hein *et al.*., 1988).

A determinação da especificidade do substrato para a NAT2 através do motivo estrutural não é ainda clara. No entanto, há estudos que sugerem que a região envolvente aos aminoácidos 125 e 127 da NAT participa no reconhecimento e na determinação da selectividade dos substratos (Goodfellow *et al.*., 2000).

1.1.3. Localização, Estrutura e Expressão do Gene *NAT2*

A enzima NAT2 é codificada pelo gene *NAT2*, isolado pela primeira vez em 1989 por Grant *et al.*. (1989). O gene *NAT2* encontra-se localizado no braço curto do cromossoma 8, mais especificamente na região 8p22 (Blum *et al.*., 1990) (figura 1.2). A proteína NAT2 é produto de um único exão, não interrompido por intrões, com uma *open reading frame (ORF)* de 870 pares de bases (pb), que codifica 290 aminoácidos (Vatsis *et al.*., 1991).

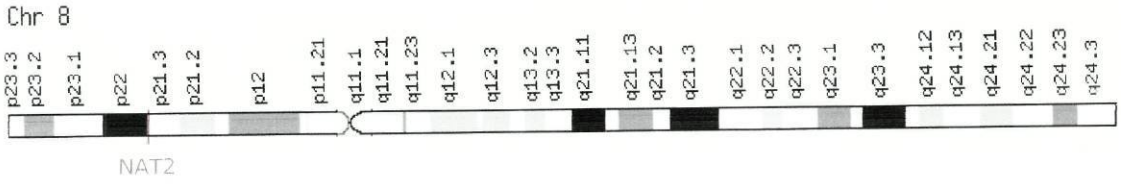


Figura 1.2 – Representação do cromossoma humano 8 evidenciando a localização do gene *NAT2* na região 8p22.

A presença do mRNA do gene *NAT2* tem sido demonstrada num grande número de órgão (Agúndez *et al.*., 1998; Windwill *et al.*., 2000), incluindo o fígado, o tracto gastro-intestinal, a bexiga, o pulmão, os túbulos seminíferos do rim, e também em células epiteliais mamárias e prostáticas.

No *locus NAT2* encontra-se localizado um conhecido marcador polimórfico (D8S21) (Matas *et al.*., 1997). Este *locus* é altamente polimórfico, possuindo o gene *NAT2* humano um elevado número de variantes alélicas, designadas Polimorfismos.

1.2. POLIMORFISMOS NO GENE *NAT2*

Um polimorfismo é definido como a existência de um ou mais fenótipos menos frequentes numa qualquer população, ocorrendo em pelo menos 1% da população. Esses fenótipos são o resultado de mutações genéticas, especialmente mutações pontuais, mutações *frame shift*, ou delecções em determinados genes, o que se traduz na maioria dos casos, mas nem sempre, em enzimas sem actividade ou com actividade reduzida (Hengstler *et al.*. 1998).

Até à data, foram identificados 29 alelos mutantes no gene *NAT2* humano (Hein *et al.*., 2000). Estas variações alélicas resultam da combinação de mutações pontuais em bases e por isso, o gene *NAT2* representa uma série bem caracterizada de *Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)*, no interior de uma região aparentemente instável do genoma humano (figura 1.3).

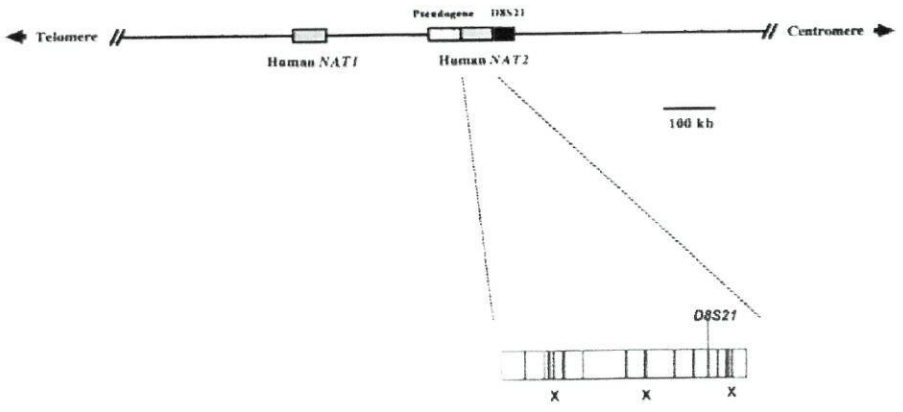


Figura 1.3 – Esquema dos genes das NATs ilustrando os *SNPs* no gene *NAT2* (as cruzes representam mutações pontuais). (adaptado de Sim *et a.l*, 2000).

Cada uma das variantes alélicas encontradas no gene *NAT2* inclui entre uma a quatro substituições nucleotídicas, das quais treze têm sido localizadas na região codificante do gene (Butcher *et al.*., 2002). Nove destas resultam numa alteração do

aminoácido codificado ($G^{191}A$, $T^{341}C$, $A^{434}C$, $G^{590}A$, $A^{803}G$, $A^{845}C$ e $G^{857}A$) e as restantes quatro são alterações silenciosas ($T^{111}C$, $C^{282}T$, $C^{481}T$ e $C^{759}T$) (quadro 1.1).

Estas variações alélicas são responsáveis pelo conhecido Polimorfismo de Acetilação, que está na origem dos fenótipos de acetilação. Os indivíduos homozigóticos para os alelos mutantes dizem-se possuidores de um fenótipo acetilador lento, enquanto indivíduos heterozigóticos ou homozigóticos para o alelo selvagem possuem um fenótipo de acetilação rápido. Muitas vezes, os indivíduos heterozigóticos são designados como portadores de um fenótipo de acetilação intermédio (Butcher *et al.*., 2002).

Quadro 1.1 – Variantes alélicas do gene *NAT2* humano (adaptado de Butcher *et al.*.., 2002).

Variantes Alélicas	Fenótipo	Alterações Nucleotídicas	Alterações Aminoacídicas
*NAT2*4*	Rápido	Nenhuma	Nenhuma
*NAT2*5A*	Lento	$T^{341}C$, $C^{481}T$	$Ile^{114}\rightarrow Thr$
*NAT2*5B*	Lento	$T^{341}C$, $C^{481}T$, $A^{803}G$	$Ile^{114}\rightarrow Thr$, $Lys^{268}\rightarrow Arg$
*NAT2*5C*	Lento	$T^{341}C$, $A^{803}G$	$Ile^{114}\rightarrow Thr$, $Lys^{268}\rightarrow Arg$
*NAT2*5D*	Lento	$T^{341}C$	$Ile^{114}\rightarrow Thr$
*NAT2*5E*	Lento	$T^{341}C$, $G^{590}A$	$Ile^{114}\rightarrow Thr$, $Arg^{197}\rightarrow Gln$
*NAT2*5F*	Lento	$T^{341}C$, $C^{481}T$, $T^{759}T$, $A^{803}G$	$Ile^{114}\rightarrow Thr$, $Lys^{268}\rightarrow Arg$
*NAT2*6A*	Lento	$C^{282}T$, $G^{590}A$	$Arg^{197}\rightarrow Gln$
*NAT2*6B*	Lento	$G^{590}A$	$Arg^{197}\rightarrow Gln$
*NAT2*6C*	Lento	$C^{282}T$, $G^{590}A$, $A^{803}G$	$Arg^{197}\rightarrow Gln$, $Lys^{268}\rightarrow Arg$
*NAT2*6D*	Lento	$T^{111}C$, $C^{282}T$, $G^{590}A$	$Arg^{197}\rightarrow Gln$
*NAT2*7A*	Lento	$G^{857}A$	$Lys^{286}\rightarrow Glu$
*NAT2*7B*	Lento	$C^{282}T$, $G^{857}A$	$Lys^{286}\rightarrow Glu$
*NAT2*10*	Desconhecido	$G^{499}A$	$Glu^{167}\rightarrow Lys$
*NAT2*11*	Desconhecido	$C^{481}T$	Nenhuma
*NAT2*12A*	Rápido	$A^{803}G$	$Lys^{268}\rightarrow Arg$
*NAT2*12B*	Rápido	$C^{282}T$, $A^{803}G$	$Lys^{268}\rightarrow Arg$
*NAT2*12C*	Rápido	$C^{481}T$, $A^{803}G$	$Lys^{268}\rightarrow Arg$
*NAT2*13*	Rápido	$C^{282}T$	Nenhuma
*NAT2*14A*	Lento	$G^{191}A$	$Arg^{64}\rightarrow Gln$
*NAT2*14B*	Lento	$G^{191}A$, $C^{282}T$	$Arg^{64}\rightarrow Gln$
*NAT2*14C*	Lento	$G^{191}A$, $T^{341}C$, $C^{481}T$, $A^{803}G$	$Arg^{64}\rightarrow Gln$, $Ile^{114}\rightarrow Thr$
*NAT2*14D*	Lento	$G^{191}A$, $C^{282}T$, $G^{590}A$	$Arg^{64}\rightarrow Gln$, $Arg^{197}\rightarrow Gln$
*NAT2*14E*	Lento	$G^{191}A$, $A^{803}G$	$Arg^{64}\rightarrow Gln$, $Lys^{268}\rightarrow Arg$
*NAT2*14F*	Lento	$G^{191}A$, $T^{341}C$, $A^{803}G$	$Arg^{64}\rightarrow Gln$, $Arg^{114}\rightarrow Thr$, $Lys^{268}\rightarrow Arg$
*NAT2*14G*	Lento	$G^{191}A$, $C^{282}T$, $A^{803}G$	$Arg^{64}\rightarrow Gln$, $Lys^{268}\rightarrow Arg$
*NAT2*17*	Lento	$A^{434}C$	$Gln^{145}\rightarrow Pro$
*NAT2*18*	Desconhecido	$A^{845}C$	$Lys^{282}\rightarrow Thr$
*NAT2*19*	Lento	$C^{190}T$	$Arg^{64}\rightarrow Trp$

Têm sido desenvolvidos vários estudos que demonstram uma correlação entre os fenótipos e os genótipos de acetilação (Deguchi *et al.*., 1990; Hickman *et al.*., 1991). Estudos genotípicos procurando as alterações nucleotídicas $C^{481}T$, $G^{590}A$, $G^{853}A$ e $G^{191}A$

mostraram que todas estavam associadas ao fenótipo de acetilação lento (Butcher *et al.*, 2002).

O mecanismo pelo qual a substituição nucleotídica no gene *NAT2* afecta a capacidade de acetilação tem sido vastamente estudado, através do uso de sistemas de expressão recombinante (Fretland *et al.*, 2001; Hein *et al.*, 1994). Num estudo recente foram clonados e expressos em levedura o alelo selvagem (*NAT2*4*) e 11 variantes nucleotídicas. Segundo esse estudo seis variantes ($G^{191}A$, $T^{341}C$, $A^{434}C$, $G^{590}A$, $A^{845}C$ e $G^{857}A$) conferiam uma menor actividade da enzima. Pelo contrário, outras cinco alterações nucleotídicas ($T^{111}C$, $C^{282}T$, $C^{481}T$, $C^{759}T$ e $A^{803}G$) não mostraram qualquer efeito sobre a actividade enzimática da NAT2. Verificaram também que as alterações $T^{341}C$, $A^{434}C$ e $G^{590}A$ causavam uma diminuição nos níveis de proteína imunoreactiva. No entanto, não se observaram diferenças entre o alelo selvagem e os alelos mutantes quanto à expressão de mRNA .

O mecanismo molecular responsável pela produção de fenótipos de acetilação lentos não é ainda bem conhecido. Algumas alterações nucleotídicas parecem causar um fenótipo de acetilação lento ao darem origem a uma proteína instável. As aloenzimas codificadas pelos alelos com substituição nucleotídica nas posições 191, 590 e 857 parecem ser significativamente mais instáveis do que as proteínas com o alelo selvagem (Grant *et al.*, 1997; Hein *et al.*, 1994).

Uma boa correlação entre fenótipo e genótipo tem também sido demonstrada em estudos que analisam a capacidade de acetilação pela quantificação dos metabolitos secundários do metabolismo da cafeína (Cascorbi *et al.*, 1995). Foi observado que o genótipo *NAT2*4/NAT2*4* (genótipo selvagem) possuía uma maior actividade enzimática em comparação com os heterozigóticos e homozigóticos para as variantes alélicas. Entre os indivíduos heterozigóticos não se observaram diferenças significativas na capacidade

de acetilação. No entanto, entre os homozigóticos para as variantes alélicas foi observado que o genótipo *NAT2*5/NAT2*5* possuía maior taxas de acetilação que os genótipos *NAT2*5/NAT2*6* e *NAT2*6/NAT2*6*, sendo que este último apresenta uma menor taxa que os outros dois genótipos.

1.2.1. Frequências dos Polimorfismos da NAT2 em diferentes Populações

O alelo *NAT2*4* é considerado o alelo selvagem do gene *NAT2*. No entanto, não é o mais frequente em algumas populações, incluindo a Caucasiana e Africana (Hein *et al.*., 2000).

A frequência do fenótipo de acetilação lento varia consideravelmente entre grupos étnicos, devido às diferenças nas frequências dos polimorfismos que correspondem a alelos acetiladores lentos (Evans, 1989).

Nas populações Caucasianas e Africanas, a frequência do fenótipo de acetilação lento varia entre 40 e 70%, enquanto na população Asiática (Japoneses, Chineses e Coreanos) varia apenas entre 10 e 30%. As populações Caucasianas e Africanas apresentam elevadas frequências dos alelos *NAT2*5* (>28%) e baixa frequência dos alelos *NAT2*7* (<5%), ao contrário do que acontece com a população Asiática. Também os alelos *NAT2*14* estão quase ausentes nas populações Caucasianas e Asiáticas (<1%), mas estão presentes na população africana com frequências comparativamente maiores (>8%) (Butcher *et al.*., 2002; Meyer *et al.*., 1997).

A variação alélica mais comum nos Europeus e Americanos é a designada por alelo mutante M1 (cerca de 45%) (Bell *et al.*., 1993; Garte *et al.*., 2001), caracterizado pela presença da alteração nucleotídica na posição 481, sendo também referido como

alelo *NAT2*5* (Bell *et al.*., 1993; Blum *et al.*., 1991). A segunda variação alélica mais encontrada é a designada por alelo mutante M2 (cerca de 28%) (Bell *et al.*., 1993; Garte *et al.*., 2001), caracterizado pela substituição nucleotídica na posição 590, sendo também designado por alelo *NAT2*6* (Bell *et al.*., 1993; Blum *et al.*., 1991).

A população portuguesa apresenta um padrão dos fenótipos de acetilação semelhante ao da população Caucasiana. O fenótipo acetilador lento apresenta-se em cerca de 62% da população portuguesa. Os alelos *NAT2*5* são também os mais frequentes, existindo em cerca de 43% da população, seguidos pelos alelos *NAT2*6*, presentes em cerca de 30% da população (Gil *et al.*., 1998; Lemos *et al.*., 1999).

1.3. POLIMORFISMOS *NAT2* E SUSCEPTIBILIDADE PARA CANCRO

O polimorfismo genético da enzima NAT2 é um dos mais comuns na população humana, com uma vasta variação fenotípica e alélica (Cascorbi *et al.*., 1995; Grant *et al.*., 1997).

Os humanos estão expostos a muitos substratos tóxicos, incluindo as aminas heterocíclicas derivadas de alimentos demasiadamente cozinhados e as aminas aromáticas presentes no fumo de cigarro (Hein *et al.*, 1993). Devido à função de acetilação da NAT2 na activação e destoxificação metabólica de vários carcinogénios, o polimorfismo genético no gene *NAT2* pode modificar o risco de cancro.

Vários estudos têm demonstrado a expressão da enzima NAT2 em diferentes tecidos (Agúndez *et al.*, 1998; Windwill *et al.*, 2000), reflectindo o facto do efeito do fenótipo e genótipo de acetilação no risco de desenvolver cancro poder variar com o local do órgão. Assim, se a enzima está presente num determinado tecido a sua influência no desenvolvimento tumoral nesse tecido será maior do que num tecido onde não está presente.

A região cromossómica 8p22, local onde se encontra o gene codificante da enzima NAT2, é um local de frequentes perdas alélicas em variados tipos de cancro, entre eles o da bexiga, o da mama, o da próstata e o da cabeça e pescoço (Smith *et al.*, 1994; Snyderman, 2001; Tsuneizumi *et al.*, 2002). Isto faz deste gene um forte candidato na susceptibilidade genética para cancro.

Uma associação entre os fenótipos e os genótipos de acetilação e a susceptibilidade para inúmeros tipos de cancro tem sido sugerida em vários estudos. O fenótipo de acetilação lento tem sido associado a um risco aumentado para cancro da bexiga (Filiadis *et al.*, 1999; Okkels *et al.*, 1997). Pelo contrário, o fenótipo de acetilação

rápido tem demonstrado um risco aumentado para cancro colorectal (Gil *et al.*, 1998; Roberts-Thomson *et al.*, 1996), mas com resultados controversos (Hubbard *et al.*, 1997). Vários estudos têm sido realizados com o intuito de associar genótipos de acetilação e risco para cancro da mama. No entanto, os resultados têm sido inconsistentes (Huang *et al.*, 1999; Ilett *et al.*, 1999). Há estudos com o mesmo objectivo no caso do cancro do pulmão, da próstata e da cabeça e pescoço. Os resultados existentes quanto à associação entre os genótipos *NAT2* e susceptibilidade para cancro do pulmão e da cabeça e pescoço mostram-se também controversos (Gonzalez *et al.*, 1998; Henninh *et al.*, 1999). Até à data, não foi observada nenhuma associação entre os polimorfismos no gene *NAT2* e risco de cancro da próstata (Wadelius *et al.*, 1999).

