

ANA CAROLINA TRINDADE GUILHEN

**ESTUDO DAS VARIANTES ALÉLICAS DA
N-ACETILTRANSFERASE 2 (NAT2) EM CÂNCER DE
PRÓSTATA E TIREÓIDE NA POPULAÇÃO BRASILEIRA
DA REGIÃO DE CAMPINAS**

CAMPINAS

2006

ANA CAROLINA TRINDADE GUILHEN

**ESTUDO DAS VARIANTES ALÉLICAS DA
N-ACETILTRANSFERASE 2 (NAT2) EM CÂNCER DE
PRÓSTATA E TIREÓIDE NA POPULAÇÃO BRASILEIRA
DA REGIÃO DE CAMPINAS**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração
em Clínica Médica.*

ORIENTADORA: LAURA STERIAN WARD

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

G945e Guilhen, Ana Carolina Trindade
Estudo das variantes alélicas da N-Acetiltransferase 2 (NAT2) em
câncer de próstata e tireóide na população brasileira da região de
Campinas. / Ana Carolina Trindade Guilhen. Campinas, SP : [s.n.],
2006.

Orientador : Laura Sterian Ward
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Heterocíclicos. 2. Aminas. 3. Enzimas. 4. Carcinógenos-
metabolismo. I. Ward, Laura Sterian. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em ingles: N-acetiltransferase-2 gene polymorphisms and the susceptibility to
prostate and thyroid cancers in brazilian patients**

Keywords:

- **Heterocyclic**
- **Amines**
- **Enzyme**
- **Carcinogenic-metabolism**

Área de Concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestrado em Clínica Médica

Banca examinadora:

Profª.Drª. Laura Sterian Ward

Profª.Drª. Maria Teresa Nunes

Profº Drº Lício Augusto Velloso

Data da defesa: 26 - 07 - 2006

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Laura Sterian Ward

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) Maria Tereza Nunes _____

2. Prof(a). Dr(a). Lício Augusto Velloso _____

3. Prof(a). Dr(a). Laura Sterian Ward _____

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/07/2006

DEDICATÓRIA

Nunca imaginei que fosse chegar tão longe... A minha conquista, dedico ao meu namorado Fabio, que há 10 anos sempre esteve ao meu lado, apoiando-me e acreditando no meu potencial, com muito carinho e dedicação A minha irmã Regina Desireé que não se cansa de me elogiar e tem um orgulho imenso por mim ao meu grande amigo André de quem tive o privilégio de ser amiga e que conseguia enxergar qualidades em mim que nem mesmo eu conseguia enxergar. Tenho muita saudade sua amigo, espero que se orgulhe de mim, onde quer que você esteja!

Agradeço a Deus, pelas oportunidades oferecidas.

Aos meus pais, pela oportunidade de ter estudado sempre em boas escolas. Obrigada pela confiança e carinho!

À Dra. Laura, pela confiança, apoio, ensino, amizade e oportunidade, sem ela nada disso seria possível.

À Dra. Lígia Assumpção e ao Dr. Mário Maciel pelas amostras de sangue periférico e seguimento dos pacientes neste trabalho. Muito obrigada!

Ao meu namorado, por ter agüentado o meu estresse e ter me ajudado com tabelas e configurações deste trabalho. Te amo muito!!

Aos meus irmãos Willy e Regina Desirée pelo carinho, confiança e elogios. Amo vocês!

Ao meu grande amigo André Neves, pela amizade, carinho e confiança. Queria muito que você estivesse aqui! Sinto muito a sua falta!

Aos meus sogros, Adolar e Cleide, pelo apoio e credibilidade.

Às minhas amigas e parceiras de bancada Mariana, Maria, Janaína, Inês, Natássia, Elaine e Fabiana, pelo aprendizado, dicas, companheirismo e bons momentos juntos. Vocês me ensinaram muito, minha eterna gratidão!

À Flávia e Joyce, pela amizade e ajuda na parte clínica que a bióloga aqui, tinha dificuldades. Obrigada!

Aos amigos de laboratório Renato, Hélio, Juliana, Aline e Patrícia, pelos momentos descontraídos e divertidos.

À Marciane, Andressa, Jose, Silvana e Priscila, que me ajudaram em outro projeto que acabei deixando para o doutorado, mas que participaram na minha fase de mestranda, ensinado-me muito. Tenho muita gratidão e carinho por vocês!

Aos Dr. Lício, Kleber e Alfio, pelas oportunidades oferecidas e ajuda. Muito obrigada!

Às minhas vizinhas de laboratório; Viviane, pelos materiais emprestados e companheirismo e principalmente à Helen que várias vezes dedicou o seu tempo a tirar fotos dos meus milhares de géis na sua máquina. Muito obrigada!

À minha amiga Lucila, pelos conselhos e amizade!

Ao Dr. José Barreto e Dra. Carmem Bertuzzo, pelos conselhos e ensinamentos passados durante a minha qualificação. Tenho muito respeito e admiração por vocês.

Aos meus animais, os gatos (Jujuba, Geni, Fellini, Frajolinha, Pitico, Nina, Kong, Juca, Nega, Mita e Pandora) aos cães (Preta e Lola), aos coelhos (Boris, Mocotó, Cafuzinha e Caramelo), às galinhas especiais (Nhonho, Justino e Manqui), pavões e todos os que já se foram. Ao amor sincero e puro destes animais que me fortalece a cada dia e me faz entender que o mundo é muito mais do que uma rotina... foi a partir deles que eu realmente desenvolvi a compaixão e humildade, já que todos os seres vivos têm o direito à vida e de ser feliz! Amo vocês!!

Ao apoio financeiro da Fapesp !

A todos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho. Obrigada!

*O pensamento é escravo da vida e a vida o bobo do tempo.
E o tempo que toma conta do mundo inteiro um dia
há de parar.*

William Shakespeare

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xxxi</i>
ABSTRACT.....	<i>xxxv</i>
1- INTRODUÇÃO.....	39
1.1- Câncer.....	41
1.1.1- Ciclo celular.....	41
1.2- Agentes carcinógenos e sistema de defesa.....	45
1.3- Câncer de próstata.....	47
1.3.1- Evolução natural do câncer de próstata.....	48
1.3.2- Fatores envolvidos na etiopatogenia do câncer de próstata.....	49
1.4- Câncer de tireóide.....	50
1.4.1- Evolução natural do câncer de tireóide.....	52
1.4.2- Fatores envolvidos na etiopatogenia do câncer de tireóide.....	53
1.5- O gene NAT2.....	55
1.5.1- Os polimorfismos do gene NAT2.....	56
1.5.2- Os polimorfismos do gene NAT2 e o risco de câncer.....	61
1.6- Os Polimorfismos do gene NAT2 como marcadores moleculares.....	62
2- OBJETIVOS.....	65
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	69
3.1- Pacientes.....	71
3.1.1- Controles.....	75
3.1.1.1- Próstata.....	76
3.1.1.2- Tireóide.....	76

3.2- Métodos.....	77
3.2.1- Extração de DNA.....	77
3.2.2- PCR.....	77
3.2.3- Enzima de restrição.....	78
3.2.4- Análise estatística.....	79
4- RESULTADOS.....	81
4.1- Análise dos Resultados.....	83
4.2- Pacientes com câncer de Próstata.....	92
4.3- Pacientes com câncer de Tireóide.....	95
5- DISCUSSÃO.....	103
6- CONCLUSÃO.....	111
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
8- ANEXOS.....	137

χ^2	Teste exato de qui-quadrado
ATP	Adenosina trifosfato
CaP	Câncer de próstata
CDKs	Cinases Dependentes de Ciclinas
CDT	Carcinoma diferenciado da tiróide
CI	Coeficiente de intervalo de confiança
CYP	Citocromo P450
CYP1A1	Citocromo P450 1A1
CYP1A2	Citocromo P450 2A2
CYP2D6	Citocromo P450 2D6
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
DNA	Deoxyribonucleic Acid – Ácido desoxirribonucléico
EGF	Epidermal Growth Factor – Fator de Crescimento Epitelial
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor – Receptor de Fator de Crescimento Epitelial
EPHX	Epóxi Hidrolase I
F	Teste de Fisher
G0	Fase G0 do ciclo celular
G1	Fase G1 do ciclo celular
G2	Fase G2
GST	Glutathione S-Transferase

GSTM1	Glutathione S-Transferase M1
GSTO1	Glutathione S-Transferase Omega 1
GSTP1	Glutathione S-Transferase P1
GSTT1	Glutathione S-Transferase Theta1
HAA	Amina Aromática Heterocíclica
HBP	Hiperplasia prostática benigna
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> (cromatografia de alta performance)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KW	Teste de Kruskal-Wallis
M	Metástases a distância
M	Mitose
N	Acometimento de nódulos cervicais
NAT	N-acetiltransferase
NAT1	N-acetiltransferase 1
NAT2	N-acetiltransferase 2
NAT3	N-acetiltransferase 3
°C	Graus Celsius
OR	Odds ratio (chance)
P	probabilidade
pb	pares de bases
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PSA	<i>Prostatic Specific Antigen</i> – Antígeno Prostático Específico
S	Síntese (do ciclo celular)

SAS	<i>Statistical Analyses System</i> (Sistema de análise estatístico)
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de nucleotídeo único)
Start 1	Ponto de restrição ou parada número 1 do ciclo celular na fase G1/S
Start 2	Ponto de restrição ou parada número 2 do ciclo celular na fase G2/M
T	Tamanho do tumor
T1	Tumor clinicamente inaparente, não palpado e não identificado por imagem
T2	Tumor confinado
T3	Tumor localmente avançado
T4	Tumor metastático
UDP	Glucuronosiltransferase
UV	Radiação ultravioleta

	PÁG.
Tabela 1- Efeitos das SNPs da N-acetiltransferase 2.....	60
Tabela 2- Critérios clínicopatológicos utilizados no estadiamento do CDT.....	72
Tabela 3- Distribuição dos pacientes com CDT.....	73
Tabela 4- Distribuição dos pacientes com Cap.....	74
Tabela 5- Primers a e b do gene NAT2.....	78
Tabela 6- Polimorfismo estudado no CDT.....	78
Tabela 7- Sequencia do gene NAT2.....	85
Tabela 8- Distribuição das varintes alélicas de CaP x HBP.....	93
Tabela 9- Distribuição genotípica e fenotípica de CaP X HBP.....	94
Tabela 10- Distribuição das varintes alélicas de CDT X Controles.....	96
Tabela 11- Distribuição varintes alélicas de CP X Controles.....	98
Tabela 12- Distribuição varintes alélicas de CF X Controles.....	99
Tabela 13- Distribuição genotípica de CDT X Controles.....	100
Tabela 14 Fenótipo rápido X lento de CP e controles.....	102

	PÁG.
Figura 1- Fases do ciclo celular.....	42
Figura 2- Regulação das Cdk's pela degradação das ciclinas.....	43
Figura 3- Via metabólica da cafeína em humanos.....	58
Figura 4- Primer (a) NAT2.....	83
Figura 5- Primer (b) NAT2.....	83
Figura 6- Sequenciamento automático.....	84
Figura 7- Polimorfismo C282T.....	86
Figura 8- Polimorfismo G191A.....	87
Figura 9- Polimorfismo G191A.....	87
Figura 10- Polimorfismo T481C.....	88
Figura 11- Polimorfismo G590A.....	89
Figura 12- Polimorfismo A803G.....	90
Figura 13- Polimorfismo G857A.....	91
Figura 14- Polimorfismo G857A.....	91

LISTA DE QUADRO

	<i>PÁG.</i>
Quadro 1- Classificação simplificada dos tumores da tiróide.....	51

RESUMO

Os genes das N-acetiltransferases, que são polimórficos na população, codificam enzimas envolvidas na metabolização de drogas e de xenobióticos, como os provenientes do cozimento de carnes e do tabaco, e podem estar implicados no risco para o desenvolvimento de neoplasias. Para estudar o envolvimento dos genes NAT2 em tumores na população brasileira da região de Campinas, avaliamos seis polimorfismos (C282T; T481C; G590A; A803G; G857A; G191A) em câncer de tireóide e quatro (T481C; G590A; A803G e G857A) em câncer de próstata. Em um estudo de caso-controle, comparamos 126 indivíduos com câncer de próstata com 101 indivíduos controles com hiperplasia prostática benigna pareados para idade e condições de dieta e exposição ambiental; 139 indivíduos com câncer de tireóide (112 CP e 27CF) e 179 controles também adequadamente pareados. A análise foi feita pela extração de DNA com base no sangue periférico, PCR e restrição enzimática.

Os polimorfismos T481C (76.24%) e A803G (59.41%) apareceram com maior frequência entre os pacientes controles com hiperplasia prostática benigna do que nos com câncer da próstata (60.32% e 45.60%, $p=0.0152$ e 0.0186 , respectivamente). Ao contrário, G857A foi mais freqüente entre os pacientes com câncer da próstata (18.4%) do que nos controles com hiperplasia prostática benigna (5.94%; $p=0.0044$). Assim, a presença do polimorfismo NAT2T481C reduziu o risco de câncer da próstata (OR=2.115; 95% C.I=1.155-3.872). Da mesma forma, a presença do polimorfismo NAT2A803G reduziu o risco de câncer da próstata (OR=1.973; 95%C.I=1.120-3.474; $p=0.0186$). Ao contrário, a presença do polimorfismo G857A aumentou o risco para câncer da próstata mais de quatro vezes (OR=4.095; 95%C.I=1.551-10.812). A presença de um fenótipo de acetilação lenta aumentou o risco para câncer de próstata em 24 vezes (OR=24.145; 95%CI=1.416-411.63).

Nos carcinomas da tireóide, observamos que mutações pontuais de tipo A803G apareceram com maior frequência entre os casos de carcinomas (46.76%) do que nos controles (31.84%) ($p=0.0069$), enquanto que mutações pontuais de tipo G191A e C282T foram mais freqüentes nos controles (25,70% e 68.16% dos casos, respectivamente) do que nos casos (5,04% e 33,81%, respectivamente) ($p=0,0001$). Assim, a herança do polimorfismo A803G representou um risco de 1.8 vezes maior de desenvolver carcinoma diferenciado da tireóide (OR= 1.880; 95% IC= 1.189-2.973). Por outro lado, a herança dos polimorfismos

G191A e C282T do gene NAT2 representou um fator de proteção de cerca de 80,6% contra o risco de desenvolver um carcinoma diferenciado da tireóide (OR=0.153; 95% IC=0.067-0.352 e OR=0.239; 95% IC=0.149-0.382, respectivamente).

Em conclusão, nossos dados mostram que polimorfismos do gene NAT2 estão associados ao risco para o desenvolvimento tanto dos tumores de próstata quanto de tireóide, podendo vir a ser importantes marcadores de susceptibilidade para tais doenças em nossa população.

ABSTRACT

N-acetyltransferases (NAT), which are polymorphic in the population, metabolize important carcinogens such as different kinds of meat and tobacco products that have been directly implicated in the tumor initiation process. In order to investigate the role of NAT2 polymorphisms in the susceptibility to cancer in the Brazilian population from our region, we studied 6 polymorphisms (C282T; T481C; G590A; A803G; G857A; G191A) in differentiated thyroid cancer and 4 polymorphisms (T481C; G590A; A803G e G857A) in prostate cancer. We conducted a case-control prospective study comparing 126 prostate cancer to 101 benign prostatic hyperplasia patients paired for age, diet and environmental exposure; 139 thyroid cancer patients (112 papillary carcinomas and 27 follicular carcinomas) and 179 paired controls. Analyses were performed in DNA extracted from peripheral blood using the polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism method.

We observed T481C (76.24%) and A803G (59.41%) polymorphisms with higher frequency among control patients than in prostate cancer cases (60.32% e 45.60%, $p=0.0152$ e 0.0186 , respectively). On the contrary, G857A polymorphisms was more frequent among prostate cancer patients (18.4%) than in the benign hyperplasia control patients' group (5.94%; $p=0.0044$). Therefore, the presence of NAT2T481C polymorphism reduced the risk of prostate cancer (OR=2.115; 95% C.I.=1.155-3.872). Likewise, the presence of NAT2A803G reduced the risk of prostate cancer (OR=1.973; 95% C.I.=1.120-3.474; $p=0.0186$). On the contrary, the presence of G857A increased the risk for prostate cancer more than 4 times (OR=4.095; 95% C.I.=1.551-10.812). The presence of a low acetylation phenotype increased the risk for prostate cancer more than 24 times (OR=24.145; 95% CI=1.416-411.63).

Regarding thyroid cancer, we observed that point mutations like A803G appears more frequently among thyroid carcinomas (46.76%) than in controls (31.84%) ($p=0.0069$), while G191A and C282T polymorphisms were more frequent among controls (25,70% and 68.16% of the cases, respectively) than among thyroid cancers (5,04% e 33,81%, respectively) ($p=0,0001$). Therefore, the inheritance of an A803G polymorphism represents an 1.8 times higher risk to thyroid cancer development (OR= 1.880; 95% IC= 1.189-2.973). On the other hand, the inheritance of G191A and C282T NAT2 polymorphisms represents

a protection around 80,6% against the risk of thyroid cancer development (OR=0.153; 95% IC=0.067-0.352 and OR=0.239; 95% IC=0.149-0.382, respectively).

In conclusion, our data demonstrate that NAT2 gene polymorphisms are associated to the risk to both prostate and thyroid cancer, suggesting they could become useful molecular markers of susceptibility to these tumors in our population.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Câncer

O termo câncer descreve um processo de doença caracterizado por uma proliferação celular descontrolada que leva à formação de um tumor, também chamado neoplasma ou neoplasia. A denominação de câncer, entretanto, é geralmente aplicada à neoplasias malignas, isto é, aquelas em que o crescimento se torna totalmente descontrolado e o tumor é capaz de invadir os tecido vizinhos e/ou se espalhar, disseminando-se por metástase para sítios mais distantes. Os tumores que não produzem metástases são chamados de benignos. Os tumores são classificados de acordo com o local , o tipo de tecido, o aspecto histológico e o grau de malignidade (Thompson e Thompson, 2002).

As neoplasias ocorrem em decorrência de um desequilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose celular. As células proliferam à medida que passam pelo ciclo celular e sofrem mitose, enquanto a aptose, devido à morte celular programada, remove as células de um tecido por meio de um processo normal de fragmentação do DNA e suicídio celular chamado de apoptose (Thompson e Thompson, 2002).

Os processos de divisão e morte celular são regulados por uma grande gama de genes. Mutações nestes genes, que, portanto, controlam a proliferação celular e a morte, podem ser responsáveis pelo câncer. Em geral, as mutações ocorrem em uma única célula somática, que se divide de forma anômala gerando um clone de células que possuem vantagens de crescimento em relação às células não mutadas. Mais raramente, o câncer ocorre como parte de uma síndrome de câncer hereditário, em que as mutações iniciais causadoras de câncer são herdadas por meio de linhagem germinativas e, portanto, já estão presentes em cada célula do corpo ao nascimento (Thompson e Thompson, 2002; Ward, 2002).

1.1.1- Ciclo Celular

É sabido que o ciclo celular, a divisão e a diferenciação celular resultam da ação de oncogenes e de genes supressores de tumores que mantêm um balanço na proliferação, diferenciação e morte celular por apoptose (Bishop et al, 1987; Bishop et al, 1991; Visakorpi et al, 1992; Hartwell *et al*, 1994).

O ciclo celular se estende por 18 a 25 horas na célula prostática assim como na célula tireoidiana e, à semelhança da maioria das células, divide-se em quatro fases consecutivas: G₁ (intervalo pós-mitótico e pré-síntese de DNA), S (fase de síntese de DNA), G₂ (intervalo pós-síntese do DNA e pré-mitótico) e M (mitose). As fases mais importantes do ciclo são a fase S, em que ocorre a síntese de DNA, e a fase M, quando os pares de cromossomos se replicam (fase de duplicação celular). As fases G₁, S e G₂ compreendem 90% do ciclo celular (Figura1). Durante todo o ciclo, existem dois pontos de parada. O primeiro na fase G₁/S, denominado “start” 1 e o segundo na fase G₂/M, chamado “start” 2 . As células que estão fora do ciclo celular encontram-se na fase G₀, podendo retornar ao ciclo a qualquer momento, dependendo de estímulos apropriados (Rabenhorst et al, 1993; Rabenhorst et al, 1994; Alberts et al, 1997; Johnson *et al*, 1999).

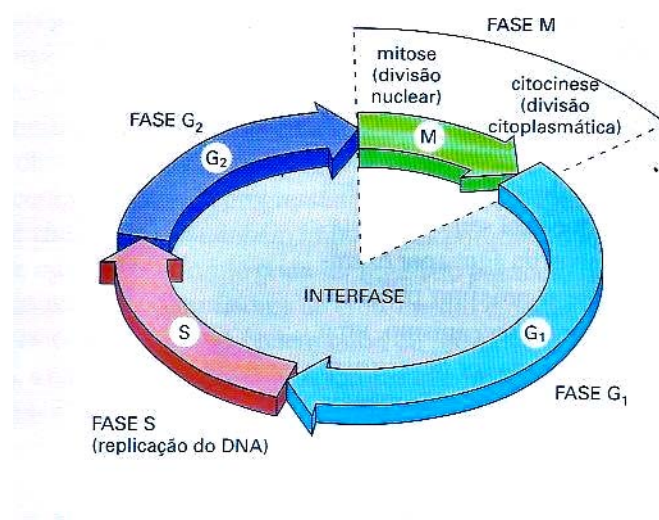


Figura 1- As fases do ciclo celular: Interfase compreende todo o ciclo celular, exceto a fase M; é um período contínuo de crescimento celular , incluindo a fase S, onde ocorre a replicação do DNA. O núcleo seguido do citoplasma divide-se na fase M. A fase G₁ é o intervalo entre as fases M e S; fase G₂ é o intervalo entre as fases S e M (Alberts et al., 1999).