Estas considerações, juntamente com a variação étnica nas frequências dos fenótipos e genótipos de acetilação, sugerem os genótipos *NAT2* como potenciais factores de susceptibilidade genética para cancro nas diferentes populações.

1.4. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE TUMORES SÓLIDOS ESTUDADOS

1.4.1. Cancro do Colo do Útero

O carcinoma do colo do útero é o segundo cancro mais frequente entre os observados na mulher no mundo inteiro, logo a seguir ao carcinoma da mama (Devita *et al.*, 1997). As taxas de incidência e mortalidade desta neoplasia apresentando uma grande variação geográfica. Representa a segunda neoplasia mais comum em mulheres de África, da América Central e do Sul e da Ásia Central e Sul, enquanto na América do Norte e Europa, se encontra em quarto e sexto lugar, respectivamente (Bast *et al.*, 2000).

Em Portugal, o carcinoma do colo do útero ocupa o quarto lugar nas neoplasias mais frequentes nas mulheres, sendo a neoplasia ginecológica mais comum (figura 1.4).

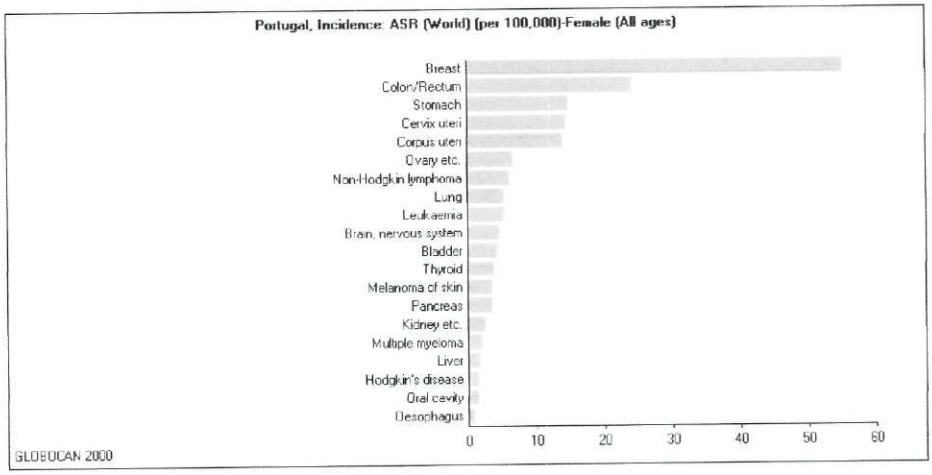


Figura 1.4 – Incidência de cancro nas mulheres em Portugal (dados fornecidos pelo Globocan 2000, IARC, Lyon 2001).

Há estudos epidemiológicos que sugerem uma forte associação entre o carcinoma do colo do útero e padrões de comportamento sexual. Suportando esta ideia,

factores como múltiplos parceiros sexuais, idade precoce da primeira relação sexual e hábitos sexuais do parceiro, têm sido consistentemente associados com um risco aumentado de desenvolvimento da neoplasia do colo do útero (Bast *et al.*, 2000).

Segundo dados epidemiológicos e clínicos têm demonstrado que o Papiloma Vírus Humano (HPV), especialmente o HPV-16 and HPV-18 (HPVs de alto risco), desempenha uma função fundamental na etiologia do carcinoma do colo do útero. No entanto, a discrepância entre a prevalência do HPV e a incidência desta neoplasia sugere que outros factores são necessários ao desenvolvimento e progressão da doença. Outros factores de risco têm sido sugeridos, tais como a exposição a carcinogénios, sendo o fumo do tabaco um dos mais referidos (Bast *et al.*, 2000), embora também exista estudos relacionando deficiências nutricionais e a história sexual e reprodutiva com esta patologia (Haverkos *et al.*, 2000; Kjellberg *et al.*, 2000).

O desenvolvimento da neoplasia do colo do útero é considerado um desnvolvimento tumoral reflectido pela passagem do epitélio normal do colo do útero infectado com HPV para lesão intraepitelial escamosa (SIL) de baixo grau, que consequentemente evolui para uma lesão de alto grau, culminando num carcinoma do colo do útero invasivo. No entanto, tem sido demonstrado que lesões de alto grau infectadas com HPV regridem espontaneamente (Kiviat *et al.*, 1992). Estes dados corroboram a hipótese da existência de outros factores de risco para esta neoplasia, incluindo factores ambientais, imunológicos e genéticos (Kiviat *et al.*, 1992).

1.4.2. Cancro da Mama

O carcinoma da mama é considerado um dos principais problemas mundiais de saúde pública. É a neoplasia maligna mais frequente nas mulheres e também a principal causa de morte por cancro (Bast *et al.*, 2000; Devita *et al.*, 1997). As taxas de incidência do cancro da mama variam substancialmente a nível mundial. As elevadas taxas de incidência na América do Norte e na Europa contrastam com as baixas taxas da Ásia e África (Bast *et al.*, 2000). O que reflecte uma grande diferença na incidência de cancro da mama entre os países desenvolvidos e os menos desenvolvidos, sendo uma consequência quer de diferenças nutricionais, quer no estilo de vida e nas funções desempenhadas pela mulher na sociedade.

Em Portugal, o carcinoma da mama também representa a forma mais comum de neoplasia na mulher e é a principal causa de morte por cancro nas mulheres (figura 1.5).

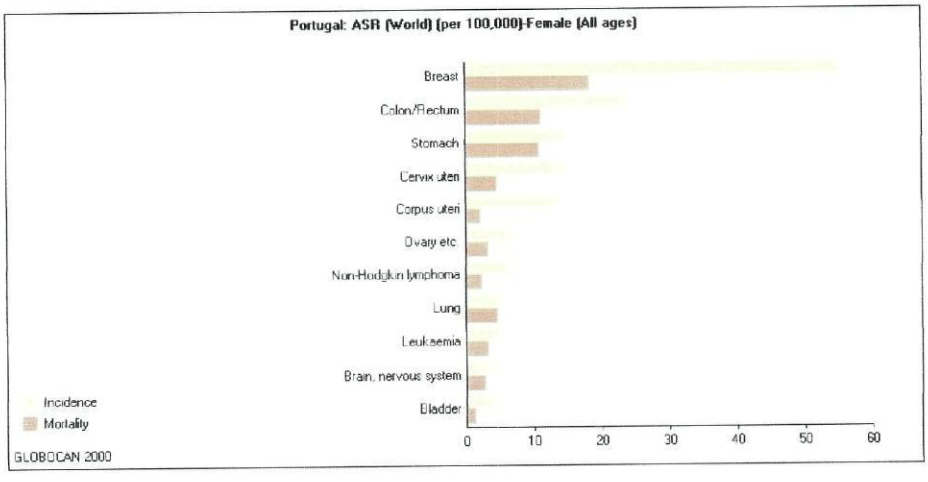


Figura 1.5 – Incidência e mortalidade por cancro da mama em mulheres em Portugal (dados fornecidos pelo Globocan 2000, IARC, Lyon 2001).

As lesões da mama estão preponderantemente confinadas à mulher, uma vez que, ao contrário do homem, possuí uma estrutura mamária mais complexa, um maior volume e uma extrema sensibilidade a influências endócrinas, predispondo assim, este orgão para um diverso número de condições patológicas (Robbins *et al.*, 1994).

Um factor de susceptibilidade importante para o cancro da mama é a idade. Este tipo de cancro é raramente encontrado em mulheres com menos de 25 anos, mas o risco aumenta exponencialmente após os 30 anos de idade (Robbins *et al.*, 1994)..

Existem outros factores de risco envolvidos na etiologia do cancro da mama. Vários estudos epidemiológicos têm associado factores como a idade precoce de menarca, a idade tardia de menopausa, a paridade nula ou baixa e a terapia hormonal de substituição, com um maior risco de desenvolvimento de neoplasia da mama (Devita *et al.*, 1997).

Factores ambientais, genéticos e alimentares parecem também ter uma influência importante no desenvolvimento de cancro da mama (Devita *et al.*, 1997; Robbins *et al.*, 1992). Estudos recentes têm sugerido que um risco aumentado para o cancro da mama pode estar associado com a ingestão de elevadas quantidades de gordura na dieta alimentar, de carcinogénios provenientes de alimentos queimados, de álcool, com a exposição a radiação e com a inalação de carcinogénios do fumo de cigarro (Martin *et al.*, 2000). As diferenças na incidência de cancro da mama entre os países desenvolvidos e os menos desenvolvidos sugerem que os factores ambientais e o estilo de vida podem ter uma influência fundamental no risco de desenvolvimento de cancro da mama (Bast *et al.*, 2000).

No cancro da mama existem factores genéticos bem estabelecidos como factores de risco, como é o caso dos genes *BRCAs*. No entanto, a associação entre estes genes e risco aumentado para carcinoma da mama é apenas observada numa pequena

percentagem dos casos de cancro da mama. Outros genes têm-se mostrado potenciais factores de susceptibilidade para este tipo de neoplasia, como é o caso dos genes das glutationa S-transferases, das citocromos P450, das N-acetiltransferases e dos receptores de estrogéneo e androgéneo (Martin *et al.*, 2000).

1.4.3. Cancro da Próstata

O cancro da próstata é a terceira neoplasia mais comummente diagnosticada nos homens no mundo inteiro (Devita *et al.*, 1997). Tal como no caso das taxas de incidência do carcinoma da mama, também as taxas de incidência do carcinoma da próstata são superiores nos países desenvolvidos, sendo mais elevadas na América do Norte e Europa, na África estas taxas são moderadas, enquanto que na Ásia são baixas (Bast *et al.*, 2000).

Em Portugal, o carcinoma da próstata apresenta-se como a segunda neoplasia mais comum nos homens e representa a quarta causa de morte por cancro nos homens (figura 1.6).

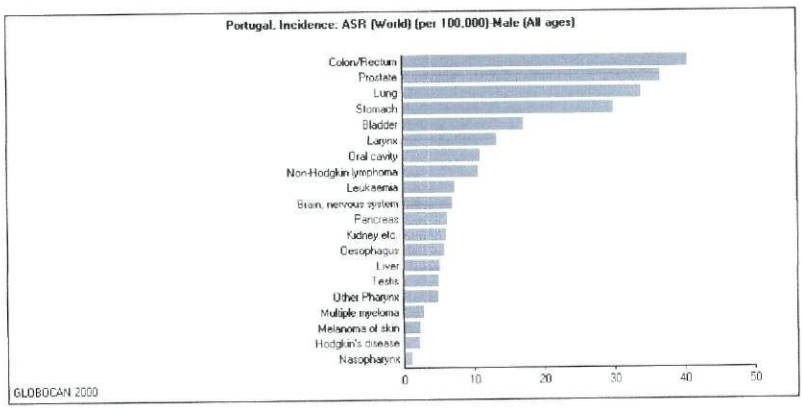


Figura 1.6 – Incidência e mortalidade por cancro nos homens em Portugal (dados fornecidos pelo Globocan 2000, IARC, Lyon 2001).

Pouco se sabe sobre as causas do cancro da próstata, podendo vários factores de risco, como a idade, etnias, história familiar, níveis hormonais e influências ambientais e alimentares, estar envolvidos (Robbins *et al.*, 1994).

A idade é o principal factor de risco no cancro da próstata, que ocorre geralmente em homens com mais de 50 anos, com uma maior incidência em homens com cerca de 60 anos e raramente em homens com menos de 40 anos (Devita *et al.*, 1997; Robbins *et al.*, 1994). As taxas de incidência do cancro da próstata aumentam com a idade mais rapidamente que qualquer outra neoplasia epitelial (Bast *et al.*, 2000).

Alguns estudos têm apontado para uma relação entre o risco aumentado para cancro da próstata e a ingestão de elevada quantidade de gorduras, bem como o aumento dos níveis de testosterona (Robbins *et al.*, 1994). Os factores étnicos e geográficos também parecem influenciar o risco para o cancro da próstata.

Alguns estudos epidemiológicos têm mostrado associação entre factores ambientais e risco aumentado para cancro da próstata. Foi registado em estudos recentes que homens com uma actividade ocupacional com exposição a químicos (Devita *et al.*, 1997), assim como os fumadores, possuem uma maior incidência de cancro da próstata.

Como acontece com outros tipos de cancro, há fortes evidências de que os factores genéticos, em interacção com os factores ambientais, são importantes na etiologia do cancro da próstata (Devita *et al.*, 1997). Várias investigações têm focado uma possível base genética para o cancro da próstata. Alguns estudos têm sugerido os cromossomas 8, 10 e 16 como potenciais localizações de genes associados com transformações neoplásicas das células da próstata (Robbins *et al.*, 1994).

1.4.4. Cancro da Cabeça e Pescoço

O termo "carcinoma da cabeça e pescoço" descreve uma colecção diversa de cancros de uma variedade de locais anatómicos que fazem parte do tracto superior aerodigestivo (Bast *et al.*, 2000), incluindo os lábios, a cavidade oral, faringe, nasofaringe, orofaringe, laringe e esófago.

O carcinoma da cabeça e pescoço é o sexto tipo de cancro mais comum no mundo inteiro, compreendendo cerca de 5% de todos os cancros no homem e 2% na dos da mulher (Bast *et al.*, 2000). É uma neoplasia na qual as taxas de mortalidade e morbilidade são bastante elevadas, e possui uma probabilidade significativa de recorrência. Está estimado que apenas 50% dos indivíduos diagnosticados com a doença sobreviverá mais do que cinco anos (Devita *et al.*, 1997).

O cancro da cabeça e pescoço é uma neoplasia com diferenças étnicas, sendo mais frequente em indivíduos Afro-Americanos do que em Caucasianos (Devita *et al.*, 1997). As razões para as diferenças étnicas não estão ainda esclarecidas, mas supõe-se que possam ser dependentes da exposição a certos factores de risco.

A idade, tal como na maioria das neoplasias, é um factor importante no risco para carcinoma da cabeça e pescoço. Tipicamente, estas neoplasias ocorrem em indivíduos com idade entre os 65 e 75 anos, podendo ocorrer com menos frequência em indivíduos mais novos.

Os factores de risco para as neoplasias da cabeça e pescoço são vários e alguns de importância muito significativa. Alguns destes factores são genéticos, os quais predispõem um indivíduo para o desenvolvimento da neoplasia, embora sejam responsáveis por menos de 5% dos cancros (Bast *et al.*, 2000).

Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado claramente a importância do tabaco e do álcool na etiologia do carcinoma da cabeça e pescoço (Maier *et al.*, 1992; Vokes *et al.*, 1993). Cada um destes agentes tem uma função importante no desenvolvimento destas neoplasias, sendo o risco ainda mais pronunciado quando se verifica do efeito combinado destes dois factores (Maier *et al.*, 1992).

Outros factores etiológicos importantes nas neoplasias da cabeça e pescoço incluem a infecção viral, por exemplo, pelo vírus HPV no cancro da laringe e o vírus Epstein Barr no cancro da nasofaringe (Bast *et al.*, 2000), a exposição ocupacional e a dieta (Maier *et al.*, 1991; Muscat *et al.*, 1992).

O carcinoma da cabeça e pescoço é também caracterizado por uma variedade de alterações genéticas, nomeadamente a perda/ganho de determinadas regiões cromossómicas (ganho nas regiões 3q, 8q, 9q, 20q, 7p, 11q13 e 5p, e perdas nas regiões 3p, 21q, 5q, 13q 18q e 8p). As perdas, bem como os ganhos, destas regiões poderão indicar a presença nestas zonas de genes importantes no processo de carcinogénese destas neoplasias. O conhecimento destas alterações poderá ser útil na avaliação do prognóstico da doença e da resposta à terapia nas neoplasias da cabeça e pescoço (Snyderman *et al.*, 2001).

1.5. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS DA TESE

Hoje em dia é geralmente aceite que a iniciação e o desenvolvimento tumoral são determinados por um balanço delicado entre factores ambientais e as características genéticas de cada indivíduo. Estima-se que cerca de 80% dos tumores humanos se devem à acção de carcinogénios ambientais. O metabolismo destes carcinogénios exerce uma função central na protecção contra os efeitos nocivos por eles provocados. A presença de alterações interindividuais nos genes que codificam as enzimas envolvidas neste metabolismo, deve assim, representar um factor de susceptibilidade genética para determinadas doenças, nomeadamente o cancro.

Os polimorfismos são alterações genéticas com uma elevada incidência na população em geral, e associam-se normalmente a um fenótipo alterado devido à ausência do produto do gene, ou à alteração da sua actividade específica ou afinidade para os substratos.

A NAT2 é uma das enzimas envolvidas no metabolismo de carcinogénios, tendo a capacidade de activar e destoxificar um grande número de carcinogénios de arilaminas, através de reacções de acetilação. Esta enzima é codificada por um gene altamente polimórfico, e os vários genótipos conferem fenótipos com diferentes capacidades de acetilação. Os polimorfismos de *NAT2* são muito frequentes na população em geral, tem sido demonstrado que o gene *NAT2* se encontra localizado numa zona cromossómica muito instável e de frequentes perdas alélicas em variados tipos de cancro.

Tendo em consideração o que foi anteriormente exposto, o objectivo deste trabalho consistiu no:

- estudo dos polimorfismos genéticos da enzima N-acetiltransferase 2 e sua possível associação com a susceptibilidade para quatro tipos de tumores sólidos: cancro do colo do útero, cancro da mama, cancro da próstata e cancro da cabeça e pescoço.

Esta escolha baseou-se no facto de todos eles apresentarem como importante factor de risco a exposição ambiental a carcinogénios, nomeadamente a carcinogénios de arilaminas, presentes em diversas fontes.

Materiais e Métodos

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS

No presente trabalho foi realizado um estudo do tipo caso-controlo, para avaliar a associação entre os polimorfismos do gene *NAT2* e susceptibilidade para cancro. Foram estudados quatro modelos de neoplasias: cancro do colo do útero, cancro da mama, cancro da próstata e cancro cabeça e pescoço. Todas as amostras estudadas são provenientes de indivíduos da região norte de Portugal e foram utilizadas neste trabalho com o seu conhecimento e consentimento prévios.

2.1.1. Indivíduos Controlo

O grupo controlo foi constituído por trezentos e setenta e oito indivíduos saudáveis, sem qualquer patologia do foro oncológico, provenientes da região norte de Portugal, apresentando uma idade mediana de 56 anos (desvio padrão (DP) de 17,18). Deste grupo fizeram parte duzentos e oito indivíduos do sexo feminino e cento e setenta do sexo masculino, com uma idade mediana de 53 (DP de 17,16) e 60 anos (DP de 17,09), respectivamente.

2.1.2. Grupo de Pacientes com Cancro do Colo do Útero

Para a análise da associação entre os polimorfismos de *NAT2* e susceptibilidade para cancro do colo do útero, foram utilizadas as primeiras amostras referentes a cento e vinte e cinco mulheres com carcinoma invasivo espinocelular confirmado

histologicamente, que deram entrada no laboratório de Patologia Molecular. Estas pacientes foram admitidas no Instituto Português de Oncologia da região Norte (IPO-Porto) entre 1997 e 1999. Todas as doentes apresentavam estadio III de carcinoma do colo do útero, de acordo com o sistema de estadiamento da Federação Internacional de Ginecologia (FIGO) (Radiumheit, 1979). A idade mediana das doentes era de 59 anos (DP de 10,5).

2.1.3. Grupo de Pacientes com Cancro da Mama

O grupo de casos com cancro da mama era constituído pelas primeiras amostras de cento e quarenta e três mulheres admitidas no IPO-Porto entre 1999-2001, às quais foi diagnosticado carcinoma da mama, que deram entrada no laboratório de Patologia Molecular. Este grupo de doentes apresentava uma idade mediana de 46 anos (DP de 13,72). Dezanove pacientes mostravam um estadio I, setenta e três estadio II, vinte e uma estadio III e apenas seis estadio IV, de acordo com American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Breast, em AJCC Cancer Staging Manual, 1997). Foi observada metastização linfática de gânglios regionais em oitenta e quatro pacientes, enquanto trinta e nove não a apresentavam. Não foi possível o acesso aos processos clínicos em vinte e cinco e vinte doentes com carcinoma da mama.

2.1.4. Grupo de Pacientes com Cancro da Próstata

Com o intuito de avaliar a influência dos polimorfismos do gene *NAT2* no risco de cancro da próstata, foram testadas as primeiras amostras relativas a cento e cinquenta e três homens com carcinoma da próstata confirmado histologicamente, admitidos no IPO-

Porto entre 1998 e 2000, que deram entrada no laboratório de Patologia Molecular. Este grupo apresentava uma idade mediana de 66 anos (DP de 8,43). Setenta e três dos pacientes mostravam uma doença prostática localizada e outros setenta e três uma doença avançada. Não tivemos acesso ao processo clínico de sete dos doentes com carcinoma da próstata.

2.1.5. Grupo de Pacientes com Cancro da Cabeça e Pescoço

O grupo de casos com cancro da cabeça e pescoço foi constituído pelas primeiras amostras de vinte e quatro mulheres e oitenta e oito homens, com carcinoma diagnosticado histologicamente, que deram entrada no laboratório de Patologia Molecular, apresentando uma idade mediana de 54 anos (DP de 13,67). Estes doentes foram admitidos no IPO-Porto entre 2000 a 2001. O carcinoma da nasofaringe foi o mais frequente, apresentando-se em sessenta e três doentes, seguido do carcinoma da cavidade oral em dezassete pacientes, o carcinoma da laringe em catorze, carcinoma da orofaringe em nove e, por último, o carcinoma da faringe em apenas três pacientes. Em seis dos doentes não nos foi possível obter a localização exacta do tumor, tendo sido referido apenas como um carcinoma da cabeça e pescoço. Apenas quatro pacientes apresentavam estadio I, doze o estadio II, dezoito o estadio III e o estadio IV mostrava-se em cinquenta e seis indivíduos, de acordo com o sistema de classificação do AJCC (Head and Neck, em AJCC Cancer Staging Manual, 1997). Novamente não nos foi possível o acesso ao processo clínico de doze doentes.

2.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Foram recolhidas amostras de sangue periférico de todos os grupos de indivíduos alvo de estudo.

Às amostras de sangue periférico adicionou-se uma solução hipotónica, AKE (Anexo I), de modo a provocar a lise dos eritrócitos, e incubou-se a 4ºC durante 30 minutos. Centrifugou-se a 2000 rpm, durante 10 minutos a 4ºC, ressuspendeu-se o sedimento na solução hipotónica, seguindo-se uma nova centrifugação a 2000 rpm, durante 10 minutos a 4ºC. Ressuspendeu-se novamente o sedimento, desta vez em PBS (Anexo I), seguindo-se uma terceira e última centrifugação a 4ºC (durante 10 minutos a 2000 rpm).

2.3. EXTRACÇÃO DE DNA

Uma vez obtido o sedimento de células, desprezou-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se o sedimento em 4 ml de tampão SE (Anexo I), proporcionando a lise das células nucleares; adicionou-se SDS (dodecilsulfato de sódio, Gibco BRL 5525UA), promover a dissociação do DNA das proteínas. Adicionou-se proteinase K (Boehringer Mannheim 745723) (concentração final de 200 μg/ml) e incubou-se a 55ºC durante 12 horas para completa degradação proteica.

Adicionou-se 1 ml de NaCl 6 M previamente aquecido, para uma concentração final de 1,5 M, com o objectivo de precipitar as proteínas ("salting-out"). A separação das proteínas foi efectuada pela adição de uma vez o volume de clorofórmio (Merck 1124451000) e agitação suave durante 30 a 60 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 2500 rpm, durante 10 minutos a 4ºC de modo a separar a fase aquosa, contendo o DNA,

da fase orgânica, onde se encontram as proteínas degradadas. A fase aquosa foi recolhida e foi-lhe adicionado igual volume de isopropanol (Panreac cod131090), promovendo assim a precipitação do DNA. Este, uma vez recolhido foi lavado com etanol (Merck 1009831000) a 70% (p/v). Após completa evaporação do etanol, o DNA foi resuspenso em água bidestilada.

As amostras foram armazenadas a 4ºC ou –20ºC conforme o tempo de armazenamento previsto.

2.4. AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DE DNA POR PCR

O fragmento de DNA desejado foi amplificado por PCR *(Polymerase Chain Reaction)* e os diferentes alelos mutantes analisados por RFLP *(Restriction Lenght Fragment Polymorphisms)*, com base no protocolo descrito por González *et al.* (1998).

Submeteram-se a PCR cerca de 20 ng de DNA extraído de cada caso. O objectivo era amplificar um fragmento de 290 pares de bases (pb) referente à região codificante do gene *NAT2*.

O volume total de reacção foi de 50 μl, e a mistura de reacção incluiu: 5 μl de tampão de reacção de PCR (Anexo I); 1 U Taq DNA Polimerase (MBI Fermentas, #EP0402); 1,5 mM de $MgCl_2$ (MBI Fermentas); 0,2 mM de dNTP (dinucleosídeos trifosfato) (MBI Fermentas, #R0192) e 1 μM de primer NT2-A (TGTCGATGCTGGGTCTGGAA) e primer NT2-B (ATGAAGATGTTGGGAGACCGT).

As condições da amplificação foram: pré-desnaturação a 94ºC durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 98ºC (desnaturação), 1 minuto a 62ºC

(emparelhamento), 1 minuto a 72ºC (extensão) e um passo final de extensão a 72ºC durante 5 minutos. O aparelho utilizado foi um termociclador Biometra *T-Gradient*.

2.4.1. Identificação de um fragmento de DNA por electroforese em gel de agarose

Para confirmação da amplificação do fragmento de DNA desejado, analisaram-se 15 μl dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo (10 μg/ml). Tendo em conta o tamanho do fragmento a identificar utilizou-se um gel de agarose 1,5% (p/v). Os géis foram preparados em tampão TBE (Anexo I), sendo este também utilizado como tampão de electroforese. As amostras foram aplicadas no gel após a sua mistura com o tampão de aplicação (Gibco BRL, cod.10816-015). A sua visualização efectuou-se no aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

2.5. DIGESTÃO DO FRAGMENTO DE DNA AMPLIFICADO POR ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Para a análise dos alelos mutantes do gene NAT2 pretendidos recorreu-se à técnica de RFLP. Para tal isso de 20 μl dos produtos de PCR foram submetidos a digestão com a enzima de restrição pretendida, num volume total de reacção de 50 μl. Analisaram-se 2 alelos mutantes para o gene *NAT2*: *NAT2*5* ($C^{481}T$) e *NAT2*6* ($G^{590}A$).

2.5.1. Digestão do fragmento de DNA amplificado pela enzima de restrição *Kpn* I

O alelo *NAT2*5* ($C^{481}T$) foi analisado utilizando a enzima de restrição *Kpn* I e o respectivo tampão (MBI Fermentas, #ER0521), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. A incubação ocorreu a 37ºC durante 4 horas.

2.5.1.1. Separação de fragmentos de DNA por electroforese em gel de agarose

O resultado da digestão com a enzima de restrição *Kpn* I foi observado por electroforese em gel de agarose 2,5% (p/v), corado com brometo de etídeo (10 μg/ml). Os pesos moleculares esperados das bandas correspondentes ao genótipo homozigótico selvagem são de 120 pb e 170 pb. Para o caso do genótipo heterozigótico de 120 pb, 170 pb e 290 pb; quanto ao genótipo homozigótico para o alelo mutante o peso molecular da banda é de 290 pb.

2.5.2. Digestão do fragmento de DNA amplificado pela enzima de restrição *Taq* I

A enzima de restrição *Taq* I, juntamente com o tampão respectivo, (MBI Fermentas #ER0671), foi utilizada para análise do alelo *NAT2*6* ($G^{590}A$), realizando-se uma incubação a 65ºC durante 4 horas, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

2.5.2.1. Separação de fragmentos de DNA por electroforese em gel de agarose

Através de electroforese em gel de agarose 3% (p/v) corado com brometo de etídeo (10 μg/ml) foi possível observar-se os fragmentos resultantes da digestão com a enzima de restrição *Taq* I. O tamanho dos fragmentos esperados era o seguinte: 60 pb e 230 pb para os homozigóticos selvagens; 60 pb, 230 pb e 290 pb para os heterozigóticos; 290 pb para os homozigóticos para o alelo mutante.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa estatístico SPSS (*Standard Version*, SPSS Inc., 1996).

A análise pelo teste de Qui-Quadrado (teste de χ^2) foi utilizada para comparação das variáveis categóricas. O valor de p foi obtido pelo teste de χ^2, ou pelo teste de Fisher quando o número de indivíduos considerados (n) foi inferior a 5, e foi considerado estatisticamente significativo quando inferior a 5%. O valor *Odds Ratio* (OR) indica o factor de risco para determinado acontecimento num estudo do tipo caso/controlo, e foi calculado juntamente com o seu intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para medir a associação entre os alelos, genótipos e fenótipos do gene *NAT2* e risco para cancro.

Foi calculada a Proporção Atribuível (AP - *Attributable Proportion*), de acordo com o método previamente descrito por Schiffman *et al.* (1993). Para tal utilizamos a formula: AP= PRFx(1-1/RR). A Proporção Atribuível é definida como a fracção de doença

Resultados

3. RESULTADOS

O objectivo deste estudo foi avaliar a influência dos alelos e genótipos do gene *NAT2* na susceptibilidade para quatro tipos de neoplasias, tendo-se efectuado uma análise estatística comparativa das frequências das variantes alélicas e genotípicas entre os vários grupos de casos e o grupo controlo.

3.1. IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NO GENE *NAT2*

Foi efectuada uma amplificação por PCR em amostras de DNA genómico tanto dos grupos pacientes com cancro como dos indivíduos do grupo controlo, de onde se obteve um fragmento de 290 pb, correspondente ao gene que codifica a enzima NAT2. O fragmento obtido por PCR nos referidos grupos de indivíduos foi observado por electroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) e confirmou-se o seu peso molecular (figura 3.1), por comparação com o marcador de peso molecular (Anexo II).

O produto resultante da amplificação foi digerido com duas enzimas de restrição, pelo método RFLP, o que permitiu detectar a presença de dois dos polimorfismos mais comuns do gene *NAT2* (Blum et al, 1991). Assim, e após esta análise, foi possível determinar as frequências alélicas e genotípicas do gene *NAT2* nos grupos de indivíduos analisados. A digestão dos produtos de PCR foi efectuada com as enzimas de restrição *Kpn* I e *Taq* I, resultando nos fragmentos com o tamanho esperado (figura 3.2a e b).

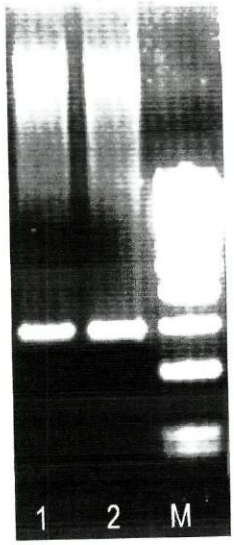


Figura 3.1 – Electroforese de produtos de PCR em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo (10 μg/ml). (pista 1 e 2 - exemplo da amplificação do fragmento de 290 pb; M- marcador de 100 bp).

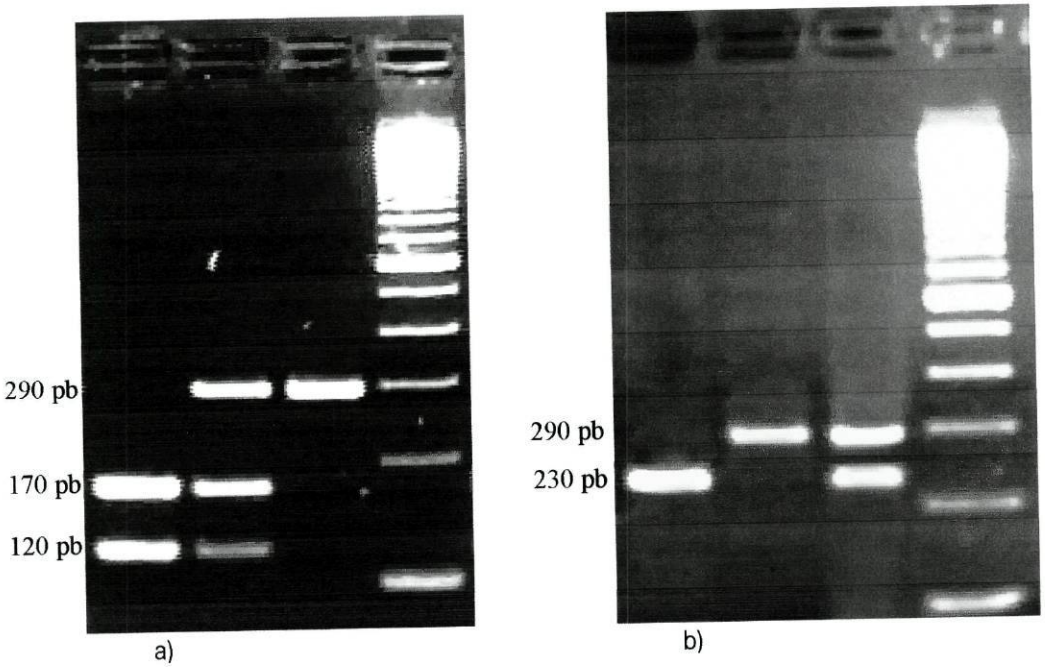


Figura 3.2 – RFLP dos produtos de PCR do fragmento do gene *NAT2*. a) digestão com a enzima de restrição *Kpn* I: fragmento de 290 pb – alelo *NAT2*5*; fragmentos de 120 e 170 pb – alelo *NAT2*4*. b) digestão com a enzima de restrição *Taq* I: fragmento de 290 pb – alelo *NAT2*6*; fragmentos de 60 (não visualizado) e 230 pb – alelo *NAT2*4*.