As diferentes fases do ciclo celular estão reguladas por duas classes principais de proteínas: as cinases, que transferem o grupo fosfato do ATP para os aminoácidos das proteínas, e as ciclinas, que são reguladoras das cinases. A expressão das ciclinas e a associação das mesmas às cinases dependentes de ciclinas (CDKs) permitem que as células ultrapassem os pontos de parada. A ciclina B regula CDKs no ponto G₂/M e as ciclinas C, D e E são expressas no início da fase G₁ (Figura 2).

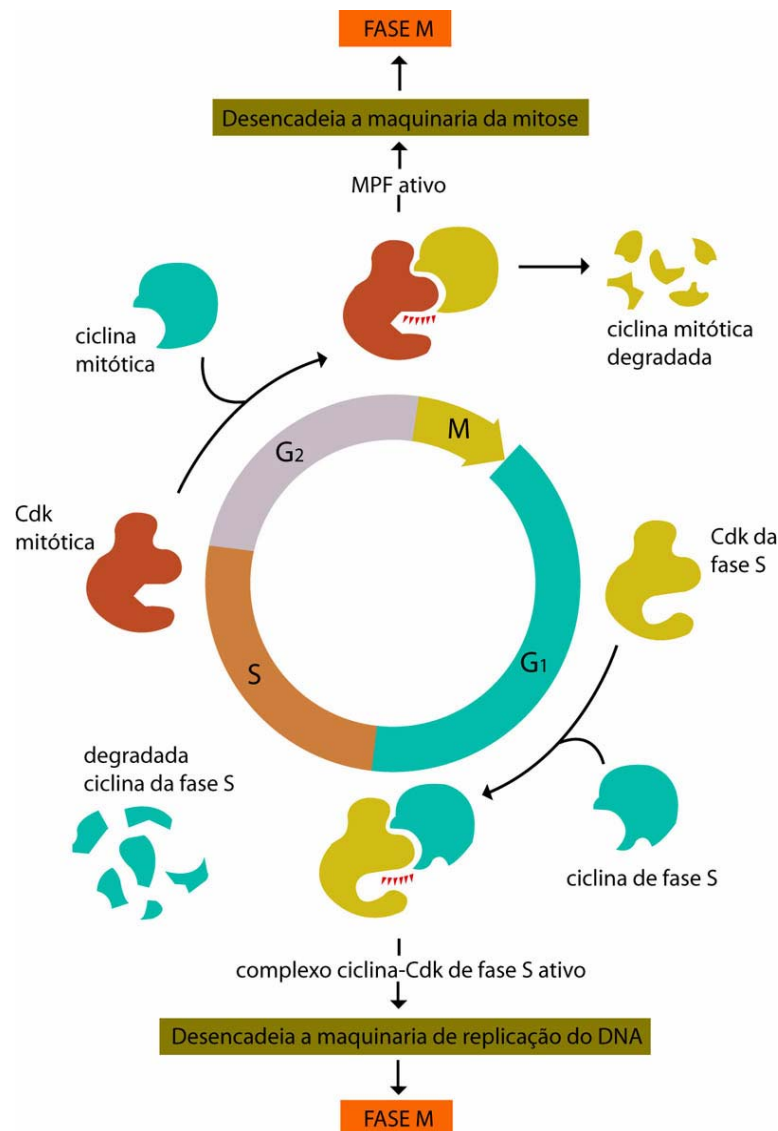


Figura 2- A regulação das Cdk pela degradação das ciclinas. Apenas dois tipos de complexos ciclina-Cdk são representados, um que desencadeia a fase S e o outro que desencadeia a fase M. Em ambos os casos, a ativação da Cdk exige a ligação da ciclina (bem como a fosforilação e desfosforilação) e sua inativação depende da degradação da ciclina (Alberts, 1999).

O ciclo celular é regulado por um conjunto de reações bioquímicas independentes que controlam a sua progressão. Muitas dessas reações envolvem cascatas de fosforilação de proteínas reguladoras, as quais direcionam eventos bioquímicos coordenados, como a síntese de DNA na fase S e o processo de mitose (Harper *et al*, 1992; Hall *et al*, 1995; Alberts *et al*, 1997; Johnson *et al*, 1999).

Todos os fatores que estimulam a entrada de uma célula no processo de divisão ou sua progressão no ciclo celular são chamados de fatores proto-oncogênicos. A ativação dos proto-oncogenes em oncogenes, que pode ocorrer através de mutações puntiformes, amplificações, deleções, translocações gênicas ou por ativação e autofosforilação dos receptores, induz à produção de sinais mitogênicos na superfície da célula para o núcleo, sinalizando a transcrição e promovendo a divisão celular. Os proto-oncogenes codificam proteínas que podem ser divididas em quatro grupos de acordo com as respectivas funções: EGF-fatores de crescimento epidérmico, EGFR-receptores de fatores de crescimento epidérmico, proteínas transdutoras de sinais citoplasmáticos e proteínas nucleares, incluindo os fatores de transcrição (Alitalo *et al*, 1986; Bishop *et al*, 1987; Varmus *et al*, 1989; Bishop *et al*, 1991; Hoollywood *et al*, 1992).

Em oposição aos fatores indutores do ciclo celular, os genes supressores tumorais têm uma ação inibitória do ciclo celular e ativam o reparo do DNA ou a indução da apoptose. Quando funcionantes, as proteínas por eles codificadas são fundamentais para a inibição dos mecanismos indutores de carcinogênese. Por outro lado, a desregulação dos seus efeitos supressivos, a qual pode ocorrer através de perdas alélicas do gene ou por defeitos em seu funcionamento, pode levar à formação de um processo neoplásico (Knudson *et al*, 1971; Vogelstein *et al*, 1988; Fearon *et al*, 1990; Levine *et al*, 1991; Visakorpi *et al*, 1992; Hartwell *et al*, 1994).

Sabemos que são necessárias alterações múltiplas, sucessivas e sequenciais em diferentes genes para que ocorra a transformação tumoral (Alitalo *et al*, 1986; Bishop *et al*, 1987; Varmus *et al*, 1989; Bishop *et al*, 1991; Hoollywood *et al*, 1992).

No entanto, algumas alterações genéticas podem produzir um fenômeno que propicia a ocorrência de novas mutações. Este fenômeno, chamado de instabilidade genética, é importante para explicar o comportamento biológico de alguns tumores que, ao

acumularem vantagens de crescimento em relação a outros, se tornam mais agressivos (Pitot et al, 1993; Rabenhorst et al, 1993; Wong et al, 1994; Lam et al, 1996; Smaaland et al, 1996; Tsihlias et al, 1999). À semelhança de outros tumores, fenômenos relacionados à instabilidade genética (como a perda de heterozigotidade, indicando o desaparecimento de genes supressores tumorais) parecem ser um evento precoce nos tumores (Hu CK et al, 2006). Assim, é possível que em alguns indivíduos, a perda de alguns genes supressores tumorais ou ativação de determinados proto-oncogenes e sua transformação em oncogenes possam determinar maior instabilidade genética. As sucessivas mutações subsequentes que poderiam ocorrer no genoma instável destes casos poderiam levar a novas mutações vantajosas em termos de crescimento e diferenciação das células tumorais, explicando uma maior agressividade e pior evolução clínica nestes casos.

1.2- Agentes carcinogênicos e sistemas de defesa

O câncer é, reconhecidamente, um processo evolutivo causado pela interação gene-meio ambiente (Vineis, 2003). Somos constantemente expostos a uma crescente lista de compostos químicos carcinogênicos, vírus transformadores de células, UV e a radiação ionizante, entre outros agentes tóxicos encontrados no meio ambiente (Schottenfeld e Beebe-Dimmer, 2005). Além disso, compostos eletrofílicos, radicais livres e uma série de produtos de nosso próprio metabolismo podem causar danos a nossas células quando inapropriadamente metabolizados, inadequadamente eliminados ou produzidos em excesso (Vineis, 2004; Carbone et al, 2004).

Presume-se que influências ambientais contribuam com mais de 80% dos fatores envolvidos no surgimento do câncer esporádico, podendo-se incluir nestas influências ambientais comportamentos sociais como tabagismo, consumo de alimentos e bebidas, ambiente de trabalho (poluição), agentes químicos industriais, exposição a raios UV, entre outros (Palli et al, 2000). Acredita-se que seres humanos chegam a consumir 1,5 g de pesticidas naturais por dia, na forma de fenóis provenientes de plantas e flavonóides de alimentos, entre outras substâncias tóxicas. Esses compostos são reconhecidos como potentes carcinógenos em murinos (Ames et al 1990, Goldman e

Shields, 2003; Thilly, 2003). O contato com esses agentes carcinogênicos é provavelmente responsável por uma elevada frequência de mutações no DNA (Nielsen et al, 1996; Bodiwala et al, 2003; Goldman e Shields, 2003; Thilly, 2003). Indivíduos expostos a poluentes do ar, como oficiais de polícia, motoristas de ônibus, vendedores de rua e residentes em áreas urbanizadas altamente poluídas, tendem a apresentar elevada frequência de modificações na estrutura do DNA (Nielsen et al, 1996). Alterações cromossômicas foram encontradas em tecidos de mucosa do cólon, bexiga, nariz, pulmão e em mama destes indivíduos, sugerindo que estes altos níveis de anormalidades possam ser preditivos para o aparecimento de câncer (Peluso et al, 1997; Perera F et al, 2000; Tang et al, 1995).

Agentes químicos carcinogênicos são, geralmente, substâncias pouco solúveis em água sendo portanto, dificilmente eliminadas pelos rins, fezes ou transpiração (Autrup, 2000). Para garantir a sobrevivência das células forçadas a constante exposição a carcinógenos ambientais, muitos mecanismos de defesa foram evolutivamente selecionados pelos seres vivos. Uma série de sistemas enzimáticos estão encarregados de metabolizar e eliminar estas substâncias, reconhecendo-se duas fases diferentes neste processo. Uma primeira fase, denominada de fase I, envolve oxidação inicial de compostos tóxicos pelo citocromo P450. Segue-se a chamada fase II em que, geralmente, acontece uma reação de conjugação ou catalisação por uma série de enzimas, entre as quais, a família das glutathione S-transferase (GST), UDP-glucuronosiltransferase e N-acetiltransferase (NAT) atuando como um catalisador de aminas aromáticas heterocíclicas e nitrosaminas (Mannervik et al, 1988; Bosch et al, 2006).

A probabilidade de desenvolvimento do câncer depende da resposta natural de cada organismo às diferentes exposições a agentes agressores diversos. Os seres humanos possuem diferentes susceptibilidades a diferentes carcinógenos (Lichtenstein et al, 2000; Vineis et al, 2003). A base bioquímica para tal variação de susceptibilidade aos diversos agressores ambientais está relacionada a polimorfismos genéticos que normalmente ocorrem na população, em especial nos genes envolvidos na predisposição específica para câncer, ativação metabólica ou detoxificação de agentes tóxicos ambientais, controle do reparo de DNA ou dano celular (Vineis, 2003; Lichtenstein et al 2000; Vineis P, 2001; Autrup, 2000; Clapper, 2000).

Muitos polimorfismos de genes que codificam enzimas envolvidas na biotransformação de carcinógenos vêm sendo estudados em busca de uma possível associação com o risco para o desenvolvimento de câncer. As diferenças étnicas são os maiores obstáculos desta exploração, já que diferentes populações apresentam suscetibilidades diferentes (Raunio et al,1995).

1.3- Câncer de próstata

O número de casos novos diagnosticados de câncer de próstata (CaP) no mundo é de aproximadamente 543 mil casos por ano, o que representa 15,3% de todos os casos incidentes de câncer em países desenvolvidos e 4,3% dos casos em países em desenvolvimento. O câncer de próstata é o mais prevalente em homens, com uma estimativa de 1,5 milhão com diagnóstico nos últimos cinco anos. No Brasil, o CaP é a segunda neoplasia mais prevalente nos homens segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), que prevê a ocorrência de 47.280 casos novos em 2006. Estima-se a ocorrência de 51 novos casos a cada 100 mil homens ¹ (<http://www.inca.gov.br>). Devido à sua alta incidência e gravidade, o CaP é considerado um problema de saúde pública.

Considera-se o CaP um câncer da terceira idade, uma vez que cerca de três quartos dos casos em todo o mundo ocorrem a partir dos 65 anos de idade (<http://www.inca.gov.br>). Menos de 1% dos casos acometem indivíduos com idade inferior a 40 anos. Observa-se a incidência acumulada da doença em cerca de um em cada sete homens que atingem a oitava e nona décadas de vida (Parker et al,1996; Jemal et al, 2003). Acredita-se que, a exemplo de outros tipos de tumor, fatores genéticos, hereditários, hormonais, fatores de crescimento, exposição ambiental, ocupacional, alterações em genes somáticos e comportamento dietético estejam relacionados ao desenvolvimento do CaP (Brawley et al, 1996; Mettlin *et al*, 1997; Gronberg et al,1997). A incidência dessa doença mostra íntima relação com a raça, idade, bem como fatores geográficos, com altas taxas de prevalência e mortalidade nos homens afro-americanos e com menor incidência no homem asiático (Carter et al,1992; Carter et al, 1993).

A alta frequência desta doença justifica os esforços na busca de melhores métodos de detecção precoce e de marcadores de predisposição e de prognóstico, visando melhorar o planejamento terapêutico.

O PSA produzido pelo tecido prostático e responsável por liquefazer o coágulo seminal tem sido utilizado desde 1986 para o diagnóstico e seguimento do CaP (Partin e Oesterling, 1995); é portanto o marcador sérico de maior utilidade no diagnóstico, prognóstico e monitorização dos tratamentos para o CaP. Essa glicoproteína dosada no soro apresenta, entretanto, o inconveniente de estar alterada em certas ocasiões que não correspondem necessariamente ao CaP, como por exemplo: prostatites, isquemias, infartos prostáticos, manipulações (cistoscopia, sondagem uretral, biópsias protáticas), uso de medicações (inibidores da 5- α -redutase, antiandrogênios) (Partin e Oesterling, 1994; Babaian et al, 1996).

A busca de um marcador tumoral específico e de prognóstico no CaP, tem incentivado várias pesquisas genéticas e da biologia molecular do câncer. Perfis genéticos poderão ser muito interessantes na definição de biomarcadores específicos que auxiliem o planejamento das abordagens clínicas, cirúrgicas e, futuramente, a utilização da terapia e engenharia genética no tratamento e prevenção do câncer de próstata. Marcadores morfológicos, genéticos e bioquímicos deverão servir de base para a identificação de casos de CaP de alto risco, que são candidatos em potencial para procedimentos mais radicais.

Infelizmente, não dispomos ainda de marcadores biológicos estabelecidos que possam definir e monitorar, de modo qualitativo e quantitativo, o risco de um indivíduo desenvolver a doença, ou que permitam detectar lesões pré-malignas precoces, as suas chances de progressão e o potencial de reversibilidade do processo de carcinogênese (Perera e Weinstein, 2000; Srinivas et al, 2002; Medeiros et al, 2004; Carter e Isaacs, 2004).

1.3.1- Evolução natural do câncer de próstata

Muitos homens portadores de CaP mantêm-se assintomáticos e morrem por outras causas não relacionadas ao câncer propriamente dito. O número estimado de homens portadores de câncer prostático latente, isto é, um tumor que está presente na glândula,

porém que não será detectado ou diagnosticado na vida do paciente, é maior que os portadores da doença clinicamente detectados (Baron e Angrist, 1941; Franks, 1954; Oota, 1961; Lundberg e Berge, 1970; Wynder et al, 1971; Akazaki e Stermerman, 1973; Hutchison, 1976; Dhom, 1979). Não se sabe a razão para que alguns tumores permanecem clinicamente silenciosos enquanto outros são agressivos. Esse fato tem sido atribuído a vários fatores, entre os quais a idade avançada no momento do diagnóstico e a um crescimento tumoral lento (Ruijter et al, 1999). No entanto, acredita-se que outros fatores como raça, cultura, dieta, hormônios, e, particularmente, fatores genéticos relacionados à velocidade de crescimento e à diferenciação celular, possam estar envolvidos (Franks, 1973; Rous, 1967).

A transformação maligna das células do epitélio prostático e a progressão para o CaP são o resultado de uma série complexa de eventos que sofrem influência de fatores ambientais e genéticos (Haas et al, 1997).

1.3.2- Fatores envolvidos na etiopatogenia do câncer de próstata

Existem diferenças marcantes na incidência do CaP em diferentes regiões do Brasil e do mundo. A maior parte dos casos novos de câncer de próstata ocorre nos países desenvolvidos. Da mesma maneira que se observa nos diversos países do globo, a incidência do CaP no Brasil possui uma variação em relação aos estados mais desenvolvidos. Por exemplo, a taxa de novos casos de CaP varia de 48,48 casos/100.000 habitantes em Pernambuco para somente 16,2 casos/100.000 no estado da Paraíba (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>). Muito embora essas diferenças possam ser, em parte, atribuídas às discrepâncias na capacidade de atendimento do sistema de saúde de cada região, é provável que outros fatores estejam envolvidos.

Da mesma forma, diferenças na mortalidade do CaP em vários países do mundo vêm sendo atribuídas a fatores genéticos e ambientais além dos fatores sociais como o acesso aos meios de assistência à saúde (Haas et al, 1997).

Uma série de estudos epidemiológicos tem demonstrado que vários fatores ambientais, incluindo irradiação ultravioleta, poluentes, cigarro e dieta, bem como fatores geográficos e raciais devem contribuir para o desenvolvimento do CaP (Ekman, 1999; Hayes et al, 1999; Kolonel et al, 2000; Hsing e Devesa, 2001; Quinn M et al, 2002). Uma série de estudos de migração também tem mostrado a importância do estilo de vida e dos fatores ambientais no desenvolvimento do CaP (Hsing e Devesa, 2001; Gronberg, 2003).

Fatores dietéticos, androgênios e estilo de vida têm sido reconhecido como preditores de risco para o CaP (Wu e Gu 1991; Rossing et al, 1998).

Um grande estudo de coorte, realizado no Havaii (EUA), sugere que a dieta rica em gordura animal e pobre em verduras/frutas está associada com aumento do risco para o CaP (Giovanucci et al, 1993). As aminas aromáticas heterocíclicas encontradas durante o cozimento em altas temperaturas de carnes vermelhas produzem substâncias reconhecidamente carcinogênicas em nosso organismo, assim como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, que são encontradas em produtos do fumo (Norrish et al, 1999; Gross et al, 1993; Morgenthaler et al, 1995; Kniz et al, 1997). Já os vegetais seriam protetores contra a neoplasia prostática por mecanismos ainda desconhecidos (Chan e Giovanucci 2001). Agentes anti-oxidantes como o licopeno, selênio, vitamina E também têm sido considerados capazes de reduzir o risco de CaP a partir de estudos de coorte que, infelizmente, são limitados a populações específicas (Clark et al, 1997; Clark et al, 1998; Heinomen et al, 1998; Gann et al, 1999; Chen et al, 2001).

1.4- Câncer de tireóide

O câncer de tireóide é o mais comum entre os cânceres de glândulas endócrinas, representando cerca de 90% destes e respondendo por 63% das mortes por neoplasias endócrinas. O câncer de tireóide representa cerca de 1% de todos os cânceres que acometem o ser humano. A incidência é maior nos países onde o bócio é endêmico. Nestes países também existe maior prevalência das formas tumorais menos diferenciadas, como o carcinoma folicular e o anaplásico (Ward, 2000).

Se o câncer da tireóide é relativamente pouco freqüente, nódulos de tireóide, por outro lado, são extremamente prevalentes. Estima-se que 10% dos indivíduos adultos desenvolverão um nódulo durante a sua vida, e, embora a grande maioria seja benigna, surgem cerca de 12.000 novos casos de câncer de tiróide por ano nos Estados Unidos (Knudson, 1993).

O câncer da tireóide ocorre em todas as idades, com dois picos: o menor entre 7 e 20 anos, o maior entre 40 e 65 anos. A relação entre a população masculina e feminina é de 1:2. Cerca de 25% dos casos tem histórico prévio de bócio nodular (Drinkwater e Bennett, 1991).

Os tumores da tireóide são classificados, de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde em epiteliais, não epiteliais, miscelâneos, metástases de outros tumores e lesões pseudotumorais, quase todos podendo ser benignos e malignos (Beveridge e Sobin, 1974 ; Sobin, et al, 1997) (Quadro1).

Quadro 1- Classificação simplificada dos tumores da tiróide.

BENIGNOS	MALIGNOS
1.Bócio endêmico	1.Carcinoma folicular
2.Bócio esporádico	2.Carcinoma papilífero
3. Adenoma Folicular	3.Carcinoma medular
4. Outros	4.Carcinoma anaplásico
	5.Outros

Os tumores benignos da tireóide são denominados adenomas. São raros, de origem epitelial, bem encapsulados, não invadem os tecidos vizinhos e não produzem metástases.

Os tumores malignos da tireóide também são raros e apresentam quadros clínicos extremamente variáveis, desde aqueles com crescimento muito lento e compatíveis com uma expectativa de vida normal, até aqueles com péssima evolução e que levam ao

óbito em períodos de semanas ou meses. Tem como origem três diferentes tipos de células, as foliculares, as parafoliculares e as de origem não-tireoidiana. Os tumores diferenciados, que são a maioria absoluta dos derivados das células foliculares (mais de 90%), são subdivididos em 2 grupos, os papilíferos e os foliculares. São também chamados cânceres diferenciados da tireóide (CDT). Os indiferenciados ou anaplásicos constituem apenas 5-10% dos carcinomas tireoidianos. As células parafoliculares, produtoras de calcitonina, são responsáveis por cerca de 5% dos carcinomas tireoidianos, dando origem aos carcinomas medulares. Outras células parafoliculares não tireoidianas causam diversos tumores malignos da tireóide, que também não ultrapassam 5% do total. Entre eles se destacam os linfomas da tireóide, os carcinossarcomas, as lesões metastáticas, os teratomas e os hemangioendoteliomas. (Bisi et al, 1998; Casella e Fusco, 2004).