O produto de PCR digerido com a enzima de restrição *Kpn* I permitiu a identificação do alelo mutante M1, que resulta da alteração de uma C (citosina) por uma T (timina) na posição 481 do gene *NAT2*, que elimina a sequência alvo para a enzima *Kpn* I. Este alelo é também designado *NAT2*5* e é a variação alélica mais frequentemente encontrada na população Caucasiana. Foram identificados nos diferentes grupos estudados fragmentos de diferentes pesos moleculares que correspondem aos seguintes alelos: fragmentos de 120 e 170 pb identificam o alelo *NAT2*4*, enquanto o fragmento de 290 pb identifica o alelo *NAT2*5* (figura 3.2a).

Foi possível identificar o alelo mutante M2, também designado *NAT2*6*, recorrendo à digestão com a enzima de restrição *Taq* I. Este alelo corresponde à substituição de uma G (guanina) por uma A (adenina) no nucleótideo 590 do gene *NAT2* e é o segundo alelo mais comum na população Caucasiana. A existência desta variação alélica no gene *NAT2* produz uma enzima com uma capacidade de acetilação diminuída (Blum et al, 1991). Os fragmentos obtidos pela digestão com a enzima de restrição *Taq* I permitiram a identificação da presença do alelo *NAT2*6*. Assim, a presença do alelo *NAT2*4* é determinada pelos fragmentos de 60 pb e 230 pb e a do alelo *NAT2*6* pelo fragmento de 290 bp (figura 3.2b).

3.2. FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DO GENE *NAT2* EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (GRUPO CONTROLO)

Após análise estatística foi possível obter as frequências alélicas e genotípicas do grupo controlo e efectuar a sua comparação com as frequências de outras populações (quadro 3.1 e 3.2).

Quadro 3.1 – Comparação das frequências dos alelos *NAT2*4*, **5* e **6* em diferentes populações.

População	Total	Alelos *NAT2*			Referência
		*NAT2*4*	*NAT2*5*	*NAT2*6*	
		%	%	%	
Caucasiana-Europeia (Portugal)	756	29,9	42,3	27,8	presente estudo
Caucasiana-Europeia (Portugal)	370	24,9	45,9	29,2	Gil *et al.*, 1998
Caucasiana	7465	*	46	28,5	Garte *et al.*, 2001
Caucasiana-Americana	710	25,6	45,5	28,9	Bell *et al.*, 1993
Afro-Americana	202	41,1 [a]	32,2 [b]	26,7	Bell *et al.*, 1993

[a] p= 0,013 Comparação pelo teste χ^2 , com a população controlo.

[b] p= 0,009 Comparação pelo teste χ^2 , com a população controlo.

* dado não apresentado na referência.

Da análise do quadro 3.1 observamos que no caso das frequências alélicas do gene *NAT2* não existem diferenças estatisticamente significativas entre a população em estudo e as populações Caucasianas Europeia e Americana. No entanto, as frequências dos alelos *NAT2*4* e *NAT2*5* apresentaram diferenças entre a população deste estudo e a Afro-Americana (p=0,013 e p=0,009, respectivamente).

Após comparação estatística das frequências genotípicas da população utilizada neste estudo com as de outras populações (quadro 3.2) verificou-se que existiam diferenças estatisticamente significativas na frequência do genótipo *NAT2*4/NAT2*4* da população Afro-Americana, do genótipo *NAT2*4/NAT2*6* da população Caucasiana-

Europeia considerada por Gil *et al.* (1998), e do genótipo *NAT2*5/NAT2*5* da população Caucasiana-Americana estudada por Bell *et al.* (1993).

Quadro 3.2 – Comparação das frequências genotípicas do gene *NAT2* em diferentes populações.

Genótipos *NAT2*	População				
	Caucasiana-Europeia (Portugal)	Caucasiana-Europeia (Portugal)	Caucasiana	Caucasiana-Americana	Afro-Americana (r)
	%	%	%	%	%
*NAT2*4/NAT2*4*	6,3	7	7,3	6,5	17,8 [a]
*NAT2*4/NAT2*5*	28,8	27	21	22,5	28,7
*NAT2*4/NAT2*6*	18,3	8,6 [b]	13,3	15,8	17,8
*NAT2*5/NAT2*6*	24,1	29,2	25,5	24,5	15,8
*NAT2*5/NAT2*5*	15,9	17,8	21,9	22 [c]	9,9
*NAT2*6/NAT2*6*	6,6	10,3	6,6	8,7	9,9
Total	378	185	3846	355	101
Referência	presente estudo	Gil *et al.*, 1998	Garte *et al.*, 2001	Bell *et al.*, 1993	Bell *et al.*, 1993

[a] p= 0,0003 Comparação pelo teste χ^2, com a população controlo.

[b] p= 0,003 Comparação pelo teste χ^2, com a população controlo.

[c] p= 0,035 Comparação pelo teste χ^2, com a população controlo.

3.3. Frequências dos Polimorfismos *NAT2* em Indivíduos com Cancro do Colo do Útero (Estudo Caso Controlo)

A distribuição dos alelos mutantes de *NAT2* no grupo de mulheres com cancro do colo do útero e no grupo de mulheres saudáveis está representada no quadro 3.3. A frequência dos alelos *NAT2*4, NAT2*5* e *NAT2*6* foi de 32%, 40% e 28% nas pacientes

com cancro do colo do útero, e de 28,5%, 47,1% e 24,4% no grupo controlo. Na análise estatística realizada não se observaram diferenças estatisticamente significativas nas frequências das variantes alélicas entre os dois grupos estudados.

Quadro 3.3 – Frequências alélicas de *NAT2* nas pacientes com cancro colo do útero e no grupo controlo.

Alelos *NAT2*	Cancro Colo Útero		Controlo		OR (95%IC)
	n	%	n	%	
*NAT2*4*	80	32	97	28,5	1,18 (0,81-1,71)
*NAT2*5*	100	40	160	47,1	0,75 (0,53-1,06)
*NAT2*6*	70	28	83	24,4	1,20 (0,82-1,77)
Total	250	100	340	100	

A distribuição dos genótipos *NAT2* no grupo de doentes com cancro do colo do útero e no grupo controlo pode ser observada no quadro 3.4. As frequências dos vários genótipos não diferiram entre os dois grupos, com a excepção do genótipo *NAT2*6/NAT2*6*. A frequência do genótipo *NAT2*6/NAT2*6* foi maior nos doentes com carcinoma do colo do útero (14,4%) comparada com a do grupo controlo (4,7%). Foi observado um risco de cancro do colo do útero três vezes maior em mulheres portadoras do genótipo *NAT2*6/NAT2*6* (OR=3,41; 95%IC: 1,34-8,89; p=0,007).

Quadro 3.4 – Frequências genotípicas de *NAT2* em doentes com cancro do colo do útero e em indivíduos saudáveis.

Genótipos *NAT2*	Casos Colo Útero		Controlo		OR (95%IC)
	N	%	n	%	
*NAT2*4/NAT2*4*	14	11,2	11	6,5	1,82 (0,75-4,49)
*NAT2*4/NAT2*5*	35	28,0	48	28,2	0,99 (0,74-1,34)
*NAT2*4/NAT2*6*	17	13,6	27	15,9	0,83 (0,41-1,68)
*NAT2*5/NAT2*6*	17	13,6	40	23,5	0,51 (0,26-0,99)
*NAT2*5/NAT2*5*	24	19,2	36	21,2	0,88 (0,48-1,64)
*NAT2*6/NAT2*6*	18	14,4	8	4,7	**3,41 (1,34-8,89)** [a]
Total	125	100	170	100	

[a] p= 0,007

Para o grupo com cancro do colo do útero a proporção de casos de doença atribuível (AP) à influência do genótipo *NAT2*6/NAT2*6* foi de 10,2%.

3.4. Frequências dos Polimorfismos *NAT2* em Indivíduos com Cancro da Mama (Estudo Caso Controlo)

Para avaliar a influência dos polimorfismos *NAT2* no risco de cancro da mama foi utilizado um grupo de pacientes com este tipo de carcinoma e um grupo de mulheres sem qualquer patologia associada. No quadro 3.5 estão apresentadas as frequências de cada alelo pesquisado nos dois grupos mencionados. Não foram observadas diferenças significativas nas frequências alélicas entre o grupo de casos com patologiae o grupo controlo.

Quadro 3.5 - Frequências alélicas do gene *NAT2* em pacientes com cancro da mama e no grupo controlo.

Alelos *NAT2*	Cancro Mama		Controlo		OR (95%IC)
	n	%	n	%	
*NAT2*4*	82	28,7	121	29,1	0,98 (0,69-1,38)
*NAT2*5*	121	42,3	182	43,8	0,94 (0,69-1,29)
*NAT2*6*	83	29,0	113	27,1	1,10 (0,77-1,55)
Total	286	100	416	100	

A análise estatística das frequências genotípicas de *NAT2* em doentes com cancro da mama e em indivíduos saudáveis não mostrou qualquer diferença estatisticamente significativa (quadro 3.6).

Quadro 3.6 - Frequências genotípicas de *NAT2* em doentes com cancro da mama e em indivíduos saudáveis.

Genótipos *NAT2*	Casos Mama		Controlo		OR (95%IC)
	n	%	N	%	
*NAT2*4/NAT2*4*	10	7,0	13	6,3	1,13 (0,44-2,84)
*NAT2*4/NAT2*5*	36	25,2	56	26,9	0,91 (0,55-1,53)
*NAT2*4/NAT2*6*	26	18,2	39	18,8	0,96 (0,54-1,73)
*NAT2*5/NAT2*6*	41	28,7	56	26,9	1,12 (0,68-1,85)
*NAT2*5/NAT2*5*	22	15,4	35	16,8	0,90 (0,48-1,67)
*NAT2*6/NAT2*6*	8	5,6	9	4,3	1,31 (0,45-3,81)
Total	143	100	208	100	

3.4.1. Frequências dos Genótipos *NAT2* no Grupo de Casos de Cancro da Mama tendo em conta Características Clínico-Patológicas

Com o intuito de avaliar a influência dos polimorfismos *NAT2* na agressividade e progressão da doença, o grupo de pacientes com cancro da mama foi estratificado segundo o estadio e a presença de metastização ganglionar regional. O quadro 3.7 apresenta a distribuição dos genótipos *NAT2* no grupo de casos com estadio I e II e com estadio III e IV. Pode-se observar a inexistência de diferenças com significado estatístico entre as frequências genotípicas entre estes dois subgrupos de casos de cancro da mama.

Quadro 3.7 - Frequência dos genótipos *NAT2* nos subgrupos de mulheres com cancro da mama em estadio I/II e em estadio III/IV.

Genótipos *NAT2*	Estadio I/II (n=92)	Estadio III/IV (n=26)	p
	%	%	
*NAT2*4/NAT2*4*	7,6	7,7	0,632
*NAT2*4/NAT2*5*	28,3	23,1	0,600
*NAT2*4/NAT2*6*	15,2	19,2	0,410
*NAT2*5/NAT2*6*	31,5	30,8	0,942
*NAT2*5/NAT2*5*	10,9	15,4	0,371
*NAT2*6/NAT2*6*	6,5	3,9	0,518

Na figura 3.3 encontra-se a representação gráfica das frequências dos genótipos *NAT2* nos dois subgrupos de pacientes com carcinoma da mama, sendo estas relativamente próximas, não se verificando diferenças significativas.

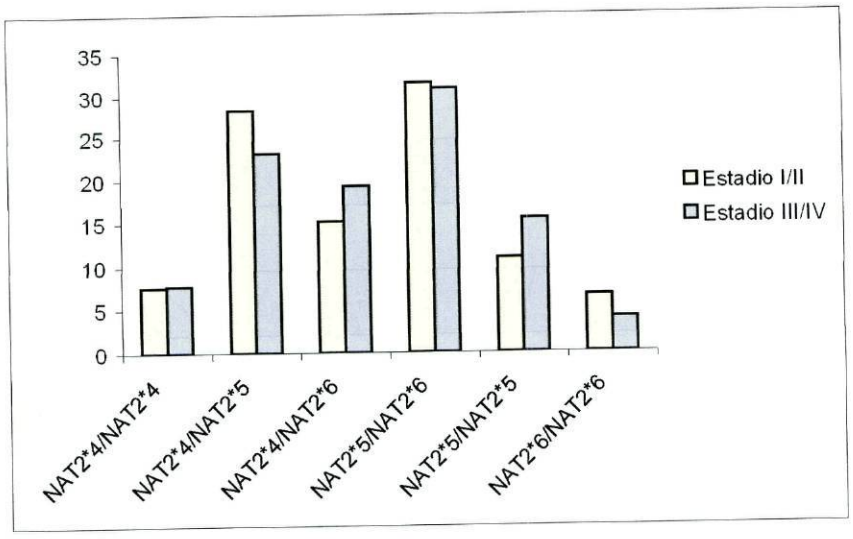


Figura 3.3 – Frequências, em percentagem, dos genótipos *NAT2* no subgrupo de doentes que apresentavam estadio I/II e no subgrupo com estadio III/IV.

Quanto ao parâmetro presença ou ausência de metastização ganglionar regional a análise estatística efectuada entre os dois subgrupos de doentes com carcinoma da mama não revelou diferenças significativas nas frequências genotípicas de *NAT2* (quadro 3.8).

Quadro 3.8 - Frequência dos genótipos *NAT2* nos subgrupos de casos de cancro da mama estabelecidos com base na presença ou ausência de metastização ganglionar regional.

Genótipos *NAT2*	Presença	Ausência	p
	%	%	
*NAT2*4/NAT2*4*	10,7	2,6	0,114
*NAT2*4/NAT2*5*	23,8	28,2	0,601
*NAT2*4/NAT2*6*	16,7	15,4	0,858
*NAT2*5/NAT2*6*	23,8	38,5	0,094
*NAT2*5/NAT2*5*	19,0	10,3	0,219
*NAT2*6/NAT2*6*	6,0	5,1	0,609

3.5. FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS *NAT2* EM INDIVÍDUOS COM CANCRO DA PRÓSTATA (ESTUDO CASO CONTROLO)

Com o objectivo de avaliar a associação dos polimorfismos *NAT2* com o risco de carcinoma da próstata utilizou-se um grupo de homens sem patologia do foro oncológico e um grupo de casos de carcinoma da próstata, num estudo do tipo caso controlo.

Os alelos *NAT2*4, NAT2*5* e *NAT2*6* estavam presentes em 33,7%, 39,5% e 26,8%, no grupo de pacientes com carcinoma da próstata e em 30,9%, 40,6% e 28,5% no grupo de indivíduos controlo, respectivamente (quadro 3.9). Estes resultados não traduzem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos em estudo.

Quadro 3.9 - Frequências alélicas de *NAT2* no grupo de doentes com cancro da próstata e no grupo controlo.

Alelos *NAT2*	Cancro Próstata		Controlo		OR (95%IC)
	n	%	n	%	
*NAT2*4*	103	33,7	105	30,9	1,14 (0,81-1,60)
*NAT2*5*	121	39,5	138	40,6	0,96 (0,69-1,33)
*NAT2*6*	82	26,8	97	28,5	0,92 (0,64-1,31)
Total	306	100	340	100	

O quadro 3.10 apresenta as frequências dos genótipos *NAT2* no grupo de casos de cancro da próstata e no grupo controlo. Através da análise estatística podemos verificar que apenas um genótipo *NAT2* apresenta diferenças entre os dois grupos em análise. O genótipo *NAT2*6/NAT2*6* está presente em 9,4% dos indivíduos do grupo controlo e em apenas 3,3% dos casos de cancro da próstata, sendo o único a apresentar

uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados (p=0,025). Verificou-se que indivíduos portadores do genótipo *NAT2*6/NAT2*6* apresentavam um factor de protecção para carcinoma da próstata (OR=0,33; 95%IC: 0,10-0,98).

Quadro 3.10 - Frequências genotípicas de *NAT2* em pacientes com cancro da próstata e em indivíduos saudáveis.

Genótipos *NAT2*	Cancro Próstata		Controlo		OR (95%IC)
	N	%	n	%	
*NAT2*4/NAT2*4*	11	7,2	11	6,5	1,12 (0,44-2,88)
*NAT2*4/NAT2*5*	41	26,8	53	31,2	0,81 (0,48-1,35)
*NAT2*4/NAT2*6*	40	26,1	30	17,6	1,65 (0,94-2,92)
*NAT2*5/NAT2*6*	32	20,9	35	20,6	1,02 (0,58-1,81)
*NAT2*5/NAT2*5*	24	15,7	25	14,7	1,08 (0,56-2,07)
*NAT2*6/NAT2*6*	5	3,3	16	9,4	**0,33 (0,10-0,98)** [a]
Total	153	100	170	100	

[a] p= 0,025

3.4.1. Frequências dos Genótipos *NAT2* no Grupo de Casos de Cancro da Próstata tendo em conta Características Clínico-Patológicas

De acordo com as informações clínico-patológicas obtidas, estratificámos o grupo de casos com cancro da próstata tendo em atenção os seguintes parâmetros: presença de doença localizada ou avançada, grau de Gleason (menor ou igual a 7 ou superior a 7), e por último quanto ao marcador de prognóstico PSA. Com isso pretendia-se avaliar a influência dos polimorfismos *NAT2* na progressão e desenvolvimento da neoplasia em causa.

No quadro 3.11 está sumariada a distribuição genotípica de *NAT2* em subgrupos do grupo de casos de cancro da próstata, segundo a extensão do tumor para lá da cápsula prostática. Não foram observadas diferenças significativas nas frequências genotípicas entre estes dois subgrupos. Na figura 3.4 é possível observar graficamente que nenhum dos genótipos difere acentuadamente entre os dois subgrupos.