1.4.1- Evolução natural do câncer de tireóide

À semelhança do que ocorre no CaP, o CDT também pode ficar oculto ou jamais vir a se manifestar clinicamente. Existem evidências de que os tumores muito pequenos, chamados de microcarcinomas e definidos pela OMS como carcinomas com até 1 cm de diâmetro, possam ter um comportamento diferente de tumores maiores, não evoluindo clinicamente. Observação prolongada dos tumores pequenos de tireóide mostra que, de fato, estes microcarcinomas podem permanecer estáveis ou mesmo não evoluir com o tempo (Ito Y *et al*, 2004 e 2003).

Infelizmente, dados concernentes à incidência de microcarcinomas em nosso meio ainda são muito escassos. Um grande estudo nacional em 145.043 autópsias realizadas durante um período de seis décadas mostrou elevada frequência de lesões tireoidianas (8.38%), das quais a grande maioria foi maligna 68.24% (Bisi et al, 1998). No entanto, se à semelhança de outros países, nossa incidência de câncer da tireóide varia entre 0,5 e 0,9% dos homens e 1,9 a 3,0% das mulheres, uma grande parte dos microcarcinomas detectados por ultra-sonografia, em autópsias ou em peças cirúrgicas provavelmente nunca evolui para câncer clínico (Casella e Fusco, 2004). Em trabalhos de nosso grupo, recentemente publicados, demonstramos que 7,8% de 166 tireóides de autópsias e 7,2% de

261 espécimes cirúrgicos obtidos em cirurgia por patologias tireoidianas benignas apresentavam microcarcinomas (Matos, 2006). Um total de 32 microcarcinomas papilíferos foi encontrado, com maior incidência entre os 30 e 49 anos de idade. Ambos os sexos foram acometidos de maneira similar: 9,3% dos homens e 8,8% das mulheres em material de autópsia, e 6,2% dos homens e 7,2% das mulheres em material cirúrgico, sugerindo que fatores hormonais devam favorecer o subsequente aparecimento de lesões clínicas nas mulheres (Matos, 2006).

À semelhança, novamente, do que afirmamos para o CaP, a transformação maligna das células do epitélio tireoidiano e a progressão para o CDT também são o resultado de uma série complexa de eventos que sofrem influencia de fatores ambientais e genéticos (Haas e Sakr, 1997).

1.4.2- Fatores envolvidos na etiopatogenia do câncer de tireóide

O único fator clínico, claramente associado à presença de nódulos malignos e benignos tumorais na tireóide, é a exposição à radiação ionizante, particularmente na infância (Schlumberger e Torlantino, 2000; Welker e Orlov, 2003; Boone et al, 2003; Chow et al, 2003; Figge e Wartofsky 1999; Mack et al, 2003; Ron, 1998; Preston-Martin et al, 2003). O risco de apresentar um nódulo tireoidiano benigno ou maligno aumentou quase 10 vezes em crianças de menos de 10 anos expostas à radiação proveniente do bombardeio nuclear de Hiroshima e Nagasaki durante a 2ª Guerra Mundial (Thompson et al, 1994). O risco de desenvolver um tumor tireoidiano apresenta nítida correlação com a dose de radiação à qual crianças foram expostas na Bielorrússia após a explosão do reator nuclear de Chernobyl (Cardis et al, 2005).

A elevada frequência de câncer em familiares de pacientes com câncer da tireóide sugere que um fator hereditário predisponente seja importante, mas não há dúvidas de que fatores de exposição ambiental devam contribuir para o aparecimento de tumores em determinados indivíduos e não em outros com o mesmo perfil genético (Hall e Holm, 1998). Mais ainda, as variações de incidência do câncer da tireóide em diferentes

áreas geográficas e em diferentes grupos étnicos sugerem que a influência de fatores ambientais no risco do desenvolvimento do câncer esporádico da tireóide seja bastante importante (Ron et al, 1987; Memon et al, 2002; Haselkom et al, 2003; Mack et al, 2002; Friedman e Ury, 1983). Assim, por exemplo, em certas regiões como no Oriente Médio, o câncer da tireóide é a segunda neoplasia mais freqüente entre as mulheres (Memon et al, 2004). No Kuwait, ele responde por 8% de todos os cânceres (Memon et al, 2002). Na Nova Caledônia, no sul do Pacífico, atinge 35 casos por 100.000 habitantes (Truong et al, 2005).

O CDT é diagnosticado de 2 a 3 vezes mais freqüentemente em mulheres do que em homens, sugerindo que hormônios sexuais ou genes ligados ao cromossomo X possam estar envolvidos na patogenia da doença (Welker e Orlov, 2003; Schlumberger et al, 2000; Boone et al, 2003; Chow et al, 2003; Figge, 1999; Mack et al, 2003; Ron, 1996; Truong et al, 2005). Vários compostos estrogênicos têm efeito direto sobre células foliculares; alguns podem produzir metabólitos que reagem com o DNA e, portanto, poderiam ser carcinogênicos (Furlaneto et al, 2000). No entanto, estudos de caso-controle em populações de mulheres portadoras de câncer papilífero da tireóide não identificou o uso de hormônios exógenos como fator de risco (Rossing M et al, 1998; Truong T et al, 2005). Entretanto, acredita-se que fatores reprodutivos e/ou hormonais estão relacionados à maior incidência de tumores tireoidianos entre as mulheres (Truong T et al, 2005).

O carcinoma folicular é mais comum em regiões com aporte insuficiente em iodo, enquanto que áreas suficientes em iodo apresentam incidência muito maior de carcinomas papilíferos (Welker e Orlov, 2003; Schlumberger et al, 2000; Boone et al, 2003; Chow et al, 2003; Figge, 1999; Mack et al, 2003; Ron, 1996; Preston-Martin et al, 2003). O papel do iodo na etiopatogenia do câncer da tireóide pode estar relacionado com a sua influência sobre a expressão de fatores de crescimento, oncogenes ou genes supressores tumorais sensíveis ao iodo, ou ainda atuando na manutenção da estabilidade genética das células foliculares (Eszlinger et al, 2001, 2004; Vaish et al, 2004).

Relatos de casos e pequenas casuísticas sugeriram que a presença de auto-anticorpos poderiam representar fatores de risco para câncer diferenciado da tireóide (Stocker et al, 2002; Zardo et al, 1999; Singh et al, 1999). Entretanto, não existe evidência de associação entre anticorpos destruidores ou estimuladores de tireóide e câncer, em nenhuma grande série. Ao contrário, nossos dados sugerem que anticorpos como TgAb (anticorpo de tireoglobulina) e TPOAb (anticorpo de peroxidase) possam proteger os portadores de carcinomas diferenciados da tireóide, proporcionando-lhes melhor evolução clínica (Souza et al, 2003).

São suspeitos todos os nódulos que crescem rapidamente ou que continuam crescendo mesmo sob terapia supressiva com levotiroxina, os nódulos muito duros e aderidos, os que são acompanhados de gânglios cervicais ou de sintomas de compressão (como dispnéia) ou infiltração de outros órgãos (como rouquidão ou tosse) (Welker e Orlov, 2003;; Boone et al, 2003; Chow et al, 2003; Mack et al, 2003; Preston-Martin et al, 2003; Schlumberger et al, 2000; Figge, 1999; Ron et al, 1996;).

1.5- O gene NAT2

As duas isoenzimas N-acetiltransferase mais importantes são NAT1 e NAT2, sequenciadas em 1987 e mapeadas no braço curto do cromossomo 8, no *locus* 8p22, uma região aonde há perda de heterozigotidade em tumores humanos (Matsus et al, 1997). NAT2 é codificada em uma região exônica de 870 pares de bases, com apenas 2 éxons, expressas em humanos e outras espécies de mamíferos (Vatsis et al, 1995; Grant et al, 1997; Hein et al, 1997). Um terceiro gene NAT (NAT3) foi identificado em ratos, porém, pouco é conhecido e não parece ter maior importância no ser humano. (Kelly, 1994; Fretland et al, 1997).

Aminas aromáticas e hidrazinas (N-acetilação) , N-hidroxi-aromático e aminas heterocíclicas (O-acetilação) são exemplos de substratos que, em geral, são desativados (N-acetilação) ou ativados (O-acetilação) pela NAT1 e/ou NAT2. A atividade enzimática de NAT2 é expressa principalmente no fígado e da enzima NAT1 em tecidos

extra-hepáticos, porém ainda não é totalmente compreendido, a completa relação de ativação e desativação por estas enzimas nos diferentes tecidos (Hein, 2000).

A N-acetiltransferase 2 (NAT2) é uma importante enzima de fase II (grupo de enzimas responsáveis pela conjugação ou catalização de compostos carcinógenos), cuja acetilação cataliza aminas aromáticas heterocíclicas (HAA) e nitrosaminas, encontradas respectivamente em compostos carcinógenos e drogas terapêuticas. Muitas destas drogas são utilizadas na farmacoterapia corrente, como a isoniazida para tuberculose, o dapsona na Lepna, a procainamida no tratamento de arritmias cardíacas, a sulfametazina em antibióticos e a cafeína (Evans 1989; Bosh et al, 2006). A primeira observação feita sobre a NAT2 decorreu do tratamento de pacientes com tuberculose com isoniazida em 1952, em que muitos pacientes respondiam de forma diferente ao tratamento (Hughes et al, 1954). Formas diferentes de toxicidade à isoniazida foram atribuídas então à variabilidade genética da N-acetiltransferase (Evans e White et al, 1964; Weber e Hein 1979).

A O-acetilação pode modular a atividade de muitas drogas e consequentemente a eficácia destas drogas. Pessoas com uma alta atividade enzimática de NAT2 são consideradas eficientes metabolizadores e, ao contrário, indivíduos com baixa atividade enzimáticas de NAT2, ineficientes (Rey et al, 1998; Weber, 1986).

1.5.1- Os polimorfismos do gene NAT2

Os polimorfismos nos genes codificadores destas enzimas de acetilação são as variantes mais comuns na biotransformação de drogas e compostos químicos como a benzina, 2-aminofluoreno e a β -naftilamina, presentes em tinta, antioxidantes, pesticidas e explosivos. A associação da toxicidade das drogas ao alto risco no desenvolvimento de cânceres já foram comprovados por diversos estudos (Weber e Hein et al., 1985; Evans, 1989; Meyer et al., 1989).

As aminas heterocíclicas que são formadas a partir de amino ácidos, creatina e polissacarídeos, precursores liberados durante o cozimento em altas temperaturas de carnes e peixes, também demonstraram ser carcinógenos em experimentos com animais (Sugimura, 1997; Layton et al, 1995).

Gross estudou a formação das aminas aromáticas heterocíclicas (HAA) a partir do cozimento de carnes, peixes e bacon e descobriu que várias HAAs eram formadas, como PhIP, MeIQx, 4.8-DiMeIQx e A α C, porém a que aparecia em maior concentração era o PhIP (Gross et al,1993). Outro estudo demonstrou que este mesmo PhIP, em altas doses (100 p.p.m), equivalentes a aproximadamente 100kg de carne frita e bem cozida, promovia câncer em camundongos, principalmente de mama e de cólon (Hasegawa et al,1993).

As nitrosaminas encontradas em produtos do fumo, como por exemplo os hidrocarbonetos policíclicos, demonstraram ser fatores de risco para o câncer de pescoço e bexiga (Raunio et al,1995). Mas o assunto ainda é motivo de controvérsias, pois outros autores, tentando correlacionar polimorfismos nos genes CYP1A1, GSTs (GSTM1, GSTP1, GSTT1) e NAT2 em 20.938 pessoas que fumavam, não conseguiram encontrar correlação entre o consumo de tabaco e câncer (Smits et al, 2004).

As HAAs sofrem a bioativação através da N-oxidação pelas enzimas CYP1A2 no fígado e CYP1A1 e/ou CYP1B1 em tecidos extra hepáticos. Os produtos desta N-oxidação serão as N-hidroxi, que por sua vez irão sofrer a bioativação no fígado através da O-acetilação das enzimas NAT (principalmente NAT2) e Sulfotransferase (SULT). Se não houver uma bioativação correta destes produtos N-hidroxi, serão formados íons eletrofílicos que se ligam ao DNA formando aductos que causam lesões no DNA (Boobis et al, 1994; Leff et al, 1999; Hein et al, 2002).

A expressão entre os diferentes genótipos, alterados ou não, (como é o caso de NAT2*4) resultam em um fenótipo que pode ser classificado como lento, rápido ou intermediário, dependendo da sua capacidade de acetilação e metabolização dos compostos aromáticos heterocíclicos e nitrosaminas (Vatsi et al, 1995; Deguchi et al, 1990; Mashimo et al,1992; www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT2.html). Até o ano de 2003, foram catalogados 36 diferentes tipos de combinações entre genótipos de NAT2 (ver anexo 1) e até o ano de 2002, 26 tipos de combinações entre genótipos de NAT1 registradas no site oficial correspondente da N-acetiltransferase : www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT2.html.

A determinação destes fenótipos de acetilação é usualmente feito através dos produtos metabolizados a partir da cafeína (Weimann et al, 2005; Welfare et al, 2000) (Figura 3).

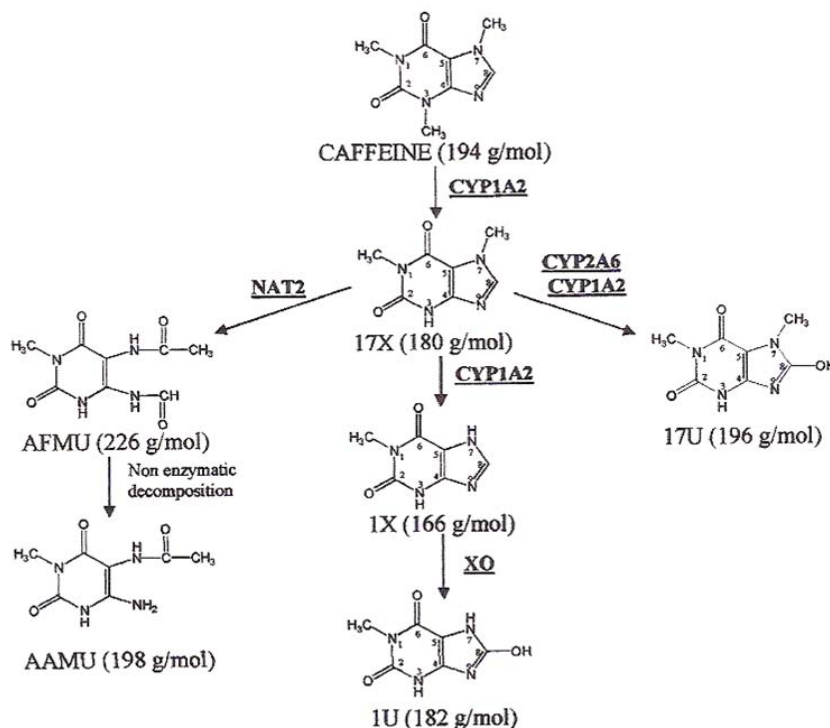


Figura 3- Via metabólica da cafeína em humanos (Weimann et al, 2005).

A leitura é feita utilizando-se a técnica de HPLC (high-performance liquid chromatography) a partir da urina extraída dos pacientes que receberam posteriormente uma dose de café forte. A leitura baseia-se na razão molar dos metabólitos de CYP1A2 = $(AFMU=1X+1U)/17U$ (Campbell et al, 1987) e $NAT2=AFMU/(AFMU+1X=1U)$ (Tang et al, 1991). Para NAT2 a razão $< e \geq 0.3$ é definida como acetilação lenta ou rápida respectivamente (Berthou et al, 1992) e a razão para a atividade de CYP1A2 é tabulada de acordo com intervalos que podem ser entre 1.24-2.84, 2.84-4.28 e 4.28-8.27 definindo como intervalos I, II, III respectivamente (Pavanello et al, 2002).

Geralmente a substituição de nucleotídeos em regiões codificantes do gene NAT2 resultam em uma enzima com redução de afinidade ao substrato, baixa expressão e instabilidade enzimática (Hein et al,1994; Grant et al,1997). Por causa de múltiplos mecanismos de redução da atividade da N-acetiltransferase estarem associados a várias substituições de nucleotídeos presentes nos alelos de NAT2, a definição dos fenótipos de acetilação é bastante complexa (Cartwright et al, 1982; Cascorbi et al, 1995 e 1999).

Há atualmente 16 variantes alélicas descritas do gene NAT2. Estudamos 6 destas variantes alélicas (C282T; T481C; G590A; A803G; G857A; G191A) em pacientes com câncer de tireóide, e 4 deles (T481C; G590A; A803G e G857A) em pacientes com câncer de próstata. Estes polimorfismos foram escolhidos por serem mais citados na literatura e apresentarem maior frequência na maioria dos cânceres, apesar de terem pouquíssimos estudos em câncer de tireóide. Restringimos em 4 variantes alélicas a ser estudado em câncer de próstata, porque já existem vários estudos correlacionando o gene NAT2 neste tipo de câncer e portanto, selecionamos os mais frequentes (Leff, 1999; Hamasaki et al, 2003; Srivastava e Mittal,2005 ; Rovito et al,2005; Costa et al, 2005;).

Todas as mutações se encontram na região codificante do gene NAT2 no éxon 2 sendo que, apenas as variantes T481C e C282T são uma troca de base do tipo silenciosa, sendo os demais de tipo sentido trocado ou missense.

O efeito funcional das trocas de bases (SNP- single nucleotide polymorphisms) são importantes, pois podem alterar a conformação proteica e o acesso de ligação e/ou catalisação dos sítios da proteína.

Alguns estudos foram feitos, demonstrando a importância na atividade catalítica das principais HAAs (PhIP e MeIQx) , níveis de expressão proteica e estabilidade proteica das SNPs estudadas, mostrados na tabela 1 (Hein, 2002; Hein et al, 2006; Fretland et al, 2001; Zhu et al, 2002).

Tabela 1- Efeitos das SNPs da N-acetiltransferase 2, baseados na NAT2*4 que não possui nenhuma variante alélica (Hein 2002, 2006).

SNP	Troca de aa	O-acetilação de NAT2				
		N-OH-MeIQX	N-OH-PhIP	Quantificação de RNAm	Expressão proteica	Estabilidade proteica
C282T	Nenhum	+++	+++	+++	+++	+++
C481T	Nenhum	+++	+++	+++	+++	+++
A803G	K268R	+++	+++	+++	+++	+++
G191A	R64Q	+	++	+++	++	+
G590A	R197Q	++	++	+++	+	+
G857A	G282E	++	+++	+++	+++	+

+, 0-35%; ++, 36-70%; +++, >70%

Baixa catalisação, reduzindo a O-acetilação dos compostos MeIQX e PhIP está associada às variantes G191A e G590A. A variante G857A diminui apenas a atividade catalítica da MeIQX, sendo os demais (C282T, C481T, A803G) normais. A baixa expressão proteica está associada às variantes G191A e G590A e a baixa estabilidade proteica às variantes alélicas G191A, G590A e G857A (Hein, 2002 ; Hein, 2006; Fretland et al, 2001; Zhu et al, 2002).

Apesar de alguns estudos não encontrarem nenhum efeito funcional para as variantes alélicas C282T e C481T, Blum encontrou (Blum, 1991). Estudando também a importância funcional destas SNPs com base na comparação entre selvagens e mutantes, ele observou que a mutação em C282T causa uma atividade enzimática instável e que a mutação em C481T acarreta em uma baixa atividade proteica no fígado causada pelo defeito na tradução do RNAm.

Na maioria dos casos em que há troca de bases, a atividade enzimática de NAT2 será alterada, refletindo portanto na catalisação e metabolisação dos compostos e consequentemente na alteração do seu fenótipo (rápido, lento e intermediário) (vide anexo 1, Grant DM et al., 1997; Blum M et al., 1991).

Os genótipos 5*,6* e *7 são os responsáveis pela maior ineficiência metabólica em caucasianos e orientais. A frequência gênica de *5, *6 e *7 são 44.2%, 25.6% e 11.2%, respectivamente, em caucasianos (Agundez, 1996, Lin, 1994) e 6.0%, 30.5% e 11.2%, respectivamente, em chineses (Xie et al, 1997).

1.5.2- Os polimorfismos do gene NAT2 e o risco de câncer

Importantes fatores carcinogenicos requerem a bioativação ou a inativação pelas enzimas de fase II. Estudos feitos com algumas destas enzimas de fase II (NAT, CYP e GST) mostram um risco potencial no desenvolvimento de vários tipos de câncer, sugerindo que os polimorfismos de genes codificadores destas enzimas possam servir como possíveis marcadores moleculares de risco (Wadelius et al, 1999; Murata et al, 2001; Kote-Jarai et al, 2001).

Nós demonstramos em trabalhos anteriores que GSTT1, GSTM1, GSTP1, mas não GSTO1 são marcadores de risco para câncer de tireóide (Morari et al, 2002; Granja et al, 2004; Granja et al, 2005).

Acetiladores rápidos demonstraram ser mais propensos a apresentarem câncer de fígado, cólon (Turesky et al, 1991), carcinoma hepatocelular (Huang et al, 2003), e cólon retal (Gil et al, 1998) e linfomas malignos (William et al., 2004).

Acetiladores lentos demonstraram ser mais propensos a apresentarem câncer uropitelial (Kato et al, 1999; Inatomi et al, 1999), boca (Kato et al, 1998), próstata (Hamasaki et al, 2003), cólon retal (Chen et al, 1998) e bexiga (Cartwright et al, 1982). Pacientes com linfomas Não-Hodgkin's também possuem prevalência maior de acetilação lenta (Zahn e Blair, 1992). A acetilação rápida produz menos resíduos mutagênicos na urina

do que à acetilação lenta, especialmente se o CYP1A2 estiver com a sua atividade de metabolização inalterada (Pavanello et al, 2002).

A proporção de pessoas com fenótipo de acetilação rápida e lenta varia consideravelmente dependendo da etnia e origem geográfica (Weber e Hein, 1985; Evans, 1989; Garte et al, 2001). Um exemplo disso é que 5% dos canadenses esquimós, mas 87% dos egípcios e 90% dos marroquinos apresentam o fenótipo de acetilação lenta. Na população européia, 40 dos 70% possuem a acetilação lenta, já em japoneses a taxa de acetiladores lentos é de apenas 10% (Ohsako e Deguchi, 1990; Deguchi et al, 1990).

1.6- Os polimorfismos do gene NAT2 como marcadores moleculares de susceptibilidade

O câncer de tireóide se assemelha ao da próstata em vários aspectos. Ambos possuem nítida relação com o sexo e fatores hormonais e ambos possuem uma forma não-clínica de elevada prevalência.

Uma revisão feita por David W Hein sugeriu que a genotipagem de NAT1 e NAT2, baseada nos polimorfismos que modulam a acetilação pode ser um valioso marcador molecular de risco para o câncer de bexiga, cólon retal, mama, garganta, cabeça, pescoço e próstata (Hein et al, 2000). Contudo ainda não há estudos relacionando o gene NAT2 ao câncer de tireóide (último acesso ao PubMed em 10/06/20006). Tampouco existem estudos, de nosso conhecimento, de NAT2 na população brasileira.

Sabemos que a população brasileira é bastante miscigenada e que o fator étnico e geográfico pesa bastante na modulação de risco a certos tipos de cânceres, independente do tipo de marcador molecular de predisposição ao câncer a ser escolhido. Garte e colaboradores estudaram a frequência de alguns genes polimórficos responsáveis pela metabolização de carcinógenos (CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6, GSTM1, GSTT1, NAT2, GSTP e EPHX) em 15000 controles em diferentes grupos étnicos como caucasianos, asiáticos e africanos. Não encontraram diferenças entre idade e sexo, porém, demonstraram

que o fator étnico e geográfico é um fator importante nas diferentes frequências alélicas (Garte et al, 2001).

O estudo dos polimorfismos de NAT2 na população brasileira da região de Campinas, em pacientes portadores de câncer de tireóide e próstata, pode ser de grande valia como um possível marcador de predisposição a estes tumores.

2- OBJETIVOS

- Inferir os genótipos e fenótipos dos polimorfismos de NAT2 na população brasileira da região de Campinas.
- Comparar a prevalência dos polimorfismos NAT2 entre pacientes com câncer da tireóide e próstata na população geral da região de Campinas.
- Investigar a correlação entre tais perfis genotípicos e a suscetibilidade ao câncer de tireóide e de próstata.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Pacientes

Todos os pacientes foram inscritos no estudo, após concordarem em participar do mesmo e assinarem o Termo de Consentimento Informado, conforme as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/ Unicamp.

Os pacientes com tumores tireoidianos selecionados para este estudo foram consecutivamente atendidos na Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Unicamp durante os anos de 2001 a 2005, no Ambulatório de Câncer da Tiróide, sob coordenação da Profa. Dra. Ligia Vera Montalli da Assumpção. Os pacientes portadores de doença prostática selecionados para este estudo foram consecutivamente atendidos no Ambulatório de Urologia do Hospital Irmãos Penteado e Irmandade de Misericórdia de Campinas, durante os anos de 2002 a 2005.

Todos os pacientes de doença tireoidianas seguem um protocolo padrão implantado há mais de 25 anos no Ambulatório de Câncer da Tiróide, e possuem uma ficha da qual constam, além dos dados de identificação, a idade ao diagnóstico, sexo, cor, dados clínicos pré-cirúrgicos, exposição a agentes ambientais, dieta, fumo, atividades físicas, uso de medicamentos e drogas, exames realizados (ultra-som, cintilografia da tiróide, biópsia aspirativa), dados referentes à cirurgia e dados do exame anátomopatológico (medida do tumor, tipo histológico, grau de diferenciação, presença de linfonodos metastáticos).

Nenhum dos pacientes possuía histórico de exposição acidental ou médica a radiação ionizante. Todos os dados, incluindo os diagnósticos de outras doenças concomitantes, foram confirmados nos prontuários dos pacientes.

Todos os indivíduos que procuram o Ambulatório de Câncer da Tireóide com diagnóstico de carcinoma da tireóide ou a suspeita do mesmo na citologia da punção aspirativa, realizada com agulha fina são tratados de acordo com um protocolo padrão. Todos os pacientes são submetidos a tireoidectomia total ou parcial. Os pacientes com diagnóstico pré-operatório de nódulos metastáticos no pescoço ou nos quais gânglios suspeitos são visualmente identificados no intra-operatório são submetidos a dissecação regional do pescoço. Utilizou-se como critério para estadiamento a classificação proposta

por De Groot (De Groot et al, 1995). Esta classificação baseia-se no clássico método do TNM, isto é, no tamanho do tumor (T), acometimento de nódulos cervicais (N) e metástases a distância (M), mas leva em conta a idade, classificando de forma diferente os pacientes abaixo e acima dos 45 anos. Esta classificação considera no estadio 1 os pacientes em que o tumor é de foco único ou múltiplo, mas restrito à tiróide; estadio 2 aqueles em que o tumor apresenta acometimento restrito a gânglios cervicais; no estadio 3, o tumor apresenta metástases restritas à região cervical; no estadio 4, o tumor apresenta metástases à distância (ver Tabela 2).

Tabela 2- Critérios clinicopatológicos utilizados no estadiamento dos Carcinomas Diferenciados da Tiróide pelo sistema do Estadio.

Idade < 45 anos		Idade ≥ 45 anos
Estadio I	Qualquer T, qualquer N, M0	T1, N0, M0
		T2, N0, M0
Estadio II	Qualquer T, qualquer N, M1	T3, N0, M0
		T4, N0, M0
Estadio III	Qualquer T, qualquer N, M1	Qualquer T, N1, M0
		Qualquer T, qualquer N, M1
Estadio IV		

Um resumo das características clinicopatológicas dos pacientes com patologias tireoidianas incluídos neste estudo está representado na tabela 3.

Tabela 3- Distribuição dos pacientes com câncer de tireóide de acordo com histologia , idade, sexo, etnia, histórico de doenças prévias tireoidianas (TH-tiroidite de Hashimoto; G-Graves), hábito de fumar, estadiamento (presença de linfonodo acometido e metástase a distância) e seguimento

HISTOLOGIA	ESTADIAMENTO												
	CARACTERISTICAS CLINICAS					(Metástase ao diagnóstico)	SEGUIMENTO						
	Idade	Sexo		Cor				Doença Tireoidiana	Prévia	Fumantes	Linfonodo	Distância	Persistência, Recorrência ou metástase
		M	F	B	N B								
Carcinoma Papilífero	42.75	16	96	98	14	(8) TH		27	22	4	13		
Carcinoma Folicular	46.25	2	25	20	7	(5) G	0	4	1	4	5		

Os pacientes com doença prostática responderam a um protocolo de perguntas (Anexo 2), aplicado pelo Dr. Maciel de Lima Jr, e tiveram confeccionada uma ficha contendo os dados clínicos necessários para esta pesquisa, os quais foram comparados com os respectivos dados dos prontuários médicos, como anatomopatológico, idade de aparecimento do tumor, tipo histológico do tumor, valores do PSA, toque retal, Gleason, estadiamento clínico e tratamento. O questionário incluía a avaliação do estilo de vida, como história ocupacional e profissional, habito dietético, consumo de drogas, álcool e tabagismo.

Todos os pacientes prostáticos foram submetidos a um mesmo protocolo de investigação que incluía dados clínicos (história clínica, exame físico geral, exame urológico incluindo toque prostático), laboratoriais (exames hematológicos gerais, urina I, antígeno prostático específico (PSA) e fosfatase alcalina) e de imagem (ultra-som transretal da próstata, cintilografia óssea, tomografia computadorizada do abdome/pelve e radiografia de tórax). Utilizou-se como critério para estadiamento a classificação proposta pela União Internacional Contra o Câncer e denominada de T.N.M. (Tumor, Nódulo, Metástase) (SOBIN e Fleming, 1997). Um resumo das características destes pacientes está apresentada na tabela 4.

Tabela 4- Distribuição dos pacientes de acordo com a histologia, características clínicas, PSA, Gleason, Estadio T, tabagismo (F: fumantes, NF: Não fumantes), presença de metástase ao diagnóstico, recorrência e/ou metástase à distância durante o seguimento e /ou morte.

	Diagnóstico						Metástase ao diagnóstico			Características Clínicas		Seguimento
	PSA			Gleason		Estadio T		Loco-regional	Distância	Tabagismo		Recorrência e/ou metástase
	≤4	4-10	>10	2-6	7-10	T1	T3					
						T2	T4					
										Fumantes	Não fumantes	
CaP	14	49	59	72	45	94	18	27	1	38	58	34 (7 mortes)
HPB	60	22	4	0	0	0	0	0	0	32	53	0

3.1.1- Controles

Os controles foram obtidos através do recrutamento de acompanhantes de nossos pacientes, desde que não fossem parentes em primeiro ou segundo grau, pessoas envolvidas na manutenção e limpeza da nossa Faculdade de Ciências Médicas, voluntários recrutados entre o pessoal dos laboratórios de pesquisa, seus parentes, vizinhos e doadores de sangue.

Os controles dos pacientes com câncer de próstata foram portadores de hiperplasia prostática benigna (HBP), confirmada por biópsia transretal ou por exame de peça cirúrgica RTU (ressecção transuretral da próstata), além de níveis de PSA e toque retal.

Para obtermos um grupo controle comparável com o dos portadores de neoplasia tireoidiana, selecionamos 3 mulheres para cada 2 homens já que o câncer de tiróide é mais freqüente em mulheres que em homens. Todos os controles, assim como os pacientes com patologias tireoidianas ou prostáticas, foram classificados em brancos e não-brancos. Dados das condições de saúde e história médica com ênfase em patologias tireoidianas anteriores ou correntes foram obtidos por entrevista usando um questionário padrão. O uso de determinados alimentos foi cuidadosamente avaliado, em particular o uso dos alimentos bociogênicos como os vegetais contendo glucosídeos cianogênicos (muitas formas de repolho, couve-flor, brócolis e outros membros da família dos crucíferos). Também se questionou o uso de drogas que podem interferir na função tireoidiana, assim como o uso de outras medicações para doenças concomitantes, consumo de álcool e hábitos tabagistas, incluindo a duração do tabagismo, o início do hábito, a quantidade de cigarros e a data de abandono do hábito. Indivíduos com história prévia de doença tireoidiana, exposição à radiação ou outros antecedentes de malignidade foram excluídos do estudo.

3.1.1.1- Próstata

Foram incluídos 101 controles com hiperplasia prostática benigna (HBP), com idade média de 64,70 anos (mínimo de 40 e máximo de 84 anos de idade). O total de pacientes com CaP foi de 126 casos com média de idade de 69.80 anos (mínimo de 52 e máximo de 92 anos de idade). Todos os casos tiveram a histopatologia confirmada. Na Tabela 5 resumimos as características clínicas, os parâmetros de agressividade ao diagnóstico e o seguimento dos pacientes. As características demográficas e de estilo de vida de ambos os grupos, incluindo o consumo de álcool, carne vermelha, vegetais e exercícios físicos, foram similares.

Os pacientes foram agrupados apenas em não fumantes e fumantes para fins estatísticos já que os dados relativos a número de cigarros fumados e tempo de uso de cigarro foram considerados pouco confiáveis. Também foram classificados grosseiramente em brancos e não-brancos devido à grande dificuldade na caracterização étnica de nossa população. Assim, o dado correspondente era obtido através da auto descrição do paciente, que se considerava branco ou não, confirmada pelo observador.

3.1.1.2- Tireóide

Utilizamos o material coletado de 139 pacientes com diagnóstico de nódulos tireoidianos malignos (112 carcinomas papilíferos e 27 carcinomas foliculares) com média de 43.43 anos (mínimo de 8 e máximo de 87 anos de idade) e 179 controles com média de idade de 47 anos (mínimo de 13, máximo de 86 anos de idade). Patologistas experientes da Unicamp, capitaneados pela Profa Dra Patrícia Sabino Matos, especialista em Patologia Endócrina do Departamento de Anatomia Patológica da FCM/Unicamp, confirmaram todos os diagnósticos. Na Tabela 4, resumimos as características clínicas, os parâmetros de agressividade ao diagnóstico e o seguimento dos pacientes.

3.2- MÉTODOS

3.2.1- Extração de DNA

Foi extraído o DNA total de todas as amostras por meio de protocolo adaptado pelo nosso laboratório utilizando o método do fenol-clorofórmio, em que as hemácias são desprezadas, os leucócitos lisados e o DNA separado dos restos celulares. Após a extração o DNA foi quantificado através de espectrofotometria e armazenado em “freezer” a -20°C .

3.2.2- PCR

As amostras foram submetidas à reação de PCR (polymerase chain reaction – reação em cadeia da polimerase) por dois pares de “primers”, em razão da grande extensão do fragmento a ser amplificado. As reações utilizam 50 ng de DNA da amostra, 50 mM de MgCl_2 , 10 mM de dNTP, 10 μmol de cada “primer” (forward e reverse), 10x PCR buffer (de acordo com o protocolo do fabricante) e 1 unidade de taq DNA polimerase (cultivada e extraída no laboratório). O termocilador utilizado para ambos os primers foi o Perkim.

O primer 1, foi desnaturado à 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de $95^{\circ}\text{C}/0:45$ segundos, $60^{\circ}\text{C}/0:45$ segundos e $72^{\circ}\text{C}/0:45$ segundos. A temperatura final de extensão foi de 72°C por 10 minutos e $4^{\circ}\text{C} \infty$.

O primer 2, foi desnaturado à 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de $95^{\circ}\text{C}/0:45$ segundos, $61^{\circ}\text{C}/0:45$ segundos e $72^{\circ}\text{C}/0:45$ segundos. A temperatura final de extensão foi de 72°C por 10 minutos e $4^{\circ}\text{C} \infty$.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídeo para visualização sob luz ultravioleta. Tabela 5 demonstra os pares de primers utilizados para a amplificação do gene NAT2 (f- primer forward; r primer reverse).

Tabela 5- Primers a e b do gene NAT2:

Gene NAT2

PRIMER	SEQUENCIA 5'-3'	FRAGMENTO
NAT2 (a) f	CATGGAGTTGGGCTTAGAGGC	364
NAT2 (a) r	ACTGCTCTCTCCTGATTTGGTCC	
NAT2 (b) f	ATCAGCCTCAGGTGCCTTGC	491
NAT2 (b) r	GAGTTGGGTGATACATACACAAGGG	

3.2.3- Enzima de Restrição

Os principais polimorfismos já descritos em NAT2 são 16. Estudamos seis destes polimorfismos que são descritos com maior frequência na literatura e que nos permitem genotipar e fenotipar indivíduos de acordo com fenótipo reportado na literatura e que já foram descobertos pela técnica de HPLC. A Tabela 6 mostra os polimorfismos estudados no câncer de tireóide e as respectivas enzima utilizadas:

Tabela 6- Polimorfismo estudado no CDT

POLIMORFISMOS	ENZIMA	TEMPERATURA DA RESTRIÇÃO
1. C282T	1. BseGI	55°C/16hrs
2. T481C	2. KpnI	37°C / 16hrs
3. G590A	3. TaqI	65°C/16hrs
4. A803G	4. DdeI	37°C / 16hrs
5. G857A	5. BamHI	37°C / 16hrs
6. G191A	6. HpaII	37°C /16hrs

Restringimos em apenas 4 polimorfismos (2, 3, 4 e 5) o estudo feito com câncer de próstata por serem mais citados na literatura e apresentarem maior frequência neste tipo de câncer (Srivastava & Mittal ,2005 ; Rovito *et al*,2005, Hamasaki *et al*, 2003; Costa *et al*, 2005).

3.2.4- Análise estatística

A análise estatística foi realizada, utilizando o software SAS (Statistical Analyses System), versão 8.1, Cary, NC, USA, 1999-2000. Testes exatos de qui-quadrado (χ^2) e o teste exato de Fisher (F) foram usados para examinar a homogeneidade entre os casos e os controles com relação à raça, cor, doenças tireoidianas prévias, uso de medicações e fumo. A comparação entre o estadiamento dos carcinomas papilíferos e foliculares e de câncer de próstata, foi realizada, usando-se o teste exato de Fisher. O teste de Kruskal-Wallis (KW) foi usado para comparar a idade entre os grupos. Os testes de Mann-Whitney ou Wilcoxon foram usados para comparar a idade entre diferentes grupos genotípicos. O odds ratio (OR) e o coeficiente de intervalo de 95% (confidence interval -CI) permitiram estimar a força de associação entre cada variável e o comportamento benigno ou maligno.

Utilizamos uma análise de regressão logística para avaliar os efeitos dos genótipos, depois de ajustados para idade, sexo, cor, fumo, consumo de álcool ou medicamentos na determinação de risco para malignidade e na determinação da resposta terapêutica e evolução a longo prazo. As interações entre as variáveis ambientais e os genótipos também foram avaliados. Todos os testes foram realizados com $p=0,05$ como nível de significância.

4- RESULTADOS

4.1- Análise dos resultados

Fragmentos amplificados apartir da reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene NAT2.

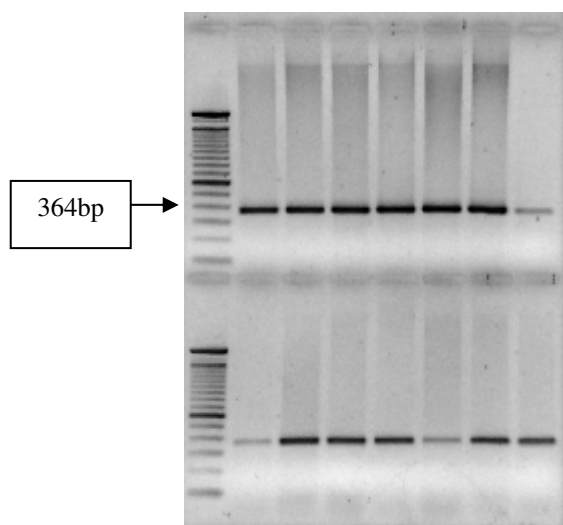


Figura 4- Primers NAT2 (a)

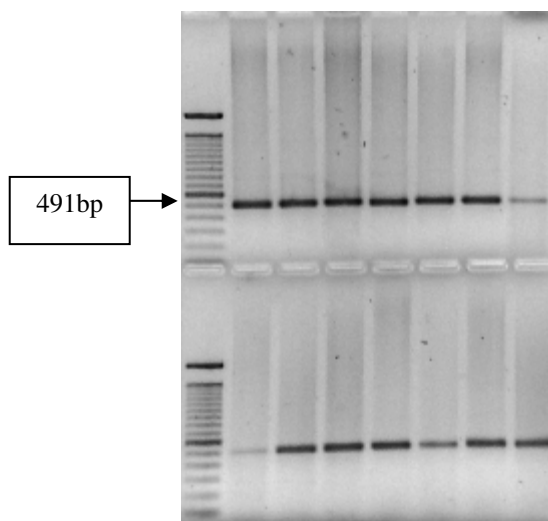


Figura 5- Primers NAT2 (b)

Na figura 4 as amostras foram amplificadas com os primers NAT2 (a) forward e reverse e na figura 5 as mesmas amostras foram amplificadas com os primers NAT2 (b) forward e reverse.

Os primers amplificaram duas regiões (364 e 491pb) que se sobrepõem, facilitando o sequenciamento das extremidades dos fragmentos. Estes fragmentos amplificados foram então submetidos ao sequenciamento direto. Os cromatogramas obtidos (figura 6) foram analisados e suas sequências comparadas à original do gene NAT2, depositada no GenBank (GI: NM_000015).

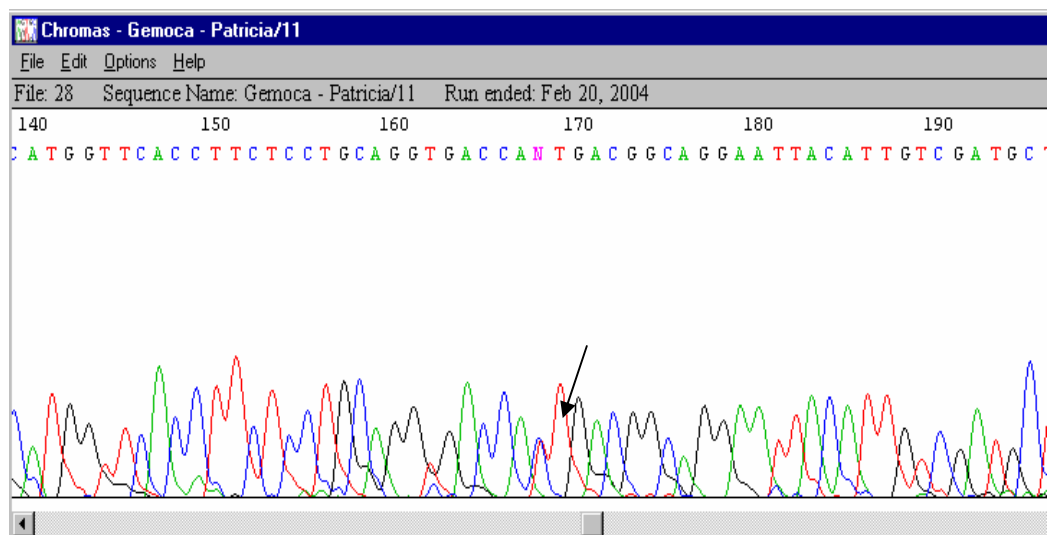


Figura 6- Sequenciamento automático: na base 168 observa-se a leitura de 2 bases simultaneamente, indicando um polimorfismo.

Tabela 7- Sequência do gene NAT2 (retirada do gene bank), os primers utilizados e as trocas de bases detectados durante o sequenciamento automático.