Quadro 3.11 - Frequência dos genótipos *NAT2* em dois subgrupos do grupo de casos de cancro da próstata: subgrupo de doentes que apresentaram extensão extracapsular (doença avançada) do tumor e subgrupo de doentes com extensão tumor intracapsular (doença localizada).

Genótipos *NAT2*	D. Localizada	D. Avançada	p
	%	%	
*NAT2*4/NAT2*4*	9,6	2,7	0,083
*NAT2*4/NAT2*5*	21,9	31,5	0,190
*NAT2*4/NAT2*6*	27,4	24,7	0,706
*NAT2*5/NAT2*6*	19,2	23,3	0,544
*NAT2*5/NAT2*5*	16,4	16,4	1,000
*NAT2*6/NAT2*6*	5,5	1,4	0,183

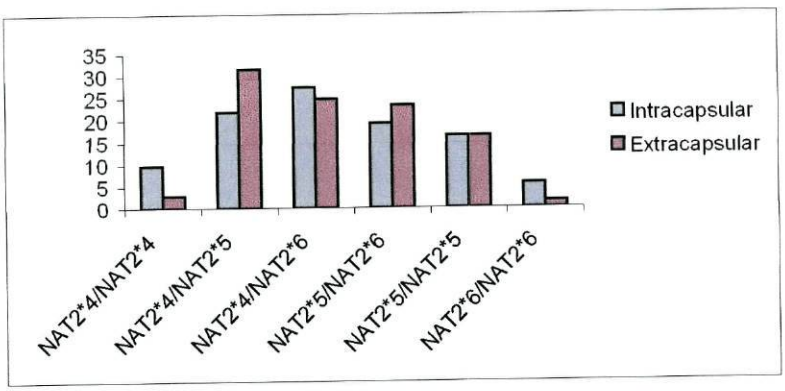


Figura 3.4 – Frequências, em percentagem, dos genótipos *NAT2* nos dois subgrupos de doentes de doentes com base no tipo de invasão prostática.

O grau histológico de Gleason reflecte o grau de agressividade da neoplasia, sendo um valor superior a 7 sinónimo de uma doença fracamente diferenciada. Assim, estratificamos o grupo em doentes com grau de Gleason igual ou inferior a 7 e em doentes com grau superior a 7. No quadro 3.12 encontra-se a distribuição dos genótipos de *NAT2* nos dois subgrupos referidos. Da análise estatística realizada observa-se a inexistência de diferenças estatisticamente significativas nas frequências genotípicas entre os subgrupos.

Quadro 3.12 - Frequência dos genótipos *NAT2* em dois subgrupos do grupo de casos de cancro da próstata: subgrupo de doentes com grau de Gleason inferior ou menor que 7 e com grau superior a 7.

Genótipos *NAT2*	Grau de Gleason		p
	>7	≤ 7	
	%	%	
*NAT2*4/NAT2*4*	4,0	7,0	0,494
*NAT2*4/NAT2*5*	36,0	24,6	0,151
*NAT2*4/NAT2*6*	28,0	27,2	0,935
*NAT2*5/NAT2*6*	20,0	21,9	0,832
*NAT2*5/NAT2*5*	12,0	14,9	0,496
*NAT2*6/NAT2*6*	0,0	4,4	0,365

O PSA é um marcador tumoral da próstata bastante importante, uma vez que níveis superiores a 10ng/ml indicam um possível desenvolvimento de neoplasia prostática. Neste sentido o grupo de casos com cancro da próstata foi estratificado em dois subgrupos de acordo com os valores de PSA. No quadro 3.13 estão descritas as frequências genotípicas de *NAT2* em cada subgrupo. A análise estatística revelou que o genótipo *NAT2*6/NAT2*6* era mais frequente no subgrupo de casos com PSA igual ou

inferior a 10 ng/ml, sendo a diferença em relação ao grupo com PSA superior a 10 ng/ml estatisticamente significativa (p=0,023, pelo teste do χ^2; p=0,054, pelo teste Fisher) (quadro 3.13 e figura 3.5).

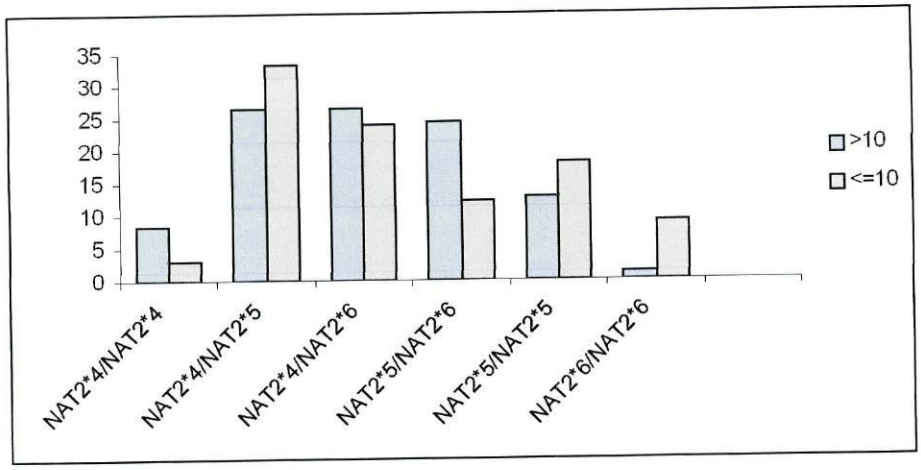


Figura 3.5 - Frequências em percentagem dos genótipos *NAT2* no subgrupo de doentes que apresentavam PSA igual ou inferior a 10 ng/ml e com PSA superior a 10 ng/ml.

Quadro 3.13 - Frequência dos genótipos *NAT2* em dois subgrupos do grupo de casos de cancro da próstata: subgrupo de doentes que apresentavam PSA superior a 10 ng/ml e com PSA igual ou inferior a 10 ng/ml.

Genótipos *NAT2*	PSA		p
	>10 ng/ml	≤ 10 ng/ml	
	%	%	
*NAT2*4/NAT2*4*	8,5	3,0	0,267
*NAT2*4/NAT2*5*	26,6	33,3	0,460
*NAT2*4/NAT2*6*	26,6	24,2	0,767
*NAT2*5/NAT2*6*	24,5	12,1	0,136
*NAT2*5/NAT2*5*	12,8	18,2	0,308
*NAT2*6/NAT2*6*	1,1	9,1	**0,023; 0,054**

3.6. FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS *NAT2* EM INDIVÍDUOS COM CANCRO DA CABEÇA E PESCOÇO (ESTUDO CASO CONTROLO)

Com o objectivo de analisar a influência dos polimorfismos *NAT2* na susceptibilidade para cancro da cabeça e pescoço, realizou-se um estudo do tipo caso controlo.

No quadro 3.14 apresenta-se as frequências dos alelos *NAT2* estudados, onde não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de casos de cancro da cabeça e pescoço.

Quadro 3.14 - Frequências alélicas de *NAT2* no grupo de doentes com cancro da cabeça e pescoço e no grupo controlo.

Alelos *NAT2*	Cancro Cabeça e Pescoço		Controlo		OR (95%IC)
	n	%	n	%	
*NAT2*4*	71	31,7	226	29,9	1,09 (0,78-1,52)
*NAT2*5*	87	38,8	320	42,3	1,06 (0,78-1,46)
*NAT2*6*	66	29,5	210	27,8	1,09 (0,77-1,53)
Total	224	100	756	100	

A distribuição dos genótipos *NAT2* no grupo de pacientes com cancro da cabeça e pescoço e no grupo de indivíduos controlo pode ser consultada no quadro 3.15. A frequência do genótipo *NAT2*4/NAT2*4* era maior nos doentes com carcinoma da cabeça e pescoço (15,2%) comparada com a do grupo controlo (6,3%). Verificou-se que existe um risco de cancro da cabeça e pescoço duas vezes maior nos indivíduos portadores do genótipo *NAT2*4/NAT2*4* (OR=2,64; 95%IC: 1,30-5,36; p=0,003). Pelo contrário, o genótipo *NAT2*4/NAT2*5* apresentou-se mais frequente nos indivíduos controlo (28,8%)

do que nos doentes com carcinoma da cabeça e pescoço, sendo a diferença estatisticamente significativa (p=0,034). Este genótipo revelou-se um factor de protecção.

Quadro 3.15 - Frequências genotípicas de *NAT2* no grupo de doentes com cancro da cabeça e pescoço e no grupo de indivíduos saudáveis.

Genótipos *NAT2*	Casos Cabeça e Pescoço		Controlo		OR (95%IC)
	N	%	n	%	
*NAT2*4/NAT2*4*	17	15,2	24	6,3	**2,64 (1,30-5,36)** [a]
*NAT2*4/NAT2*5*	21	18,8	109	28,8	**0,57 (0,33-0,99)** [b]
*NAT2*4/NAT2*6*	16	14,3	69	18,3	0,75 (0,40-1,39)
*NAT2*5/NAT2*6*	34	30,4	91	24,1	1,37 (0,84-2,25)
*NAT2*5/NAT2*5*	16	14,3	60	15,9	0,88 (0,46-1,66)
*NAT2*6/NAT2*6*	8	7,1	25	6,6	1,09 (0,44-2,62)
Total	112	100	378	100	

[a] p= 0,003

[b] p= 0,034

No grupo de casos com cancro da cabeça e pescoço a proporção de todos os casos de doença atribuível (AP) à influência do genótipo *NAT2*4/NAT2*4* é de 9,4%.

Discussão

4. DISCUSSÃO

A N-acetiltransferase 2 é uma enzima importante na fase II da destoxificação de determinados substratos, sugerindo uma função protectora em todos os tecidos expostos a carcinogénios (Perera, 1996). Esta enzima pode destoxificar substratos de arilaminas por N-acetilação ou torná-los mais tóxicos por O-acetilação. Os vários genótipos desta proteína podem estar implicados no risco para cancro em variados órgãos.

A hipótese mais referida baseia se no facto de indivíduos acetiladores lentos terem maior risco de desenvolver diversos tipos de cancros (ex: bexiga, mama, entre outros) como resultado da reduzida capacidade de destoxificar os carcinogénios químicos produzidos pelas enzimas citocromo P450 e outras (Fidialis *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999). No entanto, há evidências de que os indivíduos portadores do fenótipo acetilador rápido exibem um maior risco de cancro colorectal e cancro da cabeça e pescoço (Chen *et al.*, 1998; Gil *et al.*, 1998; Probst-Hensch *et al.*, 1995). Estes registos contraditórios podem ser atribuídos a bioactivação aumentada das aminas heterocíclicas, via O-acetilação (Hein *et al.*, 1994). Isto sugere que os polimorfismos da enzima NAT2 afectam quer a activação quer a desactivação metabólica de arilaminas e de outros compostos carcinogénicos.

O objectivo deste estudo foi avaliar a influência dos alelos e dos genótipos do gene *NAT2* na susceptibilidade para cancro do colo do útero, cancro da mama, cancro da próstata e cancro da cabeça e pescoço, num estudo do tipo caso controlo.

O gene *NAT2* apresenta um grande número de variantes alélicas. Neste estudo procedeu-se apenas à avaliação dos alelos mutantes *NAT2*5* e *NAT2*6*, uma vez que estes representam cerca de 90% dos alelos mutantes do gene *NAT2* nas populações Caucasianas (Blum *et al.*, 1991).

4.1. FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DO GENE *NAT2* EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS (GRUPO CONTROLO)

Os polimorfismos *NAT2* são muito frequentes na população em geral, no entanto apresentam uma grande variabilidade étnica e geográfica na sua distribuição.

Foi realizada uma análise com o objectivo de comparar a população controlo deste estudo, Caucasiana-Europeia, com outras populações de etnia e localização geográfica tanto semelhantes como diferentes. Os resultados obtidos a partir desta análise comparativa permitem sugerir que a população de indivíduos controlo testada neste estudo apresenta um modelo de distribuição, quer das variantes alélicas, como dos genótipos do gene *NAT2*, idêntico ao padrão característico das populações Caucasianas. O alelo *NAT2*5* apresenta uma frequência de cerca de 42%, sendo o mais comum, e o alelo *NAT2*6* uma frequência de cerca de 28%, tal como se observa nas populações Caucasianas Europeias (Gil *et al.*, 1998; Lemos *et al.*, 1999) e Americanas (Bell *et al.*, 1993;Garte *et al.*, 2001). As diferenças observadas em relação à população Afro-Americana foram também registadas por Bell *et al.* (1993), mostrando a variabilidade étnica e geográfica na distribuição dos polimorfismos da enzima NAT2.

4.2. AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *NAT2* NA SUSCEPTIBILIDADE PARA CANCRO DO COLO DO ÚTERO (ESTUDO CASO CONTROLO)

O vírus HPV é considerado um factor determinante na etiologia do cancro do colo do útero. No entanto, dados epidemiológicos têm sugerido que os carcinogénios parecem

desempenhar uma importante função na progressão das lesões pré-cancerosas do colo do útero para carcinoma invasivo. Tem sido sugerido que factores individuais, para além da infecção por HPV, modelam a susceptibilidade individual para carcinoma do colo do útero (Hemminki *et al.*, 2001). A identificação de subgrupos de susceptibilidade no interior da população geral, baseados nos polimorfismos genéticos, nomeadamente em polimorfismos com conseqüências a nível do metabolismo de carcinogénios, tem o potencial de delinear mais claramente os factores envolvidos nessa predisposição e qual o seu efeito na progressão da doença em alguns indivíduos, mas não em todos.

Uma vez que a enzima NAT2 é codificada por um gene altamente polimórfico e apresenta funções na destoxificação e bioactivação de vários carcinogénios e pré-carcinogénios, realizou-se um estudo com o intuito de avaliar a influência dos polimorfismos genéticos de *NAT2* no risco para desenvolvimento de cancro do colo do útero.

Os resultados obtidos demonstram que existe uma relação entre o genótipo de acetilação *NAT2*6/NAT2*6* e um risco aumentado de carcinoma do colo do útero avançado (Costa *et al.*, 2002). Tem sido demonstrado que este genótipo *NAT2* apresenta menor actividade enzimática outros genótipos de acetilação lentos e genótipos de acetilação rápido (Cascorbi *et al.*, 1995). Indivíduos portadores do genótipo *NAT2*6/NAT2*6* mostram uma menor capacidade de metabolizar substratos carcinogénicos. Isto é consistente com os resultados obtidos, já que mulheres portadoras deste genótipo de acetilação têm um risco três vezes maior para cancro do colo do útero. Foi obtida uma correlação significativa (quadro 3.4) entre a diminuição na frequência do genótipo *NAT2*5/NAT2*6* e cancro do colo do útero. Pode-se considerar que genótipo *NAT2*5/NAT2*6* apresenta uma maior actividade enzimática que o genótipo *NAT2*6/NAT2*6*, podendo representar um genótipo de acetilação com capacidade de

acetilação intermédia. É de salientar, que Cascorbi *et al.* (1995) demonstraram que o alelo *NAT2*6* dá origem a uma capacidade de acetilação menor do que o alelo *NAT2*5*, e que os indivíduos que apresentam o genótipo *NAT2*6/NAT2*6* são os que possuem menor actividade da NAT2.

Dez por cento dos casos de cancro do colo do útero podem ser atribuídos à influência do genótipo de acetilação *NAT2*6/NAT2*6*. A percentagem relativamente baixa de casos de carcinoma do colo do útero que pode ser atribuída ao genótipo *NAT2*6/NAT2*6* pode reflectir o facto do principal factor de risco deste carcinoma ser a infecção por HPV (Haverkos *et al.*, 2000). No entanto, estes resultados demonstram que os factores genéticos poderão desempenhar uma função importante na etiologia do cancro do colo do útero.

4.3. AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NAT2 NA SUSCEPTIBILIDADE PARA CANCRO DA MAMA (ESTUDO CASO CONTROLO)

O carcinoma da mama apresenta entre outros factores de risco a exposição a carcinogénios ambientais ou provenientes da dieta alimentar. Tem sido demonstrado que aminas aromáticas (AAs), por exemplo, provenientes do fumo do tabaco, e heterocíclicas (AHs), presentes em alimentos demasiadamente cozinhados, provocam a formação de aductos de DNA, tendo estes sido observados em tecidos de tumores da mama (Delfino *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 1997). Estes resultados sugerem que estes carcinogénios desempenham um papel na carcinogénese do cancro da mama.

A NAT2 possui uma grande variedade de substratos entre eles as AAs e as AHs. Assim, variações na actividade de metabolização destes carcinogénios, resultantes dos

polimorfismos *NAT2*, poderão representar um factor de susceptibilidade genética para carcinoma da mama. Deste modo, foi desenvolvido um estudo tipo caso controlo para avaliar a associação dos polimorfismos *NAT2* com a susceptibilidade genética para esta neoplasia.

No presente estudo não foi encontrada qualquer relação entre os polimorfismos *NAT2* e risco de cancro da mama. Estes resultados são concordantes com os obtidos por outros grupos de investigação (Delfino *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 1997; Ilett *et al.*, 1990). No entanto, os estudos publicados têm se mostrado muito controversos, havendo estudos que evidenciam associações entre estes polimorfismos e risco de cancro da mama, principalmente quando é considerada a dose de exposição dos doentes a carcinogénios (Deitz *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 1999). Pensa-se que as diferenças nos resultados se possam dever à utilização de populações com diferentes localizações geográficas e com exposição ambiental diversificada.