1	tgagatcaact tcccttgcaac agtttgaag ggagagcact ttattacaga ccttgaagc
61	aagaggattg cattcagcct agttcctggt tgctggccaa agggatcatg gacattgaag
121	catattttga aagaattggc tataagaact ctaggaacaa attggacttg gaaacattaa
181	ctgacattct tgagcaccag atccgggctg ttccttga gaacctaac atgcattgtg
241	ggcaagccat ggagttgggc tttagggcta ttttgatca cattgtaaga agaaacggg
301	gtgggtggtg tctccagctc aatcaacttc tgtactgggc tctgaccaca atcggttttc
361	agaccacaat gttaggaggg tatttttca tccctccagt taacaaatac agcactggca
421	tgtttcacct tctcctgcag gtgaccaatg acggcaggaa ttacattgtc gatgctgggt
481	ctggaagctc ctcccagatg tggcagcctc tagaattaat ttctgggaag gacagcctc
541	aggctccttg cttttctgc ttgacagaag agagaggaat ctgtactg gaccaaatca
601	ggagagagca gtatattaca aacaaagaat ttcttaattc tcattcctg ccaaagaaga
661	aacaccaaaa aatatactta ttacgcttg aacctgaac aattgaagat ttgagtcta
721	tgaatacata cctgcagacg tctccaacat cttcatttat aaccacatca tttgttctt
781	tgcagacccc agaagggggt tactgtttgg tgggcttcat cctcacctat agaaaattca
841	attataaaga caatacagat ctggtcagtt taaaactct cactgaggaa gaggttgaag
901	aagtctga aaatatattt aagatttctt tggggagaaa tctcgtcccc aacctggtg
961	atgataccct tactatttag aataaggaac aaaataaac cttgtgtatg taccacca
1021	ctcactaatt atcaacttat gtgctatcag atactctctc taccctcag ttattttgaa
1081	gaaaatccta aacatcaaat actttcatcc ataaaaatgt cagcatttat taaaaacaa
1141	taacttttta aagaacata aggacacatt ttcaaattaa taaaataaa ggcattttaa
1201	ggatggcctg tgattatctt gggagcaga gtgattcatg ctagaaaaca ttaatatgtg
1261	atttattgtt gaattc
	primer1 forward e reverse primer2 forward e reverse
	troca de base (polimorfismo) - detectada em nossos dados preliminares

A região total amplificada delimita no mínimo 12 mutações pontuais importantes na região do NAT2. A análise dos 43 casos estudados através do sequenciamento direto mostrou que havia em todas as amostras um grande número de mutações não-descritas.

Assim, resolvemos modificar nossa estratégia, e passamos a estudar os 6 polimorfismos que a literatura reporta com maior frequência e que possibilitam o reconhecimento fenotípico.

As figuras abaixo, são os géis de agarose à 3% exemplificado os resultados obtidos pelo uso das enzimas de restrição através do produto da PCR descritas anteriormente.

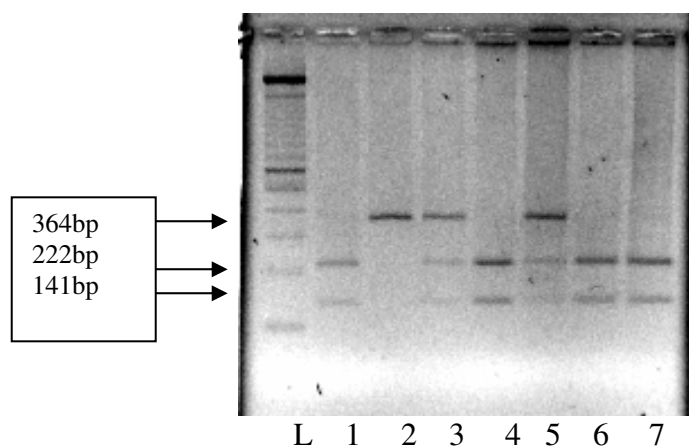


Figura 7- Polimorfismo **C282T: BseGI**. Gel de agarose 3% mostrando os fragmentos de 364pb, 222pb e 141pb utilizando a enzima Bse GI. Os casos 1,4, 6 e 7 são homozigotos normais possuindo apenas os fragmentos de 222pb e 141pb ; os casos 3 e 5 possuem o polimorfismo em heterozigose possuindo apenas os fragmentos de 364pb, 222pb e 141pb e o caso 2 um homozigoto mutante com apenas o fragmento de 364pb.

Figura 8

Figura 9

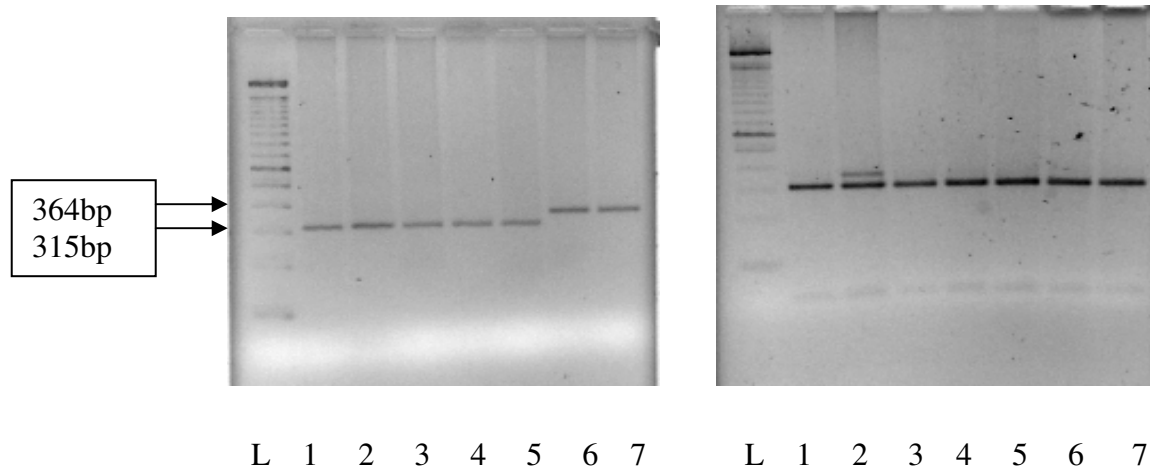


Figura 8 e 9- Polimorfismo G191A: enzima HpaII

Gel de agarose 3%: na Figura 8, as amostras 1 à 5 são indivíduos homozigotos normais e apresentam um fragmento de 315pb e um de 50pb, as amostras 6 e 7 são indivíduos homozigotos mutantes e apresentam apenas um fragmento de 364pb,. Já na Figura 9, as amostras 1, 3 à 7 são indivíduos homozigotos normais e a amostra 2 um indivíduo heterozigose com fragmentos de 364pb e 315pb(as bandas de 50 pb, visíveis no gel da figura 9 não são visualizadas no gel da Figura 8, no entanto este fato não influência na análise dos resultados).

Figura 10

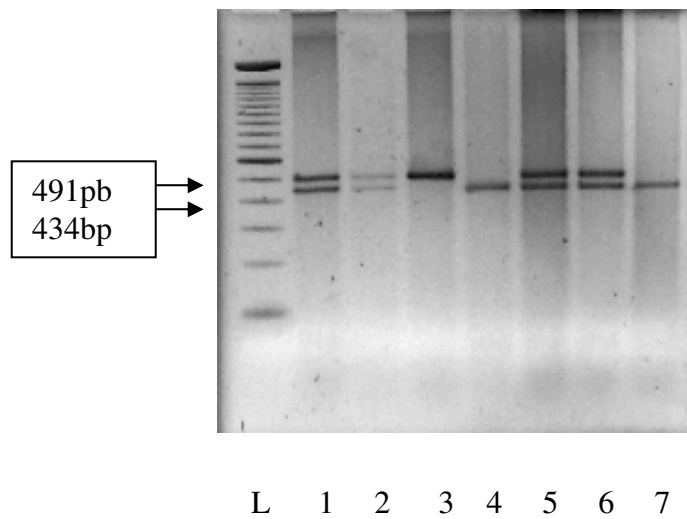


Figura 10- Polimorfismo **T481C**: enzima **KpnI**

Gel de agarose 3%: as amostras 1, 2, 5 e 6 indivíduos heterozigotos que apresentam fragmentos de 491pb e 434pb e. A amostra 3, indivíduo homozigoto normal com apenas um fragmento de 491pb, e as amostras 4 e 7 são amostras de homozigotos mutantes com fragmentos de 434pb .

Figura 11

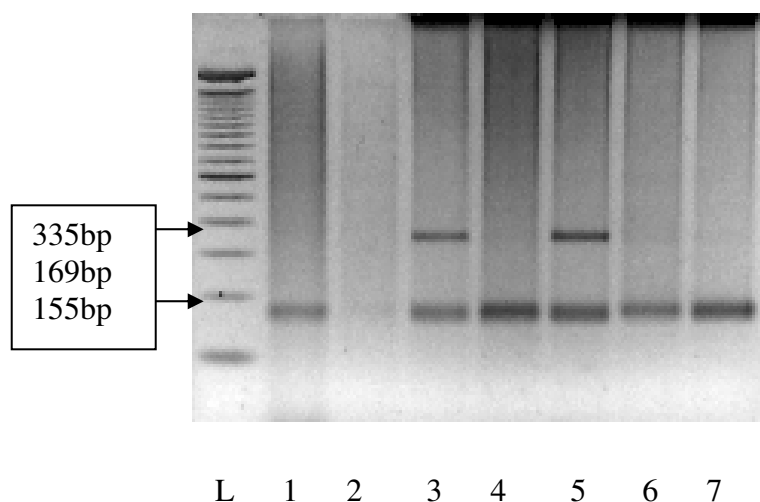


Figura 11- Polimorfismo **G590A**: enzima **TaqI**

Gel de agarose 3%: as amostras 1, 2, 4, 6 e 7 apresentam fragmentos de 165pb, 169pb e 155pb (por serem muito próximas, não são diferenciadas entre si), indicando um homozigoto normal. As amostras 3 e 5 apresentam bandas de 335pb e 155pb, indicando a presença do polimorfismo.

Figura 12

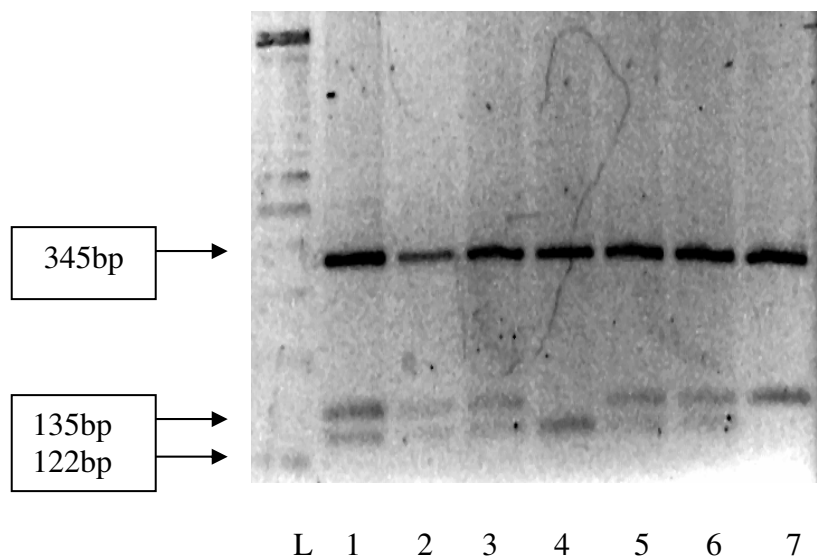


Figura 12- Polimorfismo A803G: enzima DdeI

Gel de agarose 3% : Apenas a amostra 7 apresenta os fragmentos de 345bp e 135bp, indivíduo homozigoto normal. As amostras 1,2,3,5 e 6 apresentam os fragmentos de 345pb, 135pb e 122bp , indivíduos heterozigotos. A amostra 4 apresenta fragmentos de, 345pb e 112pb, indicando um homozigoto mutante .

Figura 13

Figura 14

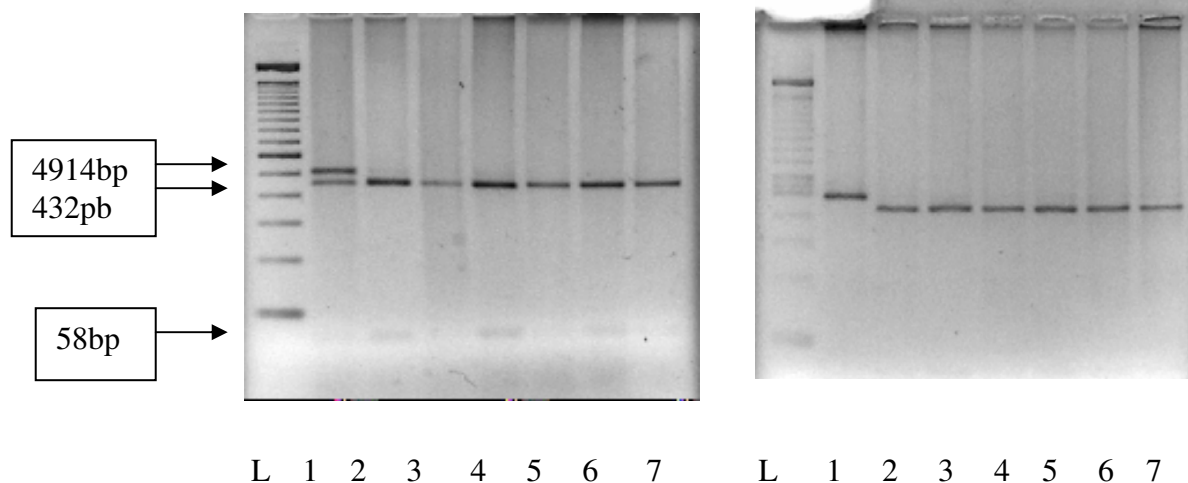


Figura 13 e 14- Polimorfismo G857A: enzima BamHI

Gel de agarose 3%: a amostra 1 da Fig.13 apresenta fragmentos de 491pb, 432pb e 58pb, indicando a presença do polimorfismo em heterozigose. As amostras 2 á 7 da Fig 13 e 14, apresentam fragmentos de 432pb e 58pb, indicando um homozigoto normal. Apenas a amostra 1 da fig.14 é um indivíduo homozigoto mutante possuindo apenas um fragmento de 491pb.

4.2- Pacientes com câncer de próstata

Não houve diferença estatística entre os pacientes com CaP e os controles com HPB em relação respectivamente à idade (média de 64 ± 11 anos e 69 ± 8), raça (82% brancos e 18% não brancos X 80% brancos e 20% não brancos), fumantes e não fumantes (62% fumantes e 38% não fumantes X 60% fumantes e 40% não fumantes). As características demográficas e hábitos alimentares em ambos os grupos, incluindo o consumo de álcool, carne vermelha, vegetais e alimentos gordurosos foram similares, assim como os fatores sociais e a prática de exercício. Contudo, os pacientes com câncer de próstata, eram mais frequentemente indivíduos com idade acima de 60 anos (89% dos casos), enquanto que dos pacientes com hiperplasia prostática benigna apenas 31% estavam na faixa acima dos 60 anos de idade ($\chi^2=14.84$; $p<0.001$). Como esperado, os níveis de PSA foram mais elevados em pacientes com CaP (30 ± 74) do que nos pacientes com HPB (3 ± 3) (MW; $p<0.001$). A maioria dos casos (83%) apresentava-se, ao diagnóstico, com nódulo localizado e tinham tumores com moderado grau de diferenciação (Gleason de 2-6=62% dos casos).

A Tabela 8 mostra a distribuição das variantes alélicas dos 101 pacientes com HPB e 126 com CaP em relação aos 4 polimorfismos estudados, bem como a comparação estatística entre os grupos, considerando-se sempre o genótipo selvagem como referência de normalidade. Frequência, porcentagem, valor de p, OR e 95% de intervalo de confiança, obtidos por regressão logística após ajuste para idade, sexo e cor:

Tabela 8- Distribuição das variantes alélicas de CaP x HBP

Variantes alélicas		Ca. Próstata		HBP		Odds ratio (95%CI)	P
		N	%	N	%		
T481C	Selvagem	50	39.68	24	23.76	2.115	0.0152
	polimórfico	76	60.32	77	76.24	(1.155-3.872)	
G590A	Selvagem	86	68.25	59	58.42	1.385	0.2617
	polimórfico	40	31.75	42	41.58	(0.784-2.445)	
A803G	Selvagem	68	54.40	41	40.59	1.973	0.0186
	polimórfico	57	45.60	60	59.41	(1.120-3.474)	
G857A	Selvagem	102	81.60	95	94.06	4.095	0.0044
	polimórfico	23	18.40	6	5.94	(1.551-10.812)	

Observamos que mutações pontuais de tipo NAT2T481C (76.24%) e NAT2A803G (59.41%) apareceram com maior frequência entre os pacientes controles, com HBP, do que nos CaP (60.32% e 45.60%, $p=0.0152$ e 0.0186 , respectivamente). Ao contrário, NAT2G857A foi mais frequente entre os pacientes com CaP (18.4%) do que os controles com HBP (5.94%; $p=0.0044$). Assim, a presença do polimorfismo NAT2T481C reduz o risco de CaP (OR=2.115; 95%C.I=1.155-3.872). Da mesma forma a presença do polimorfismo NAT2A803G reduz o risco de CaP (OR=1.973; 95%C.I=1.120-3.474; $p=0.0186$). Ao contrário, a presença do polimorfismo G857A aumenta o risco para CaP até 4.0 vezes (OR=4.095; 95%C.I=1.551-10.812).

A Tabela 9 mostra a distribuição genotípica e fenotípica dos 126 pacientes com CaP e 101 pacientes com HPB, bem como a comparação estatística entre os grupos considerando os genótipos combinados:

Tabela 9- Distribuição genotípica e fenotípica de CaP X HBP

Genótipo	Ca. Próstata		HBP		Odds ratio (95%CI)	P
	N	%	N	%		
NAT2*11 A	21	16.67	13	12.87	1.354 (0.6410-2.859)	0.4596
NAT2*12 A	18	14.29	16	15.84	0.8854 (0.4262-1.839)	0.8519
NAT2*12C	16	12.70	21	20.79	0.5541 (0.2720-1.129)	0.1075
NAT2*4	13	10.32	5	4.95	2.209 (0.7600-6.420)	0.2156
NAT2*6B	1	0.79	0	0	2.426 (0.09771-60.247)	1.0000
NAT2*6E	17	13.49	21	20.79	0.5941 (0.2945-1.199)	0.1559
NAT2*7 A	12	9.52	0	0	22.162 (1.295-379.31)	0.0007
Acetilação lenta	13	10.31	0	0	24.145 (1.416-411.63)	0.0007
Acetilação rápida	68	53.96	55	54.45	0.9806 (0.5797-1.659)	1.0000
Desconhecidos	28	22.22	25	24.75	0.8686 (0.4686-1.610)	0.7525

Genótipos de acetilação rápida: NAT2*11A+ NAT2*12A+ NAT2*12C+ NAT2*4

Genótipos de acetilação lenta: NAT2*6B + NAT2*6E+ NAT2*7A.

Em 53 casos (28 CaP e 25 HBP), os fenótipos não puderam ser deduzidos com base nas combinações entre as variantes alélicas que caracterizam as combinações genóticas presentes nos pacientes, já que não existiam na base de dados que compila todos os genótipos registrados: Human NAT2 Alleles Nomenclature Web Page (<http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>).

O fenótipo de acetilação lenta NAT2*7A foi observado em 12 pacientes com CaP (9.52%), mas não apareceu em nenhum paciente controle de HBP ($p=0.0007$). Resultado semelhante também foi encontrado no genótipo NAT2*6B de acetilação lenta que ocorreu em apenas 1 caso de CaP e em nenhum paciente controles de HBP. Assim, a presença de um fenótipo de acetilação lenta aumentou o risco para câncer de próstata em 24 vezes ($OR=24.145; 95\%CI=1.416-411.63$).

Não conseguimos encontrar correlação entre fumo, dieta e agressividade de tumor (Gleason) com nenhum dos genótipos estudados. Também analisamos a correlação entre os diferentes genótipos encontrados em CaP com a idade do diagnóstico, parâmetros de agressividade do tumor como o escore de Gleason, estadió e os níveis de PSA, sem encontrar qualquer associação.

4.3- Pacientes com câncer de tireóide

Também não houve diferença estatística entre os pacientes com CDT e os controles em relação à idade (43,43 *versus* 46,94 anos), cor (84,89 % brancos e 15,10 % não-brancos *versus* 79,32 % brancos e 20,67 % não-brancos), hábito de fumar (26,72 % fumantes e 73,27% não-fumantes *versus* 25,59 % fumantes e 74,40% não-fumantes). As características demográficas e o estilo de vida dos indivíduos incluídos nos 2 grupos, o dos pacientes e o controle, também foram iguais, incluindo o consumo de álcool, carnes vermelhas, vegetais e gorduras, educação e atividades físicas. O envolvimento de linfonodos ao diagnóstico foi mais frequente nos casos de CP (39%) do que nos CF (6%) (X^2 ; $p<0.05$). Entretanto, estes últimos apresentavam metástases à distância ao diagnóstico com maior frequência (53%) do que os CP (16%) (X^2 ; $p<0.02$). Não houve diferença

significativa em relação aos parâmetros de seguimento, embora tenham se observado metástase a distância e/ou recorrência em 50% dos CF contra 30% dos CP (X^2 ; $p=0.13$).

A Tabela 10 mostra a distribuição das seis variantes alélicas estudadas em pacientes com CDT *versus* controles, bem como a comparação estatística entre os grupos. Frequência, porcentagem, valor de p, OR e 95% de intervalo de confiança, obtidos por regressão logística após ajuste para idade, sexo e cor, de 139 casos de CDT e 179 controles, considerando-se sempre o genótipo selvagem como referência de normalidade.

Tabela 10- Distribuição das varintes alélicas de CDT X Controles

Variantes Alélicas		CaTireóide		Controles		Odds ratio (95%CI)	P
		N	%	N	%		
T481C	selvagem	47	33.81	58	32.40	0.938	0.7905
	polimórfico	92	66.19	121	67.60	(0.586-1.502)	
G590A	selvagem	86	61.87	95	53.07	0.697	0.1166
	polimórfico	53	38.13	84	46.93	(0.444-1.094)	
A803G	selvagem	74	53.24	122	68.16	1.880	0.0069
	polimórfico	65	46.76	57	31.84	(1.189-2.973)	
G857A	selvagem	129	92.81	165	92.18	0.914	0.8346
	polimórfico	10	7.19	14	7.82	(0.393-2.125)	
G191A	selvagem	132	94.96	133	74.30	0.153	0.0001
	polimórfico	7	5.04	46	25.70	(0.067-0.352)	
C282T	selvagem	92	66.19	57	31.84	0.239	0.0001
	polimórfico	47	33.81	122	68.16	(0.149-0.382)	

Observamos que mutações pontuais de tipo A803G aparecem com maior frequência entre os casos de CDT (46.76) do que nos controles (31.84) ($p=0.0069$), enquanto que mutações pontuais de tipo G191A e C282T são mais frequentes nos controles 25,70% e 68.16% dos casos, respectivamente) do que nos casos (5,04% e 33,81%, respectivamente) ($p=0,0001$).

Assim, a herança do polimorfismo A803G representa um risco de 1.8 vezes maior de desenvolver CDT (OR= 1.880; 95% IC= 1.189-2.973). Por outro lado, a herança dos polimorfismos G191A e C282T do gene NAT2 representam um fator de proteção de cerca de 80% contra o risco de desenvolver um CDT (OR=0.153; 95% IC=0.067-0.352 e OR=0.239; 95% IC=0.149-0.382, respectivamente).

Para melhor avaliarmos a correlação entre as variantes alélicas com o tipo histopatológico do CDT, analisamos em separado os pacientes com CDT do tipo papilífero (CP), apresentados na tabela 11, e de tipo folicular (CF), apresentados na Tabela 12.

Tabela 11- Frequência, porcentagem, valor de p, OR e 95% de intervalo de confiança, obtidos por regressão logística após ajuste para idade, sexo e cor, de 112 casos de CP, considerando-se sempre o genótipo selvagem como referência de normalidade.

	Variante Alélica	Ca. Pap		Controles		Odds ratio (95%CI)	P
		N	%	N	%		
T481C	selvagem	36	32.14	58	32.40	1.012	0.9633
	polimórfico	76	67.86	121	67.60	(0.611-1.677)	
G590A	selvagem	71	63.39	95	53.07	0.653	0.0843
	polimórfico	41	36.61	84	46.93	(0.403-1.059)	
A803G	selvagem	60	53.57	122	68.16	1.855	0.0128
	polimórfico	52	46.43	57	31.84	(1.140-3.018)	
G857A	selvagem	105	93.75	165	92.18	0.6150	0.6150
	polimórfico	7	6.25	14	70.82	(0.307-2.011)	
G191A	selvagem	107	95.54	133	74.30	0.135	0.0001
	polimórfico	5	4.46	46	25.70	(0.052-0.352)	
C282T	selvagem	74	66.07	57	31.84	0.240	0.0001
	polimórfico	38	33.93	122	68.16	(0.145-0.396)	

Novamente observamos que mutações pontuais de tipo A803G aparecem com maior frequência entre os casos de CDT (46.43%) do que nos controles (31.84%) ($p=0.0128$), mostrando que o risco de CDT para polimorfismos de A803G é devido à sua presença nos CP. O risco de um portador de polimorfismos A803G desenvolver um CP é 1.8 vezes maior do que a população controle por nós estudado ($OR= 1.855$; 95% IC=1.140-3.018). Por outro lado, a herança dos polimorfismos G191A e C282T do gene NAT2 continuam representando um fator de proteção de cerca de 80% contra o risco de

desenvolver um CP (OR=0.135; 95% IC=0.052-0.352 e OR=0.240; 95% IC=0.145-0.396, respectivamente com um de p=0.0001).

Na Tabela 12 temos a frequência, porcentagem, valor de p, OR e 95% de intervalo de confiança, obtidos por regressão logística após ajuste para idade, sexo e etnia, de 27 casos de CF, considerando-se sempre o genótipo selvagem como referência de normalidade.

Tabela 12- Distribuição variantes alélicas de CF X Controles

Variantes Alélicas		Ca. Folicular		Controles		Odds ratio (95%CI)	P
		N	%	N	%		
T481C	Selvagem	11	40.74	58	32.40	0.697	0.3937
	polimórfico	16	59.26	121	67.60	(0.304-1.597)	
G590A	Selvagem	15	55.56	95	53.07	0.905	0.8095
	polimórfico	12	44.44	84	46.93	(0.401-2.042)	
A803G	selvagem	14	51.85	122	68.16	1.987	0.0997
	polimórfico	13	48.15	57	31.84	(0.877-4.503)	
G857A	selvagem	24	88.89	165	92.18	1.473	0.5646
	polimórfico	3	11.11	14	70.82	(0.394-5.506)	
G191A	selvagem	25	92.59	133	74.30	0.231	0.0523
	polimórfico	2	7.41	46	25.70	(0.053-1.015)	
C282T	selvagem	18	66.67	57	31.84	0.234	0.0009
	polimórfico	9	33.33	122	68.16	(0.099-0.552)	

Embora a presença do polimorfismo C191A fique próxima de atingir significância estatística, só observamos associação entre a presença do polimorfismo C282T e o risco de CDT. Assim, no grupo de pacientes com CF, este polimorfismo é bem menos frequente (33.33%) do que nos controles (68,16%), sugerindo que ele sirva como fator de proteção, diminuindo o risco de desenvolvimento de um CF em 76,6% (OR= 0.234; 95% IC= 0.099-0.552).

Na Tabela 13 vemos diferentes combinações genotípicas encontradas em nossas amostras obtidos por regressão logística após ajuste para sexo , idade e etnia.

Tabela 13- Distribuição genotípica de CDT X Controles.

Genótipo	Controles		Ca. Tireóide		Odds ratio (95%CI)	P
	N	%	N	%		
NAT2*11 A	10	5.6	21	15.1	3.008 (1.366-6.621)	0.0068
NAT2*12 A	6	3.4	20	14.4	4.486 (1.889-12.430)	0.0007
NAT2*12B	6	3.4	2	1,4	0.4209 (0.08361-2.119)	0.4734
NAT2*12C	9	5.0	13	9.4	1.949 (0.8077-4.702)	0.1806
NAT2*13	7	3.9	1	0.7	0.1781 (0.02164-1.465)	0.1445
NAT2*14A	3	1.7	0	0	0.1807 (0.009252-3.531)	0.2595
NAT2*14B	5	2.8	0	0	0.1137 (0.006230-2.076)	0.0704
NAT2*14D	3	1.7	0	0	0.1807 (0.009252-3.531)	0.2595
NAT2*14E	1	0.6	1	0.7	1.290 (0.07991-20.820)	1.0000
NAT2*14G	2	1.1	0	0	0.2545 (0.01211-5.348)	0.5064

NAT2*4	7	3,9	15	10.8	2.972 (1.177-7.508)	0.0242
NAT2*5D	2	1.1	0	0	0.2545 (0.01211-5.348)	0.5064
NAT2*5J	1	0.6	1	0.7	1.290 (0.07991-20.820)	1.0000
NAT2*6A	3	1.7	0	0	0.1807 (0.009252-3.531)	0.2595
NAT2*6B	2	1.1	2	1.4	1.292 (0.1796-9.293)	1.0000
NAT2*6C	2	1.1	3	2,2	1.952 (0.3216-11.852)	0.6567
NAT2*6E	0	0	6	7.3	17.479 (0.9755-313.21)	0.0066
NAT2*7B	0	0	1	0.7	3.888 (0.1571-96.254)	0.4371
Desconhecido	110	61.5	53	38.1	0.3866 (0.2450-0.6099)	0.0001
Acetilação lenta	17	9.5	4	2.9	0.1876 (0.05988-0.5877)	0.0020
Acetilação rápida	59	33	74	53.2	5.331 (1.702-16.699)	0.0020
Desconhecidos	103	57.5	61	43.9	0.5770 (0.3689-0.9026)	0.0177

Em 163 casos (110 controles e 53 CDT), algumas combinações entre as variantes alélicas que encontramos em nossas amostras e que caracterizam as combinações genótípicas não puderam ser classificadas, assim como 164 fenótipos (103 controles e 61 CDT), já que não existiam na base de dados que compila todos os genótipos registrados: Human NAT2 Alleles Nomenclature Web Page (<http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>) (ver anexo 1).

Em relação aos genótipos deduzidos com base nos polimorfismos observados, análise de regressão logística univariada com correção para idade, sexo, etnia e fumo, demonstrou que indivíduos com o fenótipo de acetilação rápida foram mais frequentes entre os CDT (93,85%) do que nos controles (77,63%; $p=0.0174$), enquanto que o fenótipo de acetilação lenta, aparece em 22,37% dos controles, mas em apenas 6,15% dos CDT ($p=0.0085$).

Assim, a presença de um fenótipo de acetilação rápida aumenta o risco da CDT em quase 5 vezes ($OR=4.661$; 95%IC= 1.309-16.239). Este risco só é observado entre os CP (Tabela15), os quais, considerados como grupo, apresentam um risco maior que 3 vezes de desenvolverem câncer do que na população controle estudada ($OR=3.794$; 95%IC=1.076-13.379). No entanto, a análise de 11 casos de carcinoma folicular pareados para idade, sexo, etnia e fumo com 68 controles mostrou que a influência do fenótipo de acetilação não pode ser comprovada neste fenótipo tumoral.

Na Tabela 14 vemos a frequência , porcentagem , valor de p, OR e 95% de intervalo de confiança , obtidos por regressão logística univariada após ajuste para idade, sexo, cor e fumo de 56 casos de CP comparados com 68 controles pareados.

Tabela 14- Fenótipo rápido X lento de CP e controles

Fenótipo	CP (N)	Controles (N)	P	OR	95% C.I
Acetilação Rápida					
vs	56	68	0.0381	3.794	1.076-13.379
Lenta					

5- DISCUSSÃO

A análise de polimorfismos de genes codificadores de proteínas envolvidas com a metabolização de compostos xenobióticos é sempre complicada pela necessidade de obtenção de um grupo controle pareado para condições ambientais, exposições domiciliares, no lazer e no trabalho a toda sorte de produtos químicos, agentes físicos e biológicos. Além disso, os casos devem ser sempre pareados com os controles para os clássicos fatores que influenciam na distribuição dos polimorfismos gênicos, como raça, idade e sexo. Em nossos questionários feita aos pacientes, não incluímos o consumo de carne bem cozida, porque os critérios de avaliação são complexos e possuem muitas variantes (Norrish *et al.*, 1999). Há poucos estudos epidemiológicos referentes ao consumo de carne bem passada e o risco de câncer. Encontramos apenas referência à relação com o câncer de mama (Zheng *et al.*, 1998) e cólon retal (Schiffman e Felton, 1990; Gerhardsson *et al.*, 1991).

No estudo dos polimorfismos de NAT2 em CaP, utilizamos os HBPs como controles. Sabemos que 50% dos homens com idade entre 51-60 anos e 90% dos homens com idade superior a 80 possuem evidências histopatológicas de HBP (Guess *et al.*, 1990; Kato *et al.*, 1967). Por outro lado, a prevalência do CaP também é maior em faixas etárias mais avançadas (Guess *et al.*, 1990; Kato *et al.*, 1967). Muitos estudos utilizam populações controle em que apenas a resposta do próprio indivíduo a respeito de sua história clínica de patologia prostática é considerada suficiente para classificá-lo como controle (Agalliu *et al.*, 2006). Outros utilizam a medida de PSA que, como sabemos, pode mostrar um resultado falso com relativa frequência (Cox *et al.*, 2006). O método ideal de seleção da população controle seria, obviamente, uma população com biópsia prostática mostrando ausência de HBP ou de CaP. Como isso é, eticamente impossível, pois não se justifica submeter a uma biópsia prostática um paciente sem queixas sugestivas de patologia prostática, decidimos utilizar os pacientes com HBP como controles dos pacientes com CaP.

Em relação ao CDT, a obtenção do grupo controle foi um pouco mais fácil já que, sendo uma glândula de fácil palpação, o exame direto do pescoço do paciente diminui bastante a chance de estarmos diante de um caso de nódulo benigno ou maligno da tireóide. Poderíamos argumentar que o grupo ideal seria um grupo controle mostrando tireóide

normal ao ultra-som. Mas, de novo, não haveria indicação para submeter ao exame ultra-sonográfico pacientes sem queixas ou evidências de patologias tireoidianas. Assim, optamos por usar apenas o critério clínico na avaliação deste grupo controle. Tomamos o cuidado de utilizar grupos controles de tamanho superior ao dos casos, buscando assim diminuir a influência de qualquer viés advindo da mescla de casos não detectados entre os controles.

Os polimorfismos da acetilação de NAT2 são muito importantes na toxicologia e farmacologia clínica em razão de seu papel primário na ativação e/ou desativação de um grande e diverso número de drogas, incluindo hidrazinas e aminas aromáticas usadas na prática clínica (Hein *et al.*, 2000).

A alta frequência de polimorfismos de acetilação da NAT1 e NAT2 em populações humanas juntamente com exposição as aminas aromáticas e heterocíclicas sugerem que os genótipos de acetilação de NAT1 e NAT2 são modificadores importantes da suscetibilidade humana ao câncer. O polimorfismo humano da N-acetilação é uma característica genética fenotipicamente refletida pelas diferenças na atividade da N-acetiltransferase (NAT) em vários agentes terapêuticos. O polimorfismo da acetilação provém das variações alélicas no gene da arilamina N-acetiltransferase 2 (NAT2), que resulta na produção de proteínas NAT2 com atividade ou estabilidade enzimática variáveis (Anitha e Banerjee, 2003).

Infelizmente, a interpretação da influência dos diferentes genótipos e dos diversos fenótipos resultantes é bastante difícil. Diferentes autores classificam os fenótipos de forma distinta e utilizam diferentes parâmetros inferindo assim, fenótipos apartir das combinações de algumas variantes alélicas sem se basearem na técnica correta de leitura dos compostos metabolizados pela enzima NAT2 apartir da técnica de HPLC descrita anteriormente (Costa *et al.*, 2005; Srivastava e Mittal RD, 2005; He *et al.*, 2005; Lee Mu e Park 2003; Alberg, *et al.*, 2004). No presente estudo, preocupamo nos em classificar nossos resultados com base apenas em trabalhos em que a classificação de fenotipagem foi feita com base na leitura de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), e não como inferência simples de fenótipo a partir de fenótipos conhecidos (Vatsis, 1995).

Os diferentes fenótipos de acetilação (rápido, intermediário e lento) são determinados pela combinação de uma ou mais substituições, e a distinção dos fenótipos é complexa e depende da sensibilidade e especificidade do método utilizado (Hein et al., 2000). Nos resultados obtidos por Hein 2000, os fenótipos de acetilação lenta em humanos não são homogêneos e consistem em múltiplos fenótipos dependentes da herança específica de SNPs e alelos (Hein et al, 2000). Um estudo feito em mulheres coreanas classificou como acetiladores rápidos indivíduos que possuíam uma alta atividade em 2 alelos de NAT2, indivíduos intermediários aqueles que possuíam um destes alelos e indivíduos com acetilação lenta aqueles que não possuíam nenhum desse alelos (Lee Mu e Park 2003). Uma série de estudos baseia a caracterização fenotípica na identificação de 2, 3 ou 4 polimorfismos (Kukongviriyapan *et al*, 2004; Skretkowicz *et al*, 2005; Chiou *et al*, 2005 ; Sorensen *et al*, 2005). Também existem diferentes maneiras de combinar os polimorfismos para fins de sua classificação fenotípica. Alberg e colaboradores, também utilizando um conjunto de 4 polimorfismos (G191A, C481T, G590A e G857A), analisaram seus resultados da seguinte maneira: pacientes com 2 ou mais polimorfismos associados ao fenótipo de acetilação lenta foram classificados como acetiladores lentos; pacientes que tinham apenas 1 polimorfismo associado ao fenótipo acetilador lento foram classificados como intermediários e aqueles que não apresentaram nenhum polimorfismo considerado lento foram classificados como acetiladores rápidos (Alberg *et al*, 2004). Outros pesquisadores utilizaram um conjunto ainda menor de polimorfismos. Costa e colaboradores utilizaram a técnica de PCR-RFLP com apenas 2 polimorfismos, C480T e G590A (Costa et al., 2005). Cascorbi e Roots, estudando populações centro-europeias, afirmaram que apenas dois polimorfismos (C282T e T341C) são necessários para predizer o fenótipo de NAT2. Segundo estes autores, estes polimorfismos determinam o fenótipo acetilação lenta (alelos NAT2*6A, *7B e *14B, assim como *5A, *5B e *5C, respectivamente). No entanto, também afirmaram que, em populações negras, o polimorfismo G191A também deve ser verificado, pois determina os alelos *14A e *14B, sendo extremamente raro em caucasianos e nunca encontrado em orientais (Cascorbi e Roots, 1999). Belogubova utiliza 6 dos 7 polimorfismos que empregamos e, da mesma forma, afirma que desta maneira é possível cobrir todas as variantes alélicas de NAT2 em caucasianos (Belogubova, *et al.*, 2005).

Em nossa população, uma percentagem muito elevada (quase 60% dos casos e dos controles) apresenta genótipos que não estão depositados no banco de dados internacional. Assim, acreditamos que seja necessária a fenotipagem dos genótipos não catalogados na Human NAT2 Alleles Nomenclature Web Page (<http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>) no sentido de demonstrar o significado funcional dos genótipos encontrados em nossa população por meio da técnica de HPLC.

Nossos resultados, tanto em próstata quanto em tireóide, mostram que a genotipagem para NAT2 pode identificar indivíduos de risco maior ou menor para ambos os tipos de neoplasia. Os genótipos acetiladores rápidos NAT2 *11 A e NAT2 *12 A protegem contra o câncer de próstata. Já o fenótipo de acetilação lenta NAT2 *7A foi mais freqüente nos casos de adenocarcinoma da próstata (18.40%) do que nos controles (5.94%), podendo ser um genótipo de risco importante já que aumenta a predisposição para câncer da próstata em mais de 4 vezes (OR=4.095; 95% C.I= 1.551-10.812; p=0.0044).

Hamasaki et al., 2003 estudaram 3 (T481C, G857A, G590A) dos polimorfismos estudados por nós e também encontrou significância no risco de câncer entre os seus casos com o fenótipo de acetilação lenta na população japonesa. Sua frequência foi de 17.1% nos CaPs comparados a 8.6% dos controles benignos, um risco de até 2.2 vezes de desenvolver câncer de próstata. Este risco aumentava mais ainda entre os fumantes, chegando a 3.78 vezes.

Costa et al., 2005 estudou 2 polimorfismos (T481C, G590A) na população sul européia com câncer de próstata e encontrou significância no genótipo NAT2*6/NAT2*6, também um fenótipo de acetilação lenta.

Indivíduos com fenótipos de acetilação lenta possuem uma baixa atividade enzimática e conseqüentemente, uma baixa capacidade de metabolizar carcinógenos. Muitas das N-hidroxí aminas heterocíclicas são potencialmente carcinógenas e necessitam ser metabolizadas pela enzima NAT2, podendo estar implicadas no câncer da próstata (Cascorbi et al., 1995; Hein et al, 1993, 1994; Wang *et al*, 1999 e Lawson e Kolar, 2002).

Já no caso do câncer de tireóide, não existe nenhum estudo relacionado à susceptibilidade para CDT, correlacionando genótipos ou fenótipos de NAT2. Nossos dados demonstram que, ao contrário do que ocorreu nos CaP, os fenótipos acetilação rápida aumentaram a suscetibilidade ao CDT, influenciando o risco de CP. Assim como no CaP, observamos que alguns genótipos protegem contra o risco de CDT enquanto que o polimorfismo A803G aumenta consideravelmente o risco de desenvolvimento da doença. Existem evidências experimentais em animais de que os polimorfismos do gene NAT2 modulam a resposta à radiação ionizante, tornando o estudo de seus polimorfismos extremamente interessante no CDT (Kassayova et al.,1993). Recentemente, Hernandez A e colaboradores estudaram 30 pacientes com CDT que receberam radiação ionizante terapêutica. Encontraram uma associação significativa entre a presença do fenótipo de acetilação lenta e danos ao DNA, que foram observados por meio da presença de micronúcleos celulares. Os danos ao DNA eram consideravelmente menores nos pacientes com o genótipo NAT2*7, um genótipo de acetilação lenta. Estes dados corroboram nossos achados que mostram que a acetilação rápida é, realmente, um fator de risco para CDT (Hernandez *et al*,2006).

6- CONCLUSÃO

Demonstramos que alguns genótipos estão significativamente associados ao risco ou proteção contra o desenvolvimento do câncer da próstata e da tireóide na população estudada. Mais ainda, concentrando-nos nos fenótipos conhecidos, mostramos que pacientes com o fenótipo de acetilação lenta apresentam maior risco no desenvolvimento de CaP enquanto que pacientes com o fenótipo de acetilação rápida apresentam maior risco no desenvolvimento de CDT.

Tanto o CaP quanto o CDT podem ser encontrados com uma frequência bastante grande em casos de autópsia ou cirurgias não relacionadas a câncer (Matos et al, 2006; Soos, *et al* 2005). Assim, é imperativo o estudo de marcadores moleculares que permitam definir indivíduos de risco para tal evolução clínica.

É possível que os polimorfismos de NAT2 possam vir a contribuir, juntamente com outros fatores, na determinação destas populações de risco que, assim, poderiam se beneficiar de medidas preventivas.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agalliu I, Langeberg WJ, Lampe JW, Salinas CA, Stanford JL. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and prostate cancer risk in middle-aged men. *Prostate* 2006; 66(2):146-56.

Agundez JA, Olivera M, Martinez C, Ladero JM, Benitez J. Identification and prevalence study of 17 allelic variants of the human NAT2 gene in a white population. *Pharmacogenetics*. 1996; 6(5):423-8.

Akazaki k, Stermmernann GN. Comparative study of latent carcinoma of the prostate among japonese in Japan and Hawaii. *J Natl Cancer Inst.* 1973; 50: 1137-1144.