4.4. AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NAT2 NA SUSCEPTIBILIDADE PARA CANCRO DA PRÓSTATA (ESTUDO CASO CONTROLO)

O desenvolvimento do carcinoma da próstata parecer reflectir um balanço dependente entre hormonas endógenas e influências ambientais, nomeadamente as gorduras alimentares, a ingestão de carne vermelha e demasiadamente cozinhada (Pienta *et al.*, 1993) e a exposição a químicos (Devita *et al.*, 1997). Estes factores têm sido referidos como modificadores do risco de carcinoma da próstata, uma vez que expõem este orgão a variados carcinogénios, entre eles as AHs e os hidrocarbonetos policíclicos (Ross *et al.*, 1994). A enzima NAT2 é responsável pela biactivação ou

inactivação destes carcinogénios, e por isso os polimorfismos *NAT2* representar um potencial factor de susceptibilidade genética para o desenvolvimento de carcinoma da próstata. Este aspecto é reforçado pelo facto do gene *NAT2* localizar-se numa região de frequentes perdas alélicas no carcinoma da próstata (Robbins *et al.*, 1994).

Os resultados deste estudo mostram que o genótipo de acetilação lento *NAT2*6/NAT2*6* funciona como um factor de protecção contra o desenvolvimento de cancro da próstata. A NAT2 além de destoxificar realiza também a biactivação metabólica de determinados carcinogénios, nomeadamente das AHs (Hein *et al.*, 1994). Assim, este resultado é consistente com o facto deste genótipo possuir menor capacidade de activar carcinogénios, o que faz dele um factor de protecção para cancro da próstata.

Outros estudos realizados não se registraram nenhuma associação entre os polimorfismos *NAT2* e uma suscetibilidade para cancro da próstata (Hein *et al.*, 2002; Wadelius *et al.*, 1999). Esta diferença de resultados poderá dever-se a diferenças geográficas e/ou a diferentes hábitos alimentares e exposições ambientais.

Em suma, este estudo permite sugerir um genótipo de acetilação lento *(NAT2*6/NAT2*6)* como factor genético de protecção para carcinoma da próstata, provavelmente reflectindo uma exposição da próstata a carcinogénios específicos.

4.5. AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NAT2 NA SUSCEPTIBILIDADE PARA CANCRO DA CABEÇA E PESCOÇO (ESTUDO CASO CONTROLO)

O cancro da cabeça e pescoço está fortemente correlacionado com factores exógenos, como o fumo do cigarro e o consumo de álcool (Devita *et al.*, 1997), que desempenha uma importante função na etiologia destas neoplasias. Tal como no caso do

carcinoma da próstata, estas neoplasias encontram-se associadas a perdas alélicas na região 8p22 (Snyderman, 2001).

Dada a função desempenhada pela enzima NAT2 e também a sua localização cromossómica, efectuou-se um estudo do tipo caso controlo para avaliar a associação dos polimorfismos *NAT2* com a susceptibilidade genética para cancro da cabeça e pescoço.

Os resultados revelaram que indivíduos portadores do genótipo de acetilação rápido *NAT2*4/NAT2*4* apresentavam um risco duas vezes maior de desenvolvimento de cancro da cabeça e pescoço. Este genótipo está associado a uma elevada capacidade de acetilação em comparação com outros genótipos de acetilação lentos e intermédios (Cascorbi *et al.*, 1995). O cancro da cabeça e pescoço tem sido associado com a exposição a carcinogénios de N-hidroxilamina, sendo estes compostos O-acetilados pela NAT2, resultando em compostos altamente reactivos (Hein *et al.*, 1993). Deste modo, pode-se compreender o risco aumentado para cancro da cabeça e pescoço em indivíduos portadores do genótipo *NAT2*4/NAT2*4*, que mostram uma capacidade de O-acetilação muito mais elevada.

Nove por cento dos casos de cancro da cabeça e pescoço podem ser atribuídos à influência do genótipo de acetilação *NAT2*4/NAT2*4*. Esta percentagem relativamente pequena reflecte de certo modo a possível influência de outros polimorfismos genéticos no desenvolvimento destas neoplasias.

Os resultados publicados na literatura revelam-se bastantes controversos quanto à associação destes polimorfismos com a susceptibilidade para cancro da cabeça e pescoço. Os nossos resultados são concordantes com um outro estudo efectuado em casos de cancro da laringe (Henning *et al.*, 1999). Existem um estudo que associa o fenótipo de acetilação lento com um risco aumentado para cancro da cabeça e pescoço

(Gonzalez *et al.*, 1998). Esta diferença de resultados em vários estudos poderá ser explicada pela exposição dos indivíduos das populações utilizadas a diferentes carcinogénios e também da extensão da exposição, reflexo de diferenças principalmente nos hábitos pessoais (consumo de tabaco e álcool).

Foi observado que o genótipo *NAT2*4/NAT2*5* apresentava-se como um factor protector para cancro da cabeça e pescoço. Este resultado não pode ser explicado pelo efeito dos polimorfismos *NAT2* na actividade de acetilação, uma vez que este genótipo intermédio apresenta actividades semelhantes ao genótipo rápido (*NAT2*4/NAT2*4)* (Cascorbi *et al.*, 1995). Uma vez que é aceite que a neoplasias são resultantes de uma acção genética multifactorial podemos propor a existência de *linkage* dos genótipos *NAT2* com outros genes envolvidos na etiopatologia do cancro.

Considerações Finais e Perspectivas Futuras

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os polimorfismos na enzima NAT2 têm sido vastamente estudados e fortes associações destes com cancro tem sido encontradas. A enzima NAT2 é importante na destoxificação e activação de variados carcinogénios, e os polimorfismos *NAT2* têm demonstrado alterar esta capacidade de metabolização. A compreensão da influência destas variações genéticas do gene *NAT2* na susceptibilidade para cancro poderá contribuir para um melhor esclarecimento do desenvolvimento tumoral de vários tipos de cancros. No presente trabalho foram pesquisados polimorfismos *NAT2* com o objectivo de avaliar a sua influência na susceptibilidade para tumores sólidos. Foram utilizados quatro modelos tumorais que apresentam como factores de risco a exposição a carcinogénios.

As frequências alélicas e genotípicas obtidas na população Caucasiana-Europeia, utilizada como grupo controlo, mostraram-se semelhantes ao padrão característico das populações Caucasianas.

Os resultados obtidos demonstram que alguns genótipos de acetilação conferem aos indivíduos portadores uma susceptibilidade genética para desenvolvimento tumoral. Pela primeira vez, foi registrada uma associação entre um genótipo *NAT2* e um maior risco de desenvolvimento de cancro do colo do útero. Os resultados obtidos apontam para um risco três vezes maior para cancro do colo do útero em mulheres portadoras do genótipo *NAT2*6/NAT2*6* (OR=3,41; 95%IC: 1,34-8,89; p=0,007). A análise efectuada no grupo de casos com cancro da mama demonstrou a falta de correlação entre os polimorfismos *NAT2* e o desenvolvimento deste carcinoma. Foi observado que o genótipo de acetilação lento *NAT2*6/NAT2*6* conferia um risco diminuído para desenvolvimento de carcinoma da próstata (OR=0,33; 95%IC: 0,10-0,98). Por outro lado, os indivíduos

portadores do genótipo de acetilação rápido *NAT2*4/NAT2*4* apresentaram um risco duas vezes acrescido para o desenvolvimento de cancro da cabeça e pescoço (OR=2,64; 95%IC: 1,30-5,36; p=0,003).

Os resultados obtidos neste trabalho poderão contribuir para a definição de um perfil alélico de populações em diferentes localizações geográficas e a compreensão da incidência dos vários tipos de neoplasias no mundo inteiro.

Após a realização destes estudos com o objectivo de associar os polimorfismos *NAT2* e susceptibilidade genética para alguns tipos de tumores sólidos, a próxima etapa será aumentar a amostragem dos casos dos indivíduos com cancro e também da população de indivíduos normais. Isto permitirá a verificação dos resultados até agora obtidos, como também uma maior fiabilidade deles.

Resultados recentes publicados pelo nosso grupo de trabalho (Medeiros *et al*, 2002; Vasconcelos *et al*, 2002) sugerem o papel de outros polimorfismos genéticos na definição de risco para cancro. A determinação de um perfil genético de susceptibilidade para as várias neoplasias poderá ter aplicações importantes no âmbito do rastreio e prevenção do cancro. A caracterização de subgrupos de risco acrescido para cancro poderá levar a uma optimização dos rastreios organizados, direccionando os recursos para determinados grupos populacionais que apresentam características passíveis de uma vigilância mais apertada.

Referências

6. REFERÊNCIAS

Agúndez JAG, Martínez C, Olivera M, Gallardo L, Ladero JM, Rosado C, Prados J, Rodríguez-Molina J, Resel L and Benitez J (1998) Expression in human prostate of drug- and carcinogen- metabolising enzymes: association with prostate cancer risk. British J Cancer, 78: 1361-1367.

Bast RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E (2000) em: Cancer Medicine. 5th edition. Canada - BC Decker Inc.

Bell DA, Taylor JA, Butler MA, Stephens EA, Wiest J, Brubaker LH, Kadlubar FF and Lucier GW (1993) Genotype/phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (NAT2) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans. Carcinogenesis, 14: 1689-1692.

Blum M, Grant DM, McBride W, Heim M and Meyer UA (1990) Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and fuctional expression. DNA & Cell Biol, 9: 193-203.

Blum M, Demierre A, Grant DM, Heim M and Meyer UA (1991) Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. Proc Natl Acad Sci USA, 88: 5237-5241.

Bowden G T and Fischer S M (1997) *Comprehensive Toxicology – 13 Volume Set.* 1stedition. Volume 12 – Chemical Carcinogens and Anticarcinogens. Elsevier Science.

Breast, em: American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual (1997). 5th edition. New York, Lippincott-Raven Publishers.

Butcher NJ, Boukouvala S, Sim E and Minchin RF (2002) Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases. Pharmacogenomics J, 2: 30-42.

Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmöller J, Maurer A, Sperling K and Roots J (1995) Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity, Am J Hum Genet, 57: 581-592.

Chen J, Stampfer M J, Hough H L, Garcia-Closas M, Willett W C, Hennekens C H, Kelsey K T and Hunter D J (1998). A prospective study of N-acetyltransferase genotype, red meat intake, and risk of colorectal cancer. Cancer Res, 58: 3307-3311.

Costa S, Medeiros R, Vasconcelos A, Pinto D e Lopes C (2002) A slow acetylator genotype associated with an increased risk of advanced cervical cancer. Para publicação em J. of Cancer Research and Clinical Oncology.

Deguchi T, Mashimo M and Suzuki T (1990) Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine N-acetyltransferase in human liver. J Biol Chem, 265: 12757-12760.

Deitz AC, Zheng W, Leff MA, *et al.* (2000) N-acetyltransferase-2 genetic polymorphism, well-done meat intake and breast cancer risk among postmenopausal women. Cancer Epidem Biom and Prev, 9: 905-910.

Delfino RJ, Sinha R, Smith C *et al.* (2000) Breast cancer, heterocyclic aromatic amines from meat and N-acetyltransferase 2 genotype. Carcinogenesis, 21: 607-615.

Devita VT, Hellman S and Rosenberg SA (1997) em: Cancer: Principles and Practice of Oncology. 5th edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Evans DA (1989) N-acetyltransferase. Pharmacol Therapeut, 42: 157-234.

Filiadis IF, Georgiou I, Alamanos Y, Kranas V, Giannakopoulos X and Lolis D (1999) Genotypes of N-acetyltransferase-2 and risk of bladder cancer: a case-control study. J Urol, 161: 1672-1675.

Fretland AJ, Leff MA, Doll MA and Hein DW (2001) Functional characterization of human N-acetyltransferases 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms, Pharmacogenetics, 11: 207-215.

Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK *et al.* (2001) Metabolic gene polymorphisme frequencies in control populations. Cancer Epidem Biom and Prev, 10: 1239-1248.

Gil JP and Lechner MC (1998) Increased frequency of wild-type arylamine-N-acetyltransferase allele NAT2*4 homozygotes in Portuguese patients with colorectal cancer. Carcinogenesis, 19: 37-41.

Globocan 2000, IARC, Lyon 2001.

González MV, Alvarez V, Pello MF, Menéndez MJ, Suárez C, Coto E (1998) Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase-M1, and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to head and neck cancer. J Clin Pathol 51:294-298.

Grant DM, Blum M, Demierre A and Meyer UA (1989) Nucleotide sequence of an intronless gene for a human arylamine N-acetyltransferase related to polymorphic drug acetylation. Nucl Acids Res, 17: 3978.

Grant DM, Hughes NC, Janezic SA, Goodfellow GH, Chen HJ, Gaedigk A *et al.*(1997) Human acetyltransferase polymorphisms. Mutat Res, 376: 61-70.

Goodfellow GH, Dupret DM and Grant DM (2000) Identification of amino acids imparting acceptor substrate selectivity to human arylamine acetyltransferases NAT1 and NAT2. Biochem J, 348: 159-166.

Haverkos H, Rohrer M, Pickworth W (2000) The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial. Biomed Pharmacother 54:54-59.

Head and Neck, em: American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual (1997). 5th edition. New York, Lippincott-Raven Publishers.

Hein DW (1988) Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. Biochem Biophys Acta, 948: 37-66.

Hein DW, Rustan TD and Grant DM (1992) Human liver polymorphic (NAT2) and monomorphic (NAT1) N-acetyltransferase isozymes catalyse metabolic activation of N-hydroxyarilamine and N-hydroxy-N-acetyl-arylamine proximate carcinogens. FASEB J, 6 : A1274.

Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Gray K, Feng Y, Ferguson RJ *et al.* (1993) Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. Carcinogenesis, 14: 1633-1638

Hein DW, Rustan TD, Ferguson RJ, Doll MA and Gray K (1994) Metabolic activation of aromatic and heterocyclic N-hydroxyarylamines by wild-type and mutant recombinant human NAT1 and NAT2 acetyltransferases. Arch Toxicol, 68: 129-133.

Hein DW, Ferguson RJ, Doll MA, Rustan TD and Gray K (1994) Molecular genetics of human polymorphic N-acetyltransferase: enzymatic analysis of 15 recombinant wild-type mutant and chimeric NAT2 allozymes, Human Mol Genet, 3: 729-734.

Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Leff MA, Webb SJ, Xiao GH, Devanaboyna US, Nangju NA and Feng Y (2000) Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. Cancer Epidem Biom and Prev, 9: 29-42.

Hein DW, Grant DM and Sim E (2000) Update on consensus arylamine N-acetyltransferase gene nomenclature. Pharmacogenetics, 10: 291-292.

Hein DW, Leff MA, Ishibe N, Sinha R, Frazier HA, Doll MA, Xiao GH, Weinrich MC and Caporaso NE (2002) Association of prostate cancer with rapid N-acetyltransferase 1 (NAT1*10) in combination with slow N-acetyltransferase 2 acetylator genotypes in a pilot case-control study. Environm Mol Mutagenesis, 40: 161-167.

Hengstler JG, Araud M, Herrero ME and Oesch F (1998) Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. Recent Results in Cancer Res, 154: 47-85.

Henning S, Cascorbi I, Münchow B, Jahnke V and Roots I (1999) Association of arylamine N-acetyltransferases NAT1 and NAT2 genotypes to laryngeal cancer risk. Pharmacogenetics, 9: 103-111.

Hickman D and Sim E (1991) N-acetyltransferase polymorphism. Comparison of genotype and phenotype. Biochem Pharmacol, 42: 1007-1014.

Huang C, Chern H, Shen C, Hsu S and Chang K (1999) Association between N-acetyltransferase 2 (NAT2) genetic polymorphism and development of breast cancer in post-menopausal Chinese women in Taiwan, an area of great increase in breast cancer incidence. Int. J. Cancer, 82: 175-179.

Hubbard AL, Harrison DJ, Moyes C, Wyllie AH, Cunningham C, Mannion E and Smith CAD (1995) N-Acetyltransferase 2 genotype in colorectal cancer and selective gene retention in cancers with chromosome 8p deletions. Gut, 41: 229-234.

Hunter DJ, Hankinson SE, Hough H, *et al.*. (1997) A prospective study of NAT2 acetylation genotype, cigarette smoking, and risk of breast cancer. Carcinogenesis, 18: 2127-2132.

Kiviat NB, Critchlow CW Kurman RJ (1992) Reassessment of the morphological continuum of cervical intraepithelial lesions: does it reflect different stages in the progression to cervical carcinoma? em: IARC Sci Publ. Lyon, France, pp59-66.

Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, Angstrom T and Dillner J (2000) Smoking, diet, pregnancy and oral contractive use as risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. Br J Cancer 82:1332-1338.

Lemos MC, Cabrita FJ, Silva HA, Vivan M, Plácido F and Regateiro FJ (1999) Genetic polymorphism of CYP2D6, GSTM1 and NAT2 and susceptibility to haematological neoplasias. Carcinogenesis, 20: 1225-1229.

Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller WD and Weidauer H (1992) Tobacco, alcohol and the risk of head and neck cancer. Clin Invest, 70: 320-327.