Alberg AJ, Daudt A, Huang HY, Hoffman SC, Comstock GW, Helzlsouer KJ et al. N-acetyltransferase 2 (NAT2) genotypes, cigarette smoking, and the risk of breast cancer. *Cancer Detect Prev.* 2004; 28(3):187-93.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. *Biologia Molecular da célula*. 3ª Ed. Artes Médicas, 1997. p.911-946.

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Fundamentos da biologia celular. In: *Essential cell biology: an introduction to the molecular biology of the cell*, Garland Publishing. São Paulo: Artes Médicas Sul LTDA; 1999. p.582-593.

Alitalo K, Schwab M. Oncogene amplification in tumor cells. *Cancer Res* 1986; 47:235.

Ames BN, Gold LS. Carcinogenesis debate. *Science*. 1990; 250(4987): 1498-9.

Anitha A, Banerjee M. Arylamine N-acetyltransferase 2 polymorphism in the ethnic populations of South India. *Int J Mol Med*. 2003; 11(1):125-31.

Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res*. 2000; 464: 65–76.

Babaian RJ, Kojima M, Ramirez EI, Johnston D. Comparative analysis of prostate specific antigen and its indexes in the detection of prostate cancer. *J Urol* .1996;156: 432-437.

Baron E, Angrist A. Incidence of occult adenocarcinoma of the prostate after fifty years of age. *Arch Pathol*. 1941; 32: 787-793.

- Belogubova EV, Kuligina ESH, Togo AV, Karpova MB, Ulibina JM, Shutkin VA, et al. Comparison of extremes approach provides evidence against the modifying role of NAT2 polymorphism in lung cancer susceptibility. *Cancer Lett.* 2005; 221(2):177-8.
- Berthou F, Guillois B, Riche C, Dreano Y, Jacqz-Aigrain E, Beaune PH. Interspecies variations in caffeine metabolism related to cytochrome P4501A enzymes. *Xenobiotica.* 1992; 22(6):671-80.
- Beveridge WI, Sobin LH. International histological classification of tumours of domestic animals introduction. *Bull World Health Organ* 1974; 50(1-2):1-6.
- Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987; 235:305-311.
- Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991; 64:235-248.
- Bisi H, Ruggeri GB, Longatto Filho A, De Camargo RY, Fernandes VS, Abdo AH. Neoplastic and non-neoplastic thyroid lesions in autopsy material: historical review of six decades in Sao Paulo, Brazil. *Tumori* 1998; 84: 499-503.
- Blum M, Demierre A, Grant DM, Hein M, Meyer UA. Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 5237-5241.
- Bodiwala D, Luscombe CJ, French ME, Liu S, Saxby MF, Jones PW, Ramachandran S, Fryer AA, Strange RC. Susceptibility to prostate cancer: studies on interactions between UVR exposure and skin type. *Carcinogenesis* 2003; 24: 711-717.
- Boobis AR, Lynch AM, Murray S, De La Torre R, Solans A, Farre M, et al. Cyp1a2-catalyzed conversion of dietary heterocyclic amines to their proximate carcinogens is their major route of metabolism in humans. *Cancer Res* 1994; 54(1): 89-94.
- Boone RT, Fan CY, Hanna EY. Well-differentiated carcinoma of the thyroid. *Otolaryngol Clin North Am* 2003; 36:73-90.
- Bosch TM, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. Genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes and drug transporters in the chemotherapeutic treatment of cancer. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45(3): 253-85.
- Brawley OW, Thompson IM. The chemoprevention of prostate cancer and the Prostate Cancer Prevention Trial. *Cancer Treat Res* 1996; 88:189-200.

Campbell ME, Spielberg SP, Kalow W. A urinary metabolite ratio that reflects systemic caffeine clearance. *Clin Pharmacol Ther* 1987; 42(2):157-65.

Carbone M, Pass HI. Multistep and multifactorial carcinogenesis: when does a contributing factor become a carcinogen? *Semin Cancer Biol* 2004; 14(6): 399-405.

Cardis E, Kesminiene A, Ivanov V, Malakhova I, Shibata Y, Khrouch V, Drozdovitch, et al. Risk of Thyroid Cancer After Exposure to ¹³¹I in Childhood. *Journal of the National Cancer Institute* 2005; 97: 10.

Carter, BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(8):3367-71.

Carter BS, Bova, GS, Beaty TH, Steinberg, GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol* 1993; 150(3):797-802.

Carter H, Isaacs W. Improved Biomarkers for Prostate Cancer: A Definite Need. *Journal of the National Cancer Institute* 2004; 96 (11) 813-815.

Cartwright RA, Glashan RW, Rogers HJ, Ahmad RA, Barhahall D, Higgins E, Kahn M. A role os N-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: a pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet* 1982; 2: 842-846.

Cascorbi I, Brockmoller J, Mrozikiewiez PM, Muller A, Roots I. Arylamine N-acetyltransferase activity in man. *Drug Metab Rev* 1999; 31: 489-502.

Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmoller J, Maurer A, Sperling K, Roots I. Arylamine n-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am J Hum Genet* 1995; 57(3):581-92.

Cascorbi I, Roots I, Pitfall I. N-acetyltransferase 2 genotyping. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 123-127.

Casella C, Fusco M. Thyroid Cancer. *Epidemiol Prev* 2004; 28:88-91.

Chan, JM, Giovannucci EL. Vegetables, fruits, associated micronutrients, and risk of prostate cancer. *Epidemiol Rev* 2001; 23:82-6.

- Chen B, Zhang WX, Cai WM. The influence of various genotypes on the metabolic activity of NAT2 in Chinese population. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 62(5):355-359.
- Chen J, Stampfer MJ, Hough HL, Garcia-Closas M, Willett WC, Hennekens CH, Kelsey KT, Hunter DJ. A prospective study of N-acetyltransferase genotype, red meat intake, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58(15):3307-11.
- Chen L, Stacewicz-Sapuntzakis M, Duncan C. et al. Oxidative DNA damage in prostate cancer patients consuming tomato sauce-based entrees as a whole-food intervention. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1872-9.
- Chiou HL, Wu MF, Chien WP, Cheng YW, Wong RH, Chen CY, Lin TS, Lee H. NAT2 fast acetylator genotype is associated with an increased risk of lung cancer among never-smoking women in Taiwan. *Cancer Lett* 2005; 223(1):93-101.
- Chou HC, Lang NP, Kadlubar FF. Metabolic activation of N-hydroxy arylamines and N-hydroxy heterocyclic amines by human sulfotransferase(s). *Cancer Res* 55(3):525-9, 1995.
- Chow SM, Law SC, Au SK, Mang O, Yau S, Yuen KT, Lau WH. Changes in clinical presentation, management and outcome in 1348 patients with differentiated thyroid carcinoma: experience in a single institute in Hong Kong, 1960-2000. *Clin Onco* 2003; 15: 329-36.
- Clapper ML. Genetic polymorphism and cancer risk. *Curr Oncol Rep* 2000; 2(3): 251-6.
- Clark, LC, Combs GF, Jr Turnbull BW et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: A randomized controlled trial. *Jama* 1997; 277:1520.
- Clark LC, Dalkin B, Krongrad, A, Combs GF Jr, Turnbull BW, Slate EH, et al. Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. *Br J Urol* 1998; 81:730-4.
- Costa S, Pinto D, Morais A, Vasconcelos A, Oliveira J, Lopes C, Medeiros R. Acetylation genotype and the genetic susceptibility to prostate cancer in a southern European population. *Prostate* 2005; 64(3):246-52.

- Cox B, Sneyd MJ, Paul C, Skegg DC. Risk factors for prostate cancer: A national case-control study. *Int J Cancer*. 2006 Apr 27.
- DeGroot LJ, Kaplan EL, Shukla MS, Salti G, Straus FH. Morbidity and mortality in follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(10): 2946-53.
- Deguchi T, Mashimo M, Susuki T. Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine N-acetyltransferase in human liver. *J Biol Chem* 1990; 265: 12757-12760.
- Dhom G. Frühe Neoplastische Veränderungen der Prostata. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1979; 63: 218-231.
- Drinkwater NR, Bennett IM. Genetic control of carcinogenesis in experimental animals. *Prog Exp Tumor Res* 1991; 33: 1-20.
- Ekmam P. Genetic and environment factors in prostate cancer genesis: identifying high-risk cohorts. *Eur Urol* 1999; 35: 362-369.
- Eszlinger M, Krohn K, Frenzel R, Kropf S, Tonjes A, Paschke R. Gene expression analysis reveals evidence for inactivation of the TGF-beta signaling cascade in autonomously functioning thyroid nodules. *Oncogene* 2004; 23(3):795-804.
- Eszlinger M, Krohn K, Kratzsch J, Voigt C, Paschke R. Growth factor expression in cold and hot thyroid nodules. *Thyroid* 2001; 11(2): 125-35.
- Evans DAP. N-acetyltransferase. *Pharmacol Ther* 1989; 42(2): 157-234.
- Evans DAP, White TA. A human acetylation polymorphism. *J Lab Clin Med* 1964; 63: 394-403.
- Fearon, ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.
- Figge J, Wartofsky L. Thyroid Cancer: a comprehensive guide to clinical management. *Towota Epidemiology of thyroid cancer*. 1999; 77-83.
- Franks LM. Etiology, epidemiology, and pathology of prostate cancer. *Cancer* 1973; 32: 1092-1095.

- Franks LM. Latent carcinoma of the prostate. *J Pathol Bacterio* 1954; 1 (68): 603-616.
- Fretland AJ, Doll MA, Gray K, Feng Y, Hein DW. Cloning, sequencing, and functional expression of NAT1, NAT2 and NAT3 derived from C3H/HeJ (rapid) and A/HeJ (slow) acetylator inbred mouse : functional characterization of the activation and deactivation of aromatic amine carcinogens. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 142: 360-366.
- Fretland AJ, Leff MA, Doll MA, Hein DW. Functional characterization of human N-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms .*Pharmacogenetics* 2001; 11: 207-215.
- Friedman GD, Ury HK. Screening for possible drug carcinogenicity: second report of findings. *J. Natl. Cancer Inst* 1983; 71: 1165-1175.
- Furlanetto TW, Peccin S, De O Schneider MA, Dos S Zimmer A, Dos Reis PS, Genro SK. Prevalence of thyroid nodules in 40 years-old or old women. *Rev Assoc Med Bras* 2000; 46: 331-4.
- Gann PH, Ma J, Giovannucci E, Willett W, Sacks FM, Hennekens CH, Stampfer MJ. Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of prospective analysis. *Cancer Res* 1999; 59: 1225-30.
- Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(12):1239-48.
- Gerhardsson DE, Verdier M, Hagman U, Peters RK, Steineck G, Overvik E. Meat, Cooking Methods And Colorectal Cancer: A Case-Referent Study In Stockholm.*Int J Cancer* 1991; 4: 520-5.
- Gil JP, Lechner MC, Increased frequency of wild-type arylamine-n-acetyltransferase allele NAT2*4 homozygotes in portuguese patients with colorectal cancer. *Carcinogenesis* 1998; 19(1):37-41.
- Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Ascherio A, Chute CC, Willett WC. A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1571-9.

- Goldman R, Shields PG. Food Mutagens. J Nutr 2003; 3: 965S-973S.
- Granja F, Morari EC, Assumpção LVM, Ward LS. Gsto polymorphism analyses in thyroid nodules suggest that gsto1 variants do not influence the risk for malignancy. Eur J cancer prev 2005;14(3): 277-280.
- Granja F, Morari J, Morari EC, Correia LA, Assumpção LVM, Ward LS. Gst profiling may be useful in the screening for thyroid nodule malignancy. Cancer Letters 2004;209 (2): 129-137.
- Grant DM, Hughes NC, Janezic SA, Goodfellow GH, Chen HJ, Gaedigk A, Yu VL, Grewal R. Human acetyltransferase polymorphisms. Mutat Res 1997; 376(1-2):61-70.
- Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. Lancet 2003; 361:859-864.
- Gronberg H, Xu J, Smith JR, Carpten JD, Isaacs SD, Freije D, Bova GS et al . Early age at diagnosis in families providing evidence of linkage to the hereditary prostate cancer locus (HPC1) on chromosome 1. Cancer Res 1997; 57(21):4707-9.
- Gross AG, Turesky RJ, Fay LB, Stillwell WG, Skipper PL, Tannenbaum SRA. Heterocyclic aromatic amine formation in grilled bacon, beef and fish and in grill scrapings. Carcinogenesis 1993; 14: 2313-2318.
- Guess HA, Arrighi HM, Metter EJ, Fozard JL. Cumulative prevalence of prostatism matches the autopsy prevalence of benign prostatic hyperplasia. Prostate 1990; 17(3):241-6.
- Haas GP, Sakr WA. Epidemiology of prostate cancer. Cancer J Clin 1997; 47 (5): 273-87.
- Hall P, Holm L. Radiation-associated thyroid cancer- facts and fiction. Acta Oncol 1998; 37:325-30.
- Hall MC, Navone NM, Troncso P, Pollack A, Zagars GK, Eschenbach Von. AC, Conti CJ, Chung LWK. Frequency and characterization of p53 mutations in clinically localized prostate cancer. Urology 1995; 45:470-475.
- Hamasaki T, Inatomi H, Katoh T, Aono H, Ikuyama T, Muratani T, Matsumoto T N-acetyltransferase-2 gene polymorphism as a possible biomarker for prostate cancer in Japanese men. Int J Urol 2003;10(3): 167-73.

Harper ME, Glynne-jones E, Goddard I, Wilson DW, Matenhella SS, Conn IG, Pelling WB, Griffiths K. Relationship of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in prostatic carcinomas to various clinical parameters. *Prostate* 1992; 20:243-253.

Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266:1821-1828.

Hasegawa R, Sano M, Tamano S, Imaida K, Shirai T, Nagao M, Sugimura T, Ito N. Dose-dependence of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP) carcinogenicity in rats. *Carcinogenesis* 1993; 14(12): 2553-7.

Haselkorn T, Stewart SL, Horn-Ross PL. Why are thyroid cancer rates so high in Southeast Asian women living in the United States? The bay area thyroid cancer study. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev* 12: 144-150, 2003.

Hayes RB, Ziegler RG, Gridley G, Swanson C, Greenberg RS, Swanson GM. Dietary factors and risks for prostate cancer among blacks and whites in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8:25-34.

He LJ, Yu YM, Qiao F, Liu JS, Sun XF, Jiang LL. Genetic polymorphisms of N-acetyltransferase2 and colorectal cancer risk. *World J Gastroenterol.* 2005;11(27): 4268-71.

Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2 : role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research* 2002; 507: 65-77.

Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Gray K, Deitz AC, Feng Y, Jiang W, Rustan TD, Satran SL, Wilkie TR Sr. Rodent models of the human acetylation polymorphism: comparisons of recombinant acetyltransferases. *Mutat Res* 1997; 376(1-2):101-106.

Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Leff MA, Webb SJ, Xiao GH, Devanaboyina US, Nangju NA, Feng Y. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemi Bio Preve* 2000; 9: 29-42.

Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Gray K, Feng Y, Ferguson RJ, Grant DM. Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis* 1993;14(8):1633-1638.

Hein DW, Rustan TD, Ferguson RJ, Doll MA, Gray K. Metabolic activation of aromatic and heterocyclic N-hydroxyarylamines by wild-type and mutant recombinant human NAT1 and NAT2 acetyltransferases. Arch Toxicol 1994; 68(2):129-133.

Hein DW. Effects of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2 on metabolic activation (O-acetylation) of heterocyclic amine carcinogens. Int. Journ. of Cancer 2006; 28: 1-6.

Heinonen OP, Albanes D, Virtamo J et al. Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial. J Natl Cancer Inst 1998; 90:440-446.

Hernandez A, Xamena N, Gutierrez S, Velazquez A, Creus A, Surrallés J, Galofre P, Marcos R. Basal and induced micronucleus frequencies in human lymphocytes with different GST and NAT2 genetic backgrounds. Mutat Res 2006 ;606(1-2):12-20.

Hsing AW, Devesa SS. Trends and patterns of prostate cancer: what do they suggest? Epidemiol Rev 2001; 23: 3-13.

Hoollywood, DP, Lemoine NR. Growth factors. Oncogenes and tumor suppressor genes. En assesment of cell proliferation in clinical practice. Eds.Hall PA,Levision A, Wright NA. Londres 1992: 27-43.

Hu CK, Mc Call S, Madden J, Huang H, CloughR, Jirtle RL, Anscher MS. Loss of heterozygosity of M6P/IGF2R gene is an early event in the development of prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis; 2006: 9(1):62-7.

Huang YS, Chern HD, Wu JC, Chao Y, Huang YH, Chang FY, Lee SD. Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene, red meat intake, and the susceptibility of hepatocellular carcinoma. Am J Gastroenterol 2003; 98(6):1417-1422.

Hughes HB, Biehl JP, Jones AP, Schmidt LH. Metabolism of isoniazid in man as related to the occurrence of peripheral neuritis. Am. Rev. Res Dis 1954; 70: 266-273.

Hutchison GB. Epidemiology of Prostatic Cancer. Semin Oncol 1976; 3: 151-159.

Inatomi H, Katoh K, Kawamoto T, Matsumoto T. NAT 2 gene polymorphism as a possible biomarker for susceptibility to bladder cancer in Japanese. Int J Urol 1999; 6: 446-54.

Ito Y, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kuma K, Miyauchi A. Papillary microcarcinoma of the thyroid: how should it be treated? *World J Surg* 2004; 28:1115-1121.

Ito Y, Uruno T, Takamura Y, Nakano K, Takamura Y, Miya A. An observation trial without surgical treatment in patients with papillary microcarcinoma of the thyroid. *Thyroid* 2003; 13:381-387.

Jemal, A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. *CA Cancer J Clin* 2003; 53(1):5-26.

Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu.Rev.Pharmacol Toxicol* 1999; 39:295-312.

Kadlubar FF. DNA adducts of carcinogenic aromatic amines. *IARC Sci Publ* 1994; 125:199-216.

Kassayova M, Ahlersova E, Ahlers I. Changes of pineal N-acetyltransferase activity in gamma irradiated rats. *Physiol Res* 1993;42(3):167-9.

Kato T. Histological study on hyperplasia of the prostate with special reference to histogenesis of nodule. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1967; 58(5):469-483.

Katoh T, Inatomi H, Yang M, Kawamoto T, Matsumoto T, Bell DA. Arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) genes and risk of urothelial transitional cell carcinoma among Japanese. *Pharmacogenetics* 1999; 9(3): 401-404.

Katoh T, Kaneko S, Boissy R, Watson M, Ikemura K, Bell DA. A pilot study testing the association between N-acetyltransferases 1 and 2 and risk of oral squamous cell carcinoma in Japanese people. *Carcinogenesis* 1998; 19(10): 1803-1807.

Kelly SL, Sim E. Arylamine N-acetyltransferase in balb/c mice: identification of a novel mouse isoenzyme by cloning and expression in vitro. *Biochem J* 1994; 302: 347-353.

Knize MG, Salmon CP, Metha SS, Felton JS. Analysis of cooked muscle meats for heterocyclic aromatic amine carcinogens. *Mutat Res* 1997; 376:129-134.

Knudson AG . Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(23):10914-10921.

Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 1971; 68:820.

Kolonel LN, Hankin JH, Whittemore AS, Wu AH, Gallagher RP, Wilkens LR, John EM, Howe GR, Dreon DM, West DW, Paffenbarger RS Vegetables, fruits, legumes and prostate cancer: a multiethnic case-control study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2000; 9: 795-804.

Kote-Jarai Z, Easton D, Edwards SM, Jefferies S, Durocher F, Jackson RA, Singh R, Ardern-Jones A, Murkin A, Dearnaley DP, Shearer R, Kirby R, Houlston R, Eles R; Crc/bpg uk familial prostate cancer study collaborators.relationship between glutathione s-transferase m1, p1 and t1 polymorphisms and early onset prostate cancer. Pharmacogenetics 2001; 11(4): 325-30.

Kukongviriyapan V, Senggunprai L, Prawan A, Gaysornsiri D, Kukongviriyapan U, Aiemsa-Ard J.Salivary caffeine metabolic ratio in alcohol-dependent subjects. Eur J Clin Pharmacol 2004; 60(2):103-107.

Lam KY, Law SY, So MK, Fok M, Ma LT, Wong J. Prognostic implication of proliferative markers MIB-1 and PC10 in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer 1996; 77(1):7-13.

Lawson T, Kolar C. Human prostate epithelial cells metabolize chemicals of dietary origin to mutagens. Cancer Lett 2002; 175(2):141-6.

Layton DW, Bogen KT, Knize MG, Hatch FT, Johnson VM, Felton JS. Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. Carcinogenesis 1995; 16(1):39-52.

Leff MA, Epstein PN, Doll MA, Fretland AJ, Devanaboyina US, Rustan TD, Hein DW. Prostate-specific human N-acetyltransferase 2 (NAT2) expression in the mouse. J Pharmacol Exp Ther 1999; 290(1): 182-197.

Lemoine NR, Leung HY, Gullick WJ. Growth factors in the gastrointestinal tract.Gut 1992;33(10):1297-300

Levine AJ, Momand J, Finaly CA. The p53 tumor supressor gene. Nature 1991; 351: 453-456.

- Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343(2):78-85.
- Lin HJ, Han CY, Lin BK, Hardy S. Ethnic distribution of slow acetylator mutations in the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) gene. *Pharmacogenetics* 1994; 4(3):125-134.
- Lundeberg S, Berge T. Prostatic carcinoma: an autopsy study. *Scand J Urol Nephrol* 1970; 4: 93-97.
- Mack WJ, Preston-Martin S, Bernstein L, Qian D. Lifestyle and other risk factors for thyroid cancer in Los Angeles County females. *Ann. Epidemiol* 2002; 12: 395-40.
- Mack WJ, Preston-Martin S, Dal Maso I, Galanti R, Xiang M, Franceschi S, Hallquist A, et al. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer: cigarette smoking and consumption of alcohol, coffee, and tea. *Cancer Causes Control* 2003; 14:773-85.
- Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases- structure and catalytic activity, *Crit.Rev. Biochem* 1988; 23: 283-337.
- Mashimo M, Susuki T, Abe M Duguchi T. Molecular genotyping of N-acetylation polymorphism to predict phenotype. *Human Genet* 1992; 90:139-143.
- Matos PS, Ferreira APC, Ward LS. Prevalence of papillary microcarcinoma of the thyroid in brazilian autopsy and surgical series. *Endocrine Pathology* 2006;17(1): 236-41.
- Matsus N, Thygesen P, Stacey M, Risch A, Sim E. Mapping AAC1, AAC2, and AACP, the genes for arylamine N-acetyltransferase , carcinogen metabolizing enzymes on human chromosome 8.p22, a region frequently deleted in tumors. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 77: 290-295.
- Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Ferreira P, Lobo F et al. Metabolic susceptibility genes and prostate cancer risk in a southern European population: the role of glutathione S-transferases GSTM1, GSTM3, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Prostate* 2004; 58(4):414-420.

- Memon A, Berrington DE, Gonzalez A, Luqmani Y, Suresha. Family history of benign thyroid disease and cancer and risk of thyroid cancer. *Eur J Cancer* 2004; 40: 754-760.
- Menom A, Varghese A, Suresh A. Benign thyroid disease and dietary factors in thyroid cancer: a case –control study in Kuwait. *Bt J Cancer* 2002; 86: 1745-1750.
- Mettlin CJ, Murphy GP, Cunningham MP, Menck HR. The National Cancer Data Base report on race, age, and region variations in prostate cancer treatment. *Cancer* 1997 80(7):1261-6.
- Meyer UA, Zanger U, Skoda R, Grant DM. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes: molecular mechanisms. *Psychopharmacol* 1989; 7:141-147.
- Morari EC, Leite JLP, Granja F, Assumpção LVM and Ward LS The null genotype of glutathione s-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. *Cancer Epidemiol, Bio & Prev* 2002; 11(11): 1485-1488.
- Morgenthaler PM, Holzhauser D. Analysis of mutations induced by 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4,5-B] pyridine (Phip) in human lymphoblastoid cells. *Carcinogenesis* 1995; 16:713-718.
- Murata M, Watanabe M, Yamanaka M, Kubota Y, Ito H, Nagao M, Katoh T, Kamataki T, Kawamura J, Yatani R, Shiraishi T. Genetic polymorphisms in cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP1A2, CYP2E1, glutathione S-transferase (GST) M1 and GSTT1 and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population. *Cancer Lett* 2001; 165(2): 171-177.
- Nielsen PS, De Pater N, Okkels H, Autrup H. Environmental air pollution and DNA adducts in Copenhagen bus drivers-effect of GSTM1 and NAT2 genotypes on adduct levels. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1021-1027.
- Norrish AE, Ferguson LR, Knize MG, Felton JS, Sharpe SJ, Jackson RT. Heterocyclic amine content of cooked meat and of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(23): 2038-2044.
- Ohsako S, Deguchi T. Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine N-acetyltransferases from human liver. *J Biol Chem* 1990; 265(8): 4630-4634.

Oota K. Latent carcinoma of the prostate among the japonese. *Acta Un Int Cancer* 1961; 17:952-957.

Palli D, Vienis P, Russo A, Berrino F, Krogh V, Massala G et al. Diet, metabolic polymorphisms and DNA adducts: the epi-Italy cross-sectional study. *Int. J. Cancer* 2000; 87: 444-451.

Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 1996; 46(1):5-27.

Partin AW, Oesterling TE. Prostate specific antigen in urologic clinical practice. *AUA Update Series* 1995; 14: 1-12.

Partin, AW, Oesterling JE. The clinical usefulness of prostate specific antigen. *J Urol* 1994; 152:1358-1368.

Pavanello S, Simioli P, Mastrangelo G, Lupi S, Gabbani G, Gregorio P, Clonfero E. Role of metabolic polymorphisms NAT2 and CYP1A2 on urinary mutagenicity after a pan-fried hamburger meal. *Food Chem Toxicol* 2002; 40(8):1139-44.

Peluso M, Amasio E, Bonassi S, Munnia A, Altrupa F, Parodi S. Detection of DNA adducts in human nasal mucosa tissue by 32P-postlabeling analysis. *Carcinogenesis* 1997; 18(2): 339-44.

Perera, F, Weinstein B. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 517-524.

Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* 1993; 72:962-970.

Preston-Martin S, Franceschi S, Ron E, Negri E. Thyroid cancer pooled analysis from 14 case-control studies: what have we learned? *Cancer Causes Control* 2003; 14:787-789.

Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU* 2002; 90:162-73.

Rabenhorst SH, Burini RC, Schimitt FCL. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. *Rev Bras Cancerol* 1994; 40:141-147.

Rabenhorst SH, Burini RC, Schimitt FCL. Marcadores de proliferação celular. *Rev Bras Patol Clin* 1993; 29:24-29.

- Raunio H, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Hietanen E, Hirvonen A, Pelkonen O. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility--a review. *Gene* 1995; 159(1):113-121.
- Rey E, Pons G, Cremier O, Vauzelle-Kervroedan F, Pariente-Khayat A, D'Athis P, Badoual J, Olive G, Gendrel D. Isoniazid dose adjustment in a pediatric population. *Ther Drug Monit* 1998; 20(1):50-5.
- Ron E. Ionizing radiation and cancer risk: evidence from epidemiology. *Radiat Res* 1998;150(5 Suppl):S30-41.
- Ron E, Kleinerman RA, Boice JD Jr, LiVolsi VA, Flannery JT, Fraumeni JF Jr. A population-based case-control study of thyroid cancer. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79(1):1-12.
- Rossing M, Voigt L, Wicklund K, Williams M, Daling J. Use of exogenous hormones and the risk of papillary thyroid cancer. *Cancer Causes Control* 1998; 9:341-9.
- Rous P. The challenge to man of the neoplastic cell. *Science* 1967; 157: 24-28.
- Rovito Jr PM, Morse PD, Spinek K, Newman N, Jones RF, Wang CY, Haas GP. Heterocyclic amines and genotype of N-acetyltransferases as risk factors for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2005; 8(1):69-74.
- Ruijter ET, Miller GJ, van de Kaa CA, van Bokhoven A, Bussemakers MJ, Debruyne FM, Ruiter DJ, Schalken JA. Molecular analysis of multifocal prostate cancer lesions. *J Pathol* 1999 ;188(3):271-7.
- Schiffman MH, Felton JS. Re: "Fried foods and the risk of colon cancer". *Am J Epidemiol* 1990; 2:376-8.
- Schlumberger MJ, Torlantino M. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000; 14(4):601-13.
- Schottenfeld D, Beebe-Dimmer JL. Advances in cancer epidemiology: understanding causal mechanisms and the evidence for implementing interventions. *Annual Reviews Public Health* 2005; 26:37-60.

- Singh B, Shaha AR, Trivedi H, Carew JF, Poluri A, Shah JP. Coexistent Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma: impact on presentation, management, and outcome. *Surgery* 1999; 126:1070-1076.
- Skretkiewicz K, Skretkiewicz J, Gawronska-Szklarz B, Gornik W, Rychlik-Sych M, Sysa-Jedrzejowska Lack of association between arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) polymorphism and systemic sclerosis. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 60(11):773-778.
- Smaaland R. Circadian rhythm of cell division. *Cell Cycle Res* 1996; 20:241-266.
- Smits KM, Benhamou S, Garte S, Weijenberg MP, Alamanos Y, Ambrosone C et al. Association of metabolic gene polymorphisms with tobacco consumption in healthy controls. *Int J Cancer* 2004; 110(2):266-70.
- Sobin LH, Fleming ID. *TNM Classification of Malignant Tumors*, fifth edition (1997).
- Soos G, Tsakiris I, Szanto J, Turzo C, Haas PG, Dezso B. The prevalence of prostate carcinoma and its precursor in Hungary: an autopsy study. *Eur Urol* 2005; 48(5):739-44.
- Sorensen M, Autrup H, Tjonneland A, Overvad K, Raaschou-Nielsen O. Genetic polymorphisms in CYP1B1, GSTA1, NQO1 and NAT2 and the risk of lung cancer. *Cancer Lett* 2005; 221(2):185.
- Souza SL, Assumpção LVM, Ward LS. Impact of previous thyroid autoimmune diseases on prognosis of patients with well-differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2003; 13(5): 491-495.
- Srinivas P, Verma M, Zhao Y, Srivastava S. Proteomics for Cancer Biomarker Discovery. *Clinical Chemistry* 2002; 48:1160-1169.
- Srivastava DS, Mittal RD. Genetic polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene, and susceptibility to prostate cancer: a pilot study in north Indian population. *BMC Urol* 2005; 6:5-12.
- Stocker DJ, Foster SS, Solomon BL, Shriver CD, Burch HB. Thyroid cancer yield in patients with Graves' disease selected for surgery on the basis of cold scintiscan defects. *Thyroid* 2002; 12:305-311.

Sugimura T. Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutat Res* 1997; 376(1-2):211-9.

Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci.* 2004;95(4): 290-9.

Tang BK, Kadar D, Qian L, Iriah J, Yip J, Kalow W. Caffeine as a metabolic probe: validation of its use for acetylator phenotyping. *Clin Pharmacol Ther.* 1991; 49(6):648-567.

Tang H, Zhu Y, Song H. The structure and function of urokinase receptor and its expression in neoplastic tissues, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 1995; 75(5):315-7.

Thilly WG. Have environmental mutagens caused oncomutations in people? *Nat Genet* 2003; 34(3):255-259.

Thompson & Thompson. *Genética e câncer.* In: *Genética Médica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan ; 2002. p 274-276.

Thompson DE, Mabuchi K, Ron E, Soda M, Tokunaga M, Ochikubo S, Sugimoto S, Ikeda T, Terasaki M, Izumi S, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors, 1958-1987 *Radiat Res* 1994 ;137(2 Suppl):S17-67.

Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med* 1999 ; 50:401-423.

Truong T, Orsi L, Dubourdieu D, Rougier Y, Hemon D, Guenel P. Role of goiter and of menstrual and reproductive factors in thyroid cancer: a population-based case-control study in New Caledonia (South Pacific), a very high incidence area. *Am J Epidemiol* 2005;161(11):1056-65.

Turesky RJ, Lang NP, Butler MA, Teitel CH, Kadlubar FF. Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. *Carcinogenesis* 1991; 12(10):1839-1845.

Vaish M, Mishra A, Kaushal M, Mishra SK, Mittal B. Microsatellite instability and its correlation with clinicopathological features in a series of thyroid tumors prevalent in iodine deficient areas. *Exp Mol Med* 2004; 36(2): 122-129.

Varmus H, Hirai H, Morgan D, Kaplan J, Bishop JM. Function, location, and regulation of the src protein-tyrosine kinase. *Princess Takamatsu Symp* 1989;20:63-70.

Vatsis KP, Weber WW, Bell DA, Dupret JM, Evans DA, Grant DM, Hein DW, Lin HJ, Meyer UA, Relling MV, et al. Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics* 1995; 5(1):1-17.

Vineis P. Individual susceptibility to carcinogens. *Oncogene* 2004; 23(38):6477-6483.

Vineis P. Cancer as an evolutionary process at the cell level: an epidemiological perspective. *Carcinogenesis* 2003; 24:1-6.

Vineis P. Diet, genetic susceptibility and carcinogenesis. *Public Health Nutr* 2001; 4: 485-91.

Visakorpi T. Proliferative activity determined by DNA flow cytometry and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry as a prognostic factor in prostatic carcinoma. *J Pathol* 1992; 168(1):7-13.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319:525-532.

Wadelius M, Autrup JL, Stubbins MJ, Andersson SO, Johansson JE, Wadelius C, Wolf CR, Autrup H, Rane A. Polymorphisms in NAT2, CYP2D6, CYP2C19 and GSTP1 and their association with prostate cancer. *Pharmacogenetics* 1999; 9(3):333-340.

Wang CY, Debiec-Rychter M, Schut HA, Morse P, Jones RF, Archer C, King CM, Haas GP. N-Acetyltransferase expression and DNA binding of N-hydroxyheterocyclic amines in human prostate epithelium. *Carcinogenesis* 1999; 20(8):1591-1595.

Ward LS, Kunii IS, De Barros Maciel RM. Thyroid stimulating hormone levels in cord blood are not influenced by non-thyroidal mothers' diseases. *São Paulo Med J* 2000; 118(5):144-7.

Ward LS. Understanding the Molecular Process of Tumorigenesis. *Endo Metab* 2002; 46: 351-360.

Weber WW, Hein DW. Clinical pharmacokinetics of isoniazid. *Clin Pharmacokinet* 1979; 4: 401-422.

Weber WW, Hein DW. N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol Rev* 1985; 37(1): 25-79.

Weber WW. The molecular basis of hereditary acetylation polymorphisms. *Drug Metab Dispos.* 1986 ;14(4):377-81.

Weimann A, Sabroe M, Poulsen HE. Measurement of caffeine and five of the major metabolites in urine by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2005; 40(3):307-316 .

Welfare MR, Bassendine MF, Daly AK. The effect of NAT2 genotype and gender on the metabolism of caffeine in nonsmoking subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2000; 49(3):240-243.

Welker MJ, Orlov D. Thyroid nodules. *Am. Fam. Physician* 2003; 67:559-566.

William BM, Abdel-tawab AM, Hassan EA, Mohamed OF. Acetylator phenotyping in patients with malignant lymphomas, using caffeine as the metabolic probe. *Pol J Pharmacol* 2004; 56(4):445-449.

Wong FWS. Immunohistochemical detection of proliferating tumor cells in cervical cancer using monoclonal antibody Ki-67. *Gynecol Obstet Invest* 1994 ; 37:123-126.

Woolhouse NM, Qureshi MM, Bastaki SM, Patel M, Abdulrazzaq Y, Bayoumi RA. Polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) genotyping of emiratis. *Pharmacogenetics* 1997; 7(1):73-82.

Wu CP, Gu FL. The prostate in eunuchs. *Prog Clin Biol Res* 1991; 370: 249-55.

Wynder EL, Mabuchi K, Whitmore WF Jr. Epidemiology of cancer of the prostate. *Cancer.* 1971;28(2):344-60.

Xie HG, Xu ZH, Ou-Yang DS, Shu Y, Yang DL, Wang JS, Yan XD, Huang SL, Wang W, Zhou HH. Meta-analysis of phenotype and genotype of NAT2 deficiency in Chinese populations. *Pharmacogenetics* 1997; 7(6):503-14.

Zahm SH, Blair A. Pesticides and non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 1992; 52(19):5485s-5488s.

Zardo F, Soldo P, Altissimi G, Parnasi E, Bertin S. Hashimoto's thyroiditis and thyroid cancer: a report of a clinical case and a review of the literature. *G Chir* 1999; 20:174-6.

Zheng W, Gustafson DR, Sinha R, Cerhan JR, Moore D, Hong CP, Anderson KE, Kushi LH, Sellers TA, Folsom AR. Well-done meat intake and the risk of breast cancer. J Natl Cancer Inst 1998; 22:1724-1729.

Zhu Y, Doll MA, Hein DW. Functional genomicisof C190T single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltranferase 2. Biol Chem 2002; 383: 983-987.

ENDEREÇOS ELETRONICOS

INCA. Instituto Nacional do Câncer: banco de dados. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>. Acesso em : 10 maio, 2006.

Louisville. Nomenclatura oficial dos alelos humanos de NAT2.Banco de dados. Disponível em: <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT2.html>. Acesso em: 1 janeiro, 2006.

8- ANEXOS

ANEXO 1

Nomenclatura dos Alelos humanos de NAT2				
Genótipos	Troca de nucleotídeos	Troca de aminoácidos	Fenótipo	Referências
NAT2*4	nenhuma	Nenhuma	Rápido	1.3.4.6.7.22.23
NAT2*5A	T341C C481T	Ile ¹¹⁴ Thr	Lento	2,24,25,28
NAT2*5B	T341C C481T A803G	Ile ¹¹⁴ -Thr Lys ²⁶⁸ -Arg	Lento	4.25.27
NAT2*5C	T341C A803G	Ile ¹¹⁴ -Thr Lys ²⁶⁸ -Arg	Lento	24,25.26.28
NAT2*5D	T341C	Ile ¹¹⁴ -Thr	Lento	29-32
NAT2*5E	T341C G590A	Ile ¹¹⁴ -Thr Arg ¹⁹⁷ -Gln		29
NAT2*5F	T341C C481T C759T A803G	Ile ¹¹⁴ -Thr Lys ²⁶⁸ -Arg		33
NAT2*5G	C282T T341C C481T A803G	Ile ¹¹⁴ -Thr Lys ²⁶⁸ -Arg		72
NAT2*5H	T341C C481T A803G T859C	Ile ¹¹⁴ -Thr Lys ²⁶⁸ -Arg Ile ²⁸² -Thr		72
NAT2*5I	T341C A411T C481T A803G	Ile ¹¹⁴ -Thr Lys ²⁶⁸ -Arg Leu ¹³⁷ -Phe		73
NAT2*5J	C252T T341C G590A	Ile ¹¹⁴ -Thr Arg ¹⁹⁷ -Gln		75
NAT2*6A	C282T G590A	Arg ¹⁹⁷ -Gln	Lento	1.3.4.25.26
NAT2*6B	G590A	Arg ¹⁹⁷ -Gln	Lento	25.30.31
NAT2*6C	C282 G590A A803G	Arg ¹⁹⁷ -Gln Lys ²⁶⁸ -Arg		30.31

NAT2*6D	T111C C282T G590A	Arg ¹⁹⁷ -Gln		32
NAT2*6E	C481T G590A	Arg ¹⁹⁷ -Gln		67
NAT2*7A	G857A	Gly ²⁸⁶ -Glu	Lento	3.7.25
NAT2*7B	C282T G857A	Gly ²⁸⁶ -Glu	Lento	1.24
NAT2*10	G499A	Glu ¹⁶⁷ -Lys	Rápido	65
NAT2*11A	C481T	nenhum		65.66
NAT2*11B	T481C 859 del	Ser ²⁸⁷ frameshift		72
NAT2*12A	A803G	Lys ²⁶⁸ -Arg	Rápido	25.35
NAT2*12B	C282T A803G	Lys ²⁶⁸ -Arg	Rápido	25.31
NAT2*12C	C481T A803G	Lys ²⁶⁸ -Arg	Rápido	28.30.31
NAT2*12D	G364A A803G	Lys ²⁶⁸ -Arg Asp ¹²² -Asn		74
NAT2*13	C282T	Nenhum	Rápido	25.26.29.34
NAT2*14A	G191A	Arg ⁶⁴ -Gln	Lento	28.36
NAT2*14B	G191A C282T	Arg ⁶⁴ -Gln	Lento	36.37
NAT2*14C	G191A T341C C481T A803G	Arg ⁶⁴ -Gln Ile ¹¹⁴ -Thr Lys ²⁶⁸ -Arg		29-31
NAT2*14D	G191A C282T G590A	Arg ⁶⁴ -Gln Arg ¹⁹⁷ -Gln		29-31
NAT2*14E	G191A A803G	Arg ⁶⁴ -Gln Lys ²⁶⁸ -Arg		29
NAT2*14F	G191A T341C A803G	Arg ⁶⁴ -Gln Ile ¹¹⁴ -Thr Lys ²⁶⁸ -Arg		31
NAT2*14G	G191A C282T A803G	Arg ⁶⁴ -Gln Lys ²⁶⁸ -Arg		32
NAT2*17	A434C	Gln ¹⁴⁵ -Pro	Lento	38
NAT2*18	A845C	Lys ²⁸² -Thr		38
NAT2*19	C190T			39.68.69

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO

Projeto de Pesquisa em Genética Molecular do Câncer

Profa. Dra. Laura Sterian Ward

Paciente ou Responsável pelo paciente

Sr(a) :

Idade:

RG:HC:

Endereço:

Telefone:

Concordo em doar sangue e um fragmento do material retirado durante minha cirurgia para pesquisa de genes que podem estar envolvidos no aparecimento do câncer. Sei que se trata de uma pesquisa científica e concordo em que os dados do meu caso, registrados no meu prontuário médico, sejam usados para avaliar a importância dos genes, sabendo que meu nome assim como meus dados clínicos e de laboratório não serão individualmente citados e que em nenhum momento meu diagnóstico ou tratamento serão prejudicados por tal doação.

Também sei que esta pesquisa pode trazer benefícios para a cura ou tratamento do câncer no futuro, mesmo que eu não me beneficie disso agora. Não terei nenhum gasto com a doação do meu material para esta pesquisa e sei que poderei cancelar minha decisão e deixar de participar em qualquer momento. Também não serei submetido a qualquer

procedimento que não faça parte da rotina de meu tratamento normal, sob a orientação de meu médico habitual.

Estou consciente da importância de minha participação da qual posso desistir em qualquer momento. Fui informado de que este projeto está aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA e sei que poderei obter todas as informações que desejar no fone (19) 3783-8936.

.....

Assinatura

Profa. Dra. Laura Sterian Ward – Coordenadora do GEMOCA/FCM-UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz ou Caixa Postal 6111 – CEP 13081-970

Campinas – SP / BRASIL FAX : 0055-019-2894107 e-mail: ward@unicamp.br

ANEXO 3

PROTOCOLO DE PESQUISA – PRÓSTATA

Nº :

Nome :Idade :

Idade ao diagnóstico :Raça :

» Antecedentes :

Tabagismo Álcool Drogas (maconha,cocaína,crack,outros)

» Hábitos :

Exercícios físicos (semanal) : SIM NÃO

Ingesta de carne vermelha : SIM NÃO

Ingesta de verduras : SIM NÃO

» Exames :

PSA : TR :

» Anatomopatológico :

Tipo histológico :

Gleason :

» Estadiamento

Cintilografia óssea :

Rx Tórax :

CT abdome/Pelve :

» Tratamento :

» Observação :