Maier H, Dietz A, Gewelke U and Heller WD (1991) Occupational exposure to hazardous substances and risk of the oral cavity, hypopharynx and larynx. Laryngol Rhinol Otol, 70: 93-98.

Martin A-M and Weber BL (2000) Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. J Natl Cancer Inst, 92: 1126-1135.

Matas N *et al.*(1997) Mapping AAC1, AAC2 and AACP, the genes for arylamine N-acetyltransferases, carcinogen metabolising enzymes on human chromosome 8p22, a region frequently deleted in tumours. Cytogenet Cell Genet, 77: 290-295.

Medeiros R, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Oliveira J, Lopes C (2002) Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Genetic Susceptibility to Prostate Cancer. Eur J Cancer Prev, 11: 343-350.

Meyer UA, Zanger UM (1997) Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. Annu Rev Pharmacol Toxical, 37 : 269-296.

Muscat J and Wynder E (1992) Tobacco, alcohol, asbestos and occupational risk factors for laryngeal cancers. Cancer, 69: 2244-2251.

Newman B etal (1998) Frequency of breast cancer attributable to BRCA1 in a population-based series of Americam Women. J Am Med Assoc, 279: 915-921.

Okkels H, Sigsgaard T, Wolf A and Autrup H (1997) Arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) polymorphisms in susceptibility to bladder cancer: the influence of smoking. Cancer Epidemiol Biomark Prev, 6: 225-231.

Payton M (2000) The first 3D structure of arylamine N-acetyltransferase reveals a protease-like catalytic triad. Trends Pharmacol Sci, 21: 329-330.

Perera F (1996) Molecular Epidemiology: insights into Cancer Susceptibility, Risk Assessment and Prevention. J. Natl. Inst, 88: 496-509.

Pienta KJ and Esper PS (1993) Risk factors for prostate cancer. Ann Intern Med, 118: 793-803.

Probst-Hensch N M, Haile R W, Ingles S A, Longnecker M P, Han C, Lin B K, Lee D B, Sakamoto G T, Franki H D, Lee E R and Lin H J (1995) Acetylation Polymorphisms and Prevalence of Colorectal Adenomas. Cancer Res, 55: 2017-2020.

Radiumheit (1979) Annual report on the results of treatment in carcinoma of the uterus, vagina and ovary. In: International Federation of Gynaecology and Obstetrics. Sweden, volume Ib.

Robbins SL, Cotran RS, Kuman V and Collins T (1994) in Pathologic Basis of Disease. 5th edition. WB Saunders Company.

Roberts-Thomson IC, Ryan P, Khoo KK, Hart WJ, McMichael AJ and Butler RN (1996) Diet, acetylator phenotype, and risk of colorectal neoplasia. Lancet, 347: 1372-1374.

Rodrigues-Lima F and Dupret J-M (2002) 3D model of human arylamine N-acetyltransferase 2: structural basis of the slow acetylator phenotype of the R64Q variant and analysis of the active-site loop. Biochem Biophys Res Comm, 291: 116-123.

Ross RK and Henderson BE (1994) Do diet and androgens alter prostate cancer risk via a common etiologic pathway? J Natl Cancer Inst, 86: 252-254.

Rychter MD, Land SJ and King CM (1999) Histological localization of acetyltransferases in Human tissue. Cancer Letters, 143: 99-102.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, Stantor CK, Manos MM (1993) Epidemiologic evidence showing that Human Papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. J Natl Cancer Inst 85: 958-964.

Sim E, Payton M, Noble M and Minchin R (2000) An update on genetic, structural and functional studies of arylamine N-acetyltransferases in eucaryotes and prokaryotes. Human Mol Genet, 9: 2435-2441.

Sinclair JC, Sandy J, Delgoda R, Sim E and Noble ME (2000) Struture of arylamine N-acetyltransferase reveals a catalytic triad. Nat Struct Biol, 7: 560-564.

Smith CAD, Smith G and Wolf CR (1994) Genetic polymorphisms in xenobiotic metabolism. Eur J Cancer, 30A : 1921-1935.

Snyderman CA (2001) Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: Window to the biology of disease. Head and Neck: 238-252.

Tsuneizumi M, Emi M, Hiramo A, *et al.* (2002) Association of allelic loss at 8p22 with poor prognosis among breast cancer cases treated with high-dose adjuvant chemotherapy. Cancer Letters, 180: 75-82.

Vasconcelos A, Medeiros R, Veiga I, Pereira D, Lélis A, Carrilho S, Palmeira C, Lisboa S, Sanches E, Azevedo C, Lopes C (2002) Analysis of Estrogen Receptor Polymorphism in Codon 325 by PCR-SSCP in Breast Cancer: Association with Lymph Node Metastasis. The Breast Journal, 4:226-229.

Vatsis KP, Martell KJ and Weber WW (1991) Diverse point mutations in the human gene for polymorphic N-acetyltransferase. Proc Natl Acad Sci USA, 88: 6333-6337.

Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM and Hong WK (1993) Head and neck cancer. N Engl J Med, 328: 184-194.

Wadelius M, Autrup JL, Stubbins MJ, Andersson S-O *et al.* (1999) Polymorphisms in NAT2, CYP2D6, CYP2C19 and GSTP1 and their association with prostate cancer. Pharmacognetics, 9: 333-340.

Weber Band Nathanson K (2000) Low penetrance genes associated with increased risk of breast cancer. Eur J Cancer, 36: 1193-1199.

Windmill KF, Gardigk A, Hall PM, Samaratunga H, Grant DM and McManus ME (2000) Localizatio of N-acetyltransferases NAT1 e NAT2 in Human tissues. Toxicol Sciences, 54: 19-29.

Anexos

7. ANEXOS

7.1. ANEXO I

Soluções

- PBS ("Phosphate buffered saline")

Na_2HPO_4 1,48 g/l (Merck 1065860500)
NaH_2PO_4 0,495 g/l (Merck 63460500)
NaCl 7,2 g/l(Panreac cod131659)

- AKE

NH_4Cl 82,9 g/l (Merck 101146)
$KHCO_2$ 10 g/l (Merck 48540500)
EDTA 0,37 g/l (Merck 108418)

- SE

NaCl 75mM (Panreac cod131659)
EDTA 25mM (Merck 108418)

- Tampão de reacção de PCR (MBI Fermentas)

750 mM Tris HCl (pH= 8,8)
200 mM $(NH_4)_2SO_4$
0,1% Tween 20

- Tampão TBE 10x

Tris base 109 g/l (Merck)
Ácido bórico 55,5 g/l (Merck)
EDTA 9,3 g/l (Merck 108418)

7.2. ANEXO II

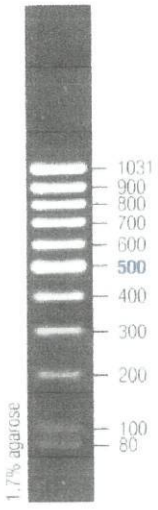


Figura A – Marcador de 100 bp utilizado no presente trabalho (gel de agarose 1,7% corado com brometo de etídeo) (MBI Fermentas #SM0241).

7.3. ANEXO III

Provas do artigo intitulado **"A Slow Acetylator Genotype Associated with an Increased Risk of Advanced Cervical Cancer"**, em fase de publicação na revista *Journal of cancer Research and Clinical Oncology*.

Journal of Cancer Research and Clinical Oncology
DOI 10.1007/s00432-002-0391-9

Original Paper

A slow acetylator genotype associated with an increased risk of advanced cervical cancer

Sandra Costa(✉) · Rui Medeiros · André Vasconcelos · Daniela Pinto · Carlos Lopes

S. Costa · R. Medeiros · A. Vasconcelos · D. Pinto · C. Lopes
Unit of Molecular Oncology, Portuguese Institute of Oncology, Laboratórios - Piso 4, Rua Dr. Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto, Portugal

✉ E-mail: sandracostas@hotmail.com
Phone: +351-22-5502011
Fax: +351-22-5026489

Received: 14 May 2002 / **Accepted:** 19 September 2002 / **Published online:**

Abstract

Purpose. Human papillomavirus (HPV) is the major etiological agent associated with cervical cancer. However, other risk factors have been indicated, including carcinogen exposure, oral contraceptive usage, certain nutritional deficiencies, and genetic factors. N-acetyltransferase 2 (NAT2) has an important role in the metabolism of several carcinogens. NAT2 polymorphism modulates the activity of the enzyme, by activation, via O-acetylation, or through detoxification, via N-acetylation. This case-control study was designed to evaluate the association between NAT2 polymorphism and genetic susceptibility to cervical cancer.

Methods. Genomic DNA was obtained from 125 women with advanced cervical cancer and 170 healthy women. PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms) was used to analyse two common mutant alleles at NAT2 loci.

Results. The *NAT2*6/NAT2*6* genotype, which corresponds to a slow acetylator genotype, was found to be associated with a 3.41-fold (95% CI: 1.35-8.94; P= 0.007) increase in the risk of cervical cancer. For the entire case groups the proportion of cervical cancer cases attributable (attributable proportion) to the *NAT2*6/NAT2*6* genotype was 10.2%.

Conclusions. The results reported in this study suggest that NAT2 polymorphism is a genetic susceptibility factor involved in the carcinogenesis of cervical cancer, and also that the analysis of the allelic profile of populations in different geographic locations may help to understand the incidence of cervical cancer worldwide.

Keywords. NAT2 - Acetylation genotype - Cervical cancer - Carcinogens

Introduction

Epidemiological and clinical data suggest that human papillomaviruses (HPV), especially HPV-16 and HPV-18 (high-risk HPV), play the major role in the aetiology of cervical cancer. However, some researchers acknowledge that HPV is a necessary factor but not a sufficient one in the aetiology of cervical cancer (Haverkos et al. *2000*). Other risk factors of cervical cancer have been reported, such as carcinogen exposure, parity, and certain nutritional deficiencies (Brinton et al. *1992*; Haverkos et al. *2000*; Kjellberg et al. *2000*). Oral contraceptive usage has also been reported as a risk factor (Kjellberg et al. *2000*). However, we may consider oral contraceptive use as a marker for sexual activity, which per se is a risk factor (Biswas et al. *2000*; Rousseau et al. *2000*). It is unclear whether the association of these environmental factors with cervical cancer reflects secondary associations also attributable to infection, or if they are independent risk factors, or even if they act as cofactors of HPV infection in induction of cervical carcinogenesis (Winkelstein et al. *1990*; Brinton et al. *1992*; Hoffmann et al. *1997*; Kjellberg et al. *2000*).

In the natural history of cervical cancer it is generally accepted that there is a continuum in the passage from normal cervix infected by HPV, to low-grade SIL (squamous intraepithelial lesions) through high-grade SIL, and ending in invasive cervical cancer. However, it has been demonstrated that many high-risk HPV-infected SIL lesions spontaneously regress (Kiviat et al.*1992*; Holowaty et al. *1999*). This is consistent with the hypothesis that, besides HPV, there may be other cervical carcinoma risk factors that include environmental and immunological parameters, and genetic factors (Kiviat et al. *1992*; Holowaty et al. *1999*).

The susceptibility to cancer is variable between individuals. The role of genetic polymorphisms in the individual's susceptibility to cervical cancer is currently under evaluation (Kim et al. *2000*; Anderson et al. *2001*; Goodman et al. *2001*). The determination of a genetic profile may help to explain the observation that not all high-risk HPV-infected SIL lesions will progress to invasive carcinomas. The role of several carcinogenic compounds in the progression of cancer has been suggested (Stoner et al. *2001*; Van Zandwijk et al. *2001*; De Bruin et al. *2002*). It is reasonable to consider that each population has to evaluate its own genetic profile of cancer risk that may help us to understand the geographic and racial differences for cervical cancer incidence.

N-acetyltransferase (NAT) activity is an important biological process, because it transfers acetyl-CoA to the amino (or hydroxyl) side chain of arylamines converting them to unstable electrophiles. N-acetyltransferase 2 (NAT2) is able to perform N-acetylation of several arylamines, such as aromatic amines, a detoxification step, and O-acetylation of heterocyclic amines (HAA), resulting in bioactivation (Bell et al. *1993*). The polymorphic NAT2 gene is one of two functional human arylamine N-acetyltransferases. This gene has been assigned to chromosome 8p21.3-23.1 (Hickman et al. *1994*); it contains an 879-base pairs intronless protein-coding region. The genetic acetylation polymorphism influences both the metabolic activation (O-acetylation) and the deactivation (N-acetylation) of arylamines carcinogens via variable expression of different allelic variants of *NAT2* gene (Hein et al. *1993*), conferring differential susceptibility to tumors induced by carcinogens. This polymorphism determines the so-called rapid or slow acetylator phenotypes (Blum et al. *1990*). It has been shown that individuals carrying two allelic variants have a slow acetylator phenotype, whereas heterozygous and homozygous wild-type genotypes have a rapid acetylator phenotype (Vatsis et al. *1991*; Bell et al. *1993*). Many reports have shown the influence of acetylation polymorphism in the development of several types of cancer. Slow acetylators have been associated with increased risk of bladder cancer (Brockmöller et al. *1996*; Hsieh et al. *1999*; Marcus et al. *2000*), which may be due to decreased ability to detoxify carcinogens. On the other hand, rapid acetylators have been shown to

increase the risk of colorectal cancer (Probst-Hensh et al. *1995*; Roberts-Thomson et al. *1999*; Gil et al. *1998*). Such apparent contradictions may be explained by an increased bioactivation of HAAs, via O-acetylation, in colorectal cancer (Probst et al. *1992*). The association between NAT2 polymorphism and genetic susceptibility to cervical cancer has not yet been studied.

In the present work, the NAT2 genotype distributions were analysed in a group of 125 women with cervical cancer and a group of 170 healthy women. The aim of our study was to determine if the NAT2 acetylation genotype was associated with genetic susceptibility to cervical cancer.

Patients and methods

Patients

We tested the association between *NAT2* polymorphism and risk of cervical cancer using a case-control design. One hundred and twenty-five patients with histologically confirmed invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix at an advanced clinical stage, were selected for this study. Patients were admitted to the Portuguese Oncology Institute-Porto, in the North Portugal area, during the period from 1997 to 1999. All patients had stage III cervical carcinoma according to the staging system of the International Federation of Gynaecology classification (FIGO) (Radiumheit *1979*). The median age of the patients was 59 years (standard deviation 10.5). All patients received radiation therapy and all blood samples were collected before treatment. The control group consisted of one hundred and seventy healthy women, with a median age of 52 years, who did not present a clinical history of cancer, and who came from the same geographic area as the cancer group. Informed consent was obtained from each patient and healthy individuals.

Polymerase chain reaction /restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) analysis

DNA was extracted from leukocytes of peripheral blood by proteinase K/chloroform/isopropanol treatment (Müllenbach et al. *1989*). Genotyping for NAT2 was carried out using the PCR-RFLP method (González et al. *1998*). The PCR reactions consisted of nearly 0.2 µg of genomic DNA, 30 p mol of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 × *Taq* buffer, and 1 U of *Taq*

DNA-polymerase to a final volume of 50 µl. Thirty cycles were performed, consisting of 98 °C (30 s) for denaturation, 62 °C (1 min) for primer annealing, and 72 °C (1 min) for primer extension. After amplification, 15 µl of PCR were digested with 20 U of the *Kpn* I and *Taq* I restriction enzymes (positions 480 and 590), specific for the two different NAT2 allelic variants to be screened (*NAT2*5* and *NAT2*6,* respectively). Restriction enzyme digestions were performed according to standard supplier protocols (Life Technology). Restriction products were submitted to electrophoresis in 2% agarose gels. After digestion with *Kpn* I, the 481-T (*NAT2*5*) and 481-C (*NAT2*4*) alleles were visualized as fragments of 290 bp and 170 plus 120 bp, respectively (Fig. 1A). The 590-A (*NAT2*6*) and 590-G (*NAT2*4*) alleles were visualized as fragments of 290 and 230 plus 60 bp, respectively, after digestion with *Taq* I (Fig. 1B).

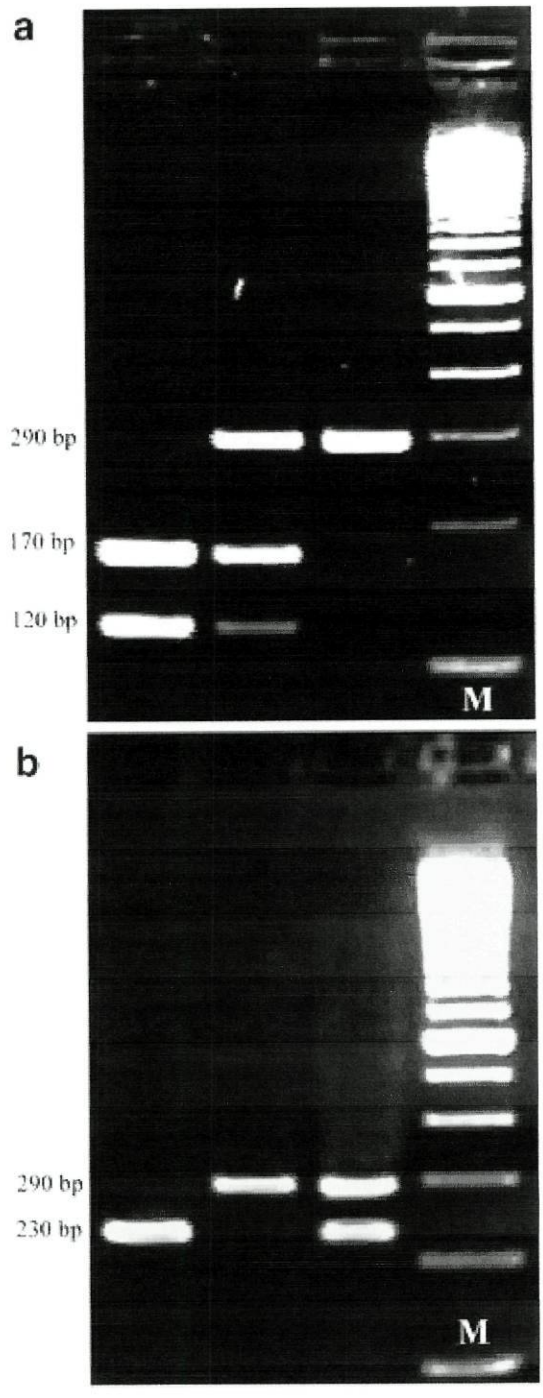


Fig. 1A,B. Restriction fragment length polymorphisms of the PCR products of the NAT2 alleles. **A** Kpn I restriction: 290 bp fragment - NAT2*5 allele; 170 bp plus 120 bp fragments - NAT2*4 allele. **B** Taq I restriction: 290 bp fragment - NAT2*6 allele; 230 bp plus 60 bp fragments (not visualised) - NAT2*4 allele. (M- 100 bp ladder)

Statistical analysis

Analysis of data was performed using the computer software EpiInfo6 (approved by WHO). Chi-square (χ^2 test) analysis, after Yates correction, was used to compare categorical variables. A 5% level of significance was used in the analysis. The odds ratio (OR) and its 95% confidence interval was calculated to measure the association between *NAT2*6/NAT2*6* alleles and cervical cancer.

We calculated the attributable proportion (AP), according to the method previously reported by Schiffman et al. (Schiffman et al. *1993*), using the following formula: AP= PRF × (1-1/RR). The attributable proportion (AP) is the fraction of disease attributable to the risk factor; PRF is the percentage of the risk factor in case subjects and RR is the relative risk calculated by the odds ratio.

Results

The distribution of NAT2 genotypes of the group of patients and healthy individuals is given in Table 1. We observed that the frequency of the *NAT2*6/NAT2*6* genotype was higher in the cervical cancer group compared with the control group. A threefold increase in risk of cervical cancer was found among women who are carriers of *NAT2*6/NAT2*6* genotype (OR= 3.41; 95% CI: 1.35-8,94; $p_{Yates} = 0.007$). *NAT2*6/NAT2*6* genotype was found in 14.4% of case and in 4.7% of controls.

Table 1. Comparison of NAT2 genotype frequencies for cervical cancer and the normal control group

NAT2 genotype	Patients		Controls		OR (95% CI)	P^a
	n	%	*n*	%		
*NAT2*4/NAT2*4*	14	11.2	11	6.5	1.82 (0.75-4.49)	0.219
Others	111	88.8	159	93.5	1.00 (reference)	
*NAT2*4/NAT2*5*	35	28.0	48	28.2	0.99 (0.74-1.34)	0.931
Others	90	72.0	122	71.2	1.00 (reference)	
*NAT2*4/NAT2*6*	17	13.6	27	15.9	0.83 (0.41-1.68)	0.587
Others	108	86.4	143	84.1	1.00 (reference)	
*NAT2*5/NAT2*6*	17	13.6	40	23.5	0.51 (0.26-0.99)	0.047
Others	108	86.4	130	76.5	1.00 (reference)	
*NAT2*5/NAT2*5*	24	19.2	36	21.2	0.88 (0.48-1.64)	0.787
Others	101	80.8	134	78.8	1.00 (reference)	
*NAT2*6/NAT2*6*	18	14.4	8	4.7	3.41 (1.34-8.89)	0.007
Others	107	85.6	162	95.3	1.00 (reference)	

[a] χ^2 test after Yates correction

A comparison of genotype frequencies from our control population with a Caucasian-American population (Bell et al. *1993*), is shown in Table 2. Our results regarding the normal controls are consistent with a previously reported study (Bell et al. *1993*). No significant differences were found in the frequencies of NAT2 genotypes between our normal control population and the Caucasian-American population. However, significant differences were found between our normal control population and the African-American population previously reported (Bell et al. *1993*), regarding the *NAT2*4/NAT2*4* genotype frequency (6.5% versus 17.8%, *P*=0,007) and *NAT2*5/NAT2*5* genotype frequency (21.2% versus 9.9%, *P*=0.026).

Table 2. Comparison of NAT2 genotype frequencies among our control group and Caucasian-American and African-American populations (Bell et al. *1993*)

NAT2 genotype	Controls		Caucasian-American		P^a	African-American		P^a
	n	%	*n*	%		*n*	%	
*NAT2*4/NAT2*4*	11	6.5	23	6.5	0.853	18	17.8	0.007
*NAT2*4/NAT2*5*	48	28.2	80	22.5	0.189	29	28.8	0.956
*NAT2*4/NAT2*6*	27	15.9	56	15.8	0.923	18	17.8	0.806
*NAT2*5/NAT2*6*	40	23.5	87	24.5	0.892	16	15.8	0.131
*NAT2*5/NAT2*5*	36	21.2	78	22.0	0.925	10	9.9	0.026
*NAT2*6/NAT2*6*	8	4.7	31	8.7	0.142	10	9.9	0.159

[a] χ^2 test after Yates correction

For the entire case group the proportion of cervical cancer cases attributable (attributable proportion) to the *NAT2*6/NAT2*6* genotype was 10.2%.

Discussion

Human papillomavirus is involved in the aetiology of cervical cancer. However, epidemiological data suggests that carcinogens may have an important role in the progression of cervical pre-cancerous lesions to advanced cervical cancer. It has been suggested that host factors, behind HPV infection, modulate an individual's response to cervical cancer (Hemminki et al. *2001*). Identification of susceptible subsets of the population, based on genetic polymorphisms, involved in carcinogenesis, has the potential to delineate more clearly those factors that might increase cancer risk and progression among some, but not all, individuals.

The NAT2 enzyme is involved in the phase II of xenobiotic metabolism. It is able to bioactivate and detoxify carcinogens and/or pre-carcinogens (Hein et al. *2000*a). The acetylation polymorphism interferes in NAT2 enzymatic activity, and it has been reported to confer genetic susceptibility to various types of cancer (Roberts-Thomson et al. *1999*; Hein et al. *2000*b; Bouchardy et al. *2001*; Cascorbi et al. *2001*).

Up to now, more than 25 alleles have been identified in the *NAT2* gene (Hein et al. *2000*a). The *NAT2*5* and *NAT2*6* mutant allele appear to be of key importance in determining the acetylator phenotype (Blum et al. *1991*). The analysis of allelic variants at these coding regions of the *NAT2* gene has identified the majority of the defective alleles in Caucasians (Cascorbi et al.*1995*; Agúndez et al.

1996), and also in a Portuguese population (Gil et al. *1998*).

The comparison of genotype frequencies from our control population with those of the Caucasian-American population (Bell et al. *1993*) did not show any significant differences. Moreover, the genotype frequencies of our control group differ significantly from that of the African-American population (Bell et al. *1993*). These results suggest a Caucasian pattern regarding the distribution of NAT2 genotypes in our control group.

Our results demonstrate a relationship between the slow NAT2 acetylator genotype *NAT2*6/NAT2*6* and increased risk of advanced cervical carcinoma. It is well known that this slow acetylator genotype presents lower enzyme activity than the "rapid" genotypes and the *NAT2*5* "slow" genotype (Cascorbi et al. *1995*). Individuals that present this (*NAT2*6/NAT2*6*) genotype show a lower capacity to metabolise carcinogens. Moreover, if individuals carrying this genotype have a lower capacity to detoxify carcinogens, this is consistent with the fact that *NAT2*6/NAT2*6* genotype carriers have a threefold increase of cervical cancer risk. Interestingly, we find a significant correlation (Table 1) between a decreased incidence of *NAT2*5/NAT2*6* genotype and cervical cancer. We may consider that *NAT2*5/NAT2*6* genotype has a significantly higher activity than *NAT2*6/NAT2*6* genotype and may represent a mean intermediate NAT activation. Notably, Cascorbi et al. (Cascorbi et al. *1995*) demonstrate that *NAT2*6* allele codes for lower acetylation capacity than *NAT2*5* allele, and that *NAT2*6/NAT2*6* genotypes were less active. Therefore, we consider a group with very low NAT2 activity in contrast with another group with intermediate or higher NAT2 activity. Ten percent of cases could be attributed to the influence of *NAT2*6/NAT2*6* genotype. The relatively low percentage of cases of cervical cancer that could be attributable to *NAT2*6/NAT2*6* genotype reflect the fact that the major risk factor of cervical cancer is HPV infection (Haverkos et al. *2000*). However, these results also show that genetic factors are important in the aetiology of cervical cancer.

NAT2 polymorphism has been one of the most intensively investigated metabolic polymorphisms, but its association with cervical cancer has not been reported. Moreover, it has been established that carcinogens, such as those in cigarette smoke, play an important role in the aetiology of cervical cancer (Winkelstein et al. *1990*; Szarewski et al. *1996*; Hoffman et al. *1997*; Haverkos et al. *2000*; Kjellberg et al. *2000*). Our findings show that the *NAT2*6/NAT2*6* slow acetylator genotype modulates genetic susceptibility to advanced cervical cancer. Furthermore, it is not easy to evaluate the role of environmental carcinogens in the risk of cervical cancer because of their multiplicity and low-level exposure. The study of NAT2 allelic profile in populations with a lower incidence of cervical cancer could help to clarify the real meaning of this polymorphism in cervical cancer risk (Menczer et al. *2000*). The analysis of genetic factors that are involved in the metabolism of carcinogens may be important for a better understanding of cervical cancer progression and of the different patterns of cervical cancer incidence among populations in various geographic locations.

Acknowledgments. The authors would like to thank Alexander Kilpatrick for critical reading of the manuscript. We gratefully acknowledge the funding of this work by the Ministry of Health of Portugal (Ministério da Saúde CFICS-226/2001).

References

Agúndez JAG, Olivera M, Martínez C, Ladero JM, Benítez J (1996) Identification and prevalence study of 17 allelic variants of the human NAT2 gene in a white population. Pharmacogenetics 6:423-428

Anderson S, Rylander E, Strand A, Sallstrom J, Wilander E (2001) The significance of p53 codon 72 polymorphism for the development of cervical adenocarcinoma. Br J Cancer 85:1153-1156

Bell DA, Taylor JA, Butler MA, Stephens EA, Wiest J, Burbaker LH, Kadlubar FF, Lucier GW (1993) Genotype/phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (NAT2) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans. Carcinogenesis 14:1689-1692

Biswas A (2000) Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. J Indian Med Assoc 98:53-55

Blum M, Grant DM, McBride W, Heim M, Meyer UA (1990) Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization and functional expression. DNA Cell Biol 9:193-203

Blum M, Demierre A, Grant DM, Heim M, Meyer UA (1991) Molecular mechanisms of slow acetylation of drugs and carcinogens. Proc Natl Acad Sci USA 88:5237-5241

Bouchardy C, Benhamou S, Jourenkova N, Dayer P, Hirvonen A (2001) Metabolic genetic polymorphisms and susceptibility to lung cancer. Lung Cancer 32:109-112

Brinton LA (1992) The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. In: Munõz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus (eds) A epidemiology of cervical cancer - overview. IARC, Lyon, France, pp 3-22

Brockmöller J, Cascorbi I, Kerb R and Roots I (1996) Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. Cancer Res 56:3915-3925

Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmöller J, Maurer A, Sperling K, Roots I (1995) Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. Am J Hum Gene 57:581-592

Cascorbi I, Roots I, Brockmoller J (2001) Association of NAT1 and NAT2 polymorphisms to urinary bladder cancer: significantly reduced risk in subjects with NAT1*10. Cancer Res 61:5051-5056

De Bruin LS, Josephy PD (2002) Perspectives on the chemical etiology of breast cancer. Environ Health Perspect 110S1:119-128

Gil JP, Lechner MC (1998) Increased frequency of wild-type arylamine-N-acetyltransferase allele NAT2*4 homozygotes in Portuguese patients with colorectal cancer. Carcinogenesis 19:37-41

González MV, Alvarez V, Pello MF, Menéndez MJ, Suárez C, Coto E (1998) Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase-M1, and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to head and neck cancer. J Clin Pathol 51:294-298

Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, Bertram CC, Wilkens LR, Guo C, Seifried A, Killeen J, Le Marchaud L (2001) CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and the risk of cervical squamous intraepithelial lesions in a multiethnic population. Gynecol Oncol 81:263-269

Haverkos H, Rohrer M, Pickworth W (2000) The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial. Biomed Pharmacother 54:54-59

Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Gray K, Feng Y, Ferguson RJ, Grant DM (1993) Metabolic activation and desactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. Carcinogenesis 14:1633-1638

Hein DW, Grant DM, Sim E (2000a) Update on consensus arylamine N-acetyltransferase gene nomenclature. Pharmacogenetics 10:291-292

Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Leff MA, Webb SJ, Xiao GH, Devanaboyina US, Nangju NA, Feng Y (2000b) Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 9:29-42

Hemminki K, Li X, Mutanen P (2001) Familial risks in invasive and in situ cervical cancer by histological type. Eur J Cancer Prev 10:83-89

Hickman D, Risch A, Buckle V, Spurr NK, Jeremiah SJ, McCarthy A, Sim E (1994) Chromosomal localization of human genes for arylamine N-acetyltransferase. Biochem J 297:441-445

Hoffmann D, Hoffmann I (1997) The changing cigarette. J Toxicol Environ Health 50:307-364

Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T (1999) Natural history of dysplasia of the uterine cervix. J Natl Cancer Inst 91:252-258

Hsieh F-I, Pu Y-S, Chern H-D, Hsu L-I, Chiou H-Y, Chen C-J (1999) Genetic polymorphisms of N-acetyltransferase 1 and 2 and risk of cigarette smoking-related bladder cancer. Br J Cancer 81:537-541

Kim JW, Lee CG, Park YG, Kim KS, Kim IK, Sohn JW, Min HK, Lee JM, Namkoong SE (2000) Combined analysis of germline polymorphisms of p53, GSTM1, GSTT1, CYP1A1, and CYP2E1 relation to the incidence rate of cervical carcinoma. Cancer 88:2082-2091

Kiviat NB, Critchlow CW, Kurman RJ (1992) Reassessment of the morphological continuum of cervical intraepithelial lesions: does it reflect different stages in the progression to cervical carcinoma? IARC, Lyon, France, pp 59-66

Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, Angstrom T, Dillner J (2000) Smoking, diet, pregnancy and oral contractive use as risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. Br J Cancer 82:1332-1338

Marcus PM, Vineis P, Rothman N (2000) NAT2 slow acetylation and bladder cancer risk: a meta-analysis of 22 case-control studies conducted in the general population. Pharmacogenetics 10:115-122

Menczer J, Fintsi Y, Arbel-Alon S, Tell L, Friedman E, Jackman A, Sherman L (2000) The presence of HPV 16, 18 and p53 immunohistochemical staining in tumor tissue of Israeli Jewish women with cervical and vulvar neoplasia. Eur J Gynaecol Oncol 21:30-34

Müllenbach R, Lagoda P, Welter C (1989) An efficient salt-cloroform extraction of DNA from blood and tissues. Trends Genet 5:391

Probst MR, Blum M, Fasshamer I, D'Orazio D, Meyer UA, Wild D (1992) The role of the human acetylation polymorphism in the metabolic activation of the food carcinogen 2-amino-3-methyllimidazo [4,5- f] quinoline (IQ). Carcinogenesis 13:1713-1717

Probst-Hensch N, Haile RW, Ingles SA, Longnecker MP, Han C-Y, Lin BK, Lee DB, Sakamoto GT, Frankl ER, Lin HJ (1995) Acetylation polymorphism and prevalence of colorectal adenomas. Cancer Res 55:2017-2020

Radiumheit (1979) Annual report on the results of treatment in carcinoma of the uterus, vagina and ovary, vol. 1b. International Federation of Gynaecology and Obstetrics, Sweden

Roberts-Thomson IC, Butler WJ, Ryan P (1999) Meat, metabolic genotypes and risk for colorectal cancer. Eur J Cancer Prev 8:207-211

Rousseau MC, Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Termini L, Prado JM, Rohan TE (2000) A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infections. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 9:469-476

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, Stantor CK, Manos MM (1993) Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. J Natl Cancer Inst 85:958-964

Stoner GD, Gupta A (2001) Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. Carcinogenesis 22:1737-1746

Szarewski A, Jarvis MJ, Sasienin P, Anderson M, Edwards R, Steele SJ, Guillebaud J, Cuziek J (1996) Effect of smoking cessation on cervical lesion size. Lancet 347:941-943

Vam Zandwijk N (2001) Chemoprevention of lung cancer. Lung Cancer 34S3:S91-94

Vatsis KP, Martell KJ, Weber WW (1991) Diverse point mutations in the human gene for polymorphic N-acetyltransferase. Proc Natl Acad Sci USA 88:6333-6337

Winkelstein W Jr (1990) Smoking and cervical cancer - current status: a review. Am J Epidemiol 131:945-